

La couverture de cet ouvrage a été réalisée et mise en page par Sébastien GUIOT.
©2019



FACULTE DE MEDECINE
Département de Biologie Clinique
Service de Microbiologie Clinique



FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires
Service de Virologie Vétérinaire et des Maladies Virales
Animales

Le norovirus humain : contribution à la détection, à la caractérisation et l'épidémiologie clinique et moléculaire

Thèse déposée à la Faculté de Médecine de l'Université de Liège par
Pascale HUYNEN, Docteur en Médecine et titulaire d'un Diplôme d'Etudes
Spécialisées (D.E.S.) en Biologie Clinique, en vue de l'obtention du grade
académique de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques.

Promoteur : Etienne THIRY (ULiège, Liège, Belgique)

Co-promoteur : Pierrette MELIN (ULiège, Liège, Belgique)

Président du jury : Michel MOUTSCHEN (ULiège, Liège, Belgique)

Membres du jury

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| Soizick F LE GUYADER | (IFREMER, Nantes, France) |
| Katelijne DIERICK | (Sciensano, Bruxelles, Belgique) |
| Nathalie JACOBS | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Etienne THIRY | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Pierrette MELIN | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Edouard LOUIS | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Renaud LOUIS | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Pierre DAMAS | (ULiège, Liège, Belgique) |
| Patrick DE MOL | (ULiège, Liège, Belgique) |

Année académique 2018-2019

A mes parents, Ernst Huynen et Anne-Marie Huynen-Jeugmans,

A ma sœur Rachel,

A mon fils Florian.

C'est avec toute mon affection que je leur dédie ce mémoire.

***'Tout obstacle renforce la détermination.
Celui qui s'est fixé un but n'en change pas.'***
Léonard de Vinci (1452 - 1519)

Résumé

Les norovirus sont des virus à ARN simple brin, non enveloppés. Le genre *Norovirus* comprend 7 génogroupes (G) parmi lesquels les génogroupes I, II et IV sont pathogènes pour l'Homme.

Le norovirus humain (NoV) est reconnu mondialement comme le premier agent causal de gastro-entérites virales aiguës et le principal pathogène responsable des gastro-entérites virales d'origine alimentaire.

Il y a de cela une décennie, les NoV étaient méconnus des microbiologistes et des cliniciens en Belgique. Les méthodes de détection commerciales telles que nous les connaissons actuellement n'existaient pas encore, et ces virus ne faisaient pas partie des entéropathogènes recherchés en routine chez les patients. En particulier, le CHU de Liège ne disposait pas de méthode de détection des NoV chez les patients.

Préalablement à l'étude des NoV à proprement parler, il fut dès lors nécessaire de mettre au point et d'implémenter une méthode de détection des NoV.

Dans un premier temps, une RT-PCR quantitative en temps réel a été développée au laboratoire, permettant de détecter les NoV des génogroupes I, II et IV pathogènes pour l'Homme en une seule et même réaction. Bien que les méthodes de biologie moléculaire aient considérablement progressé en termes de facilité d'utilisation et de délai de réponse du résultat, toutes ces techniques remarquablement performantes nécessitent des automates à la pointe de la technologie.

Face à une épidémie de gastro-entérites aiguës, l'identification rapide des NoV est l'élément-clé pour contrôler efficacement la transmission virale. L'idéal dans ce cas est de disposer au laboratoire d'une méthode de détection simple, rapide, efficace et sans équipement particulier. Bien que la méthode diagnostique de référence reste la détection génomique du virus par méthode de biologie moléculaire, un test de détection des antigènes viraux par méthode rapide immunologique a également été évalué et implémenté. Dans le contexte d'épidémies de gastro-entérites, la facilité d'utilisation et les performances de ce test en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques, qui devrait toutefois être complétée par un génotypage des souches.

On ne saurait trop insister sur ce point : il faut penser aux NoV devant une épidémie de gastro-entérites aiguës. Les épidémies à NoV sont difficiles à maîtriser, principalement en raison de la haute contagiosité des NoV et leur résistance dans l'environnement compliquant

la désinfection complète et menant à des épidémies récurrentes. En particulier en milieu hospitalier, les épidémies à NoV ont un réel impact en termes de Santé Publique et peuvent engendrer des coûts considérables qui peuvent être limités par la mise en place précoce de mesures d'hygiène efficaces, essentielles pour limiter l'ampleur des épidémies.

Dans les pays en voie de développement, les gastro-entérites restent une cause importante de morbidité et de mortalité. En Afrique en particulier, la détection des NoV est peu ou pas réalisée faute de moyens, et l'impact des infections à NoV est probablement sous-estimé. Sur ce continent, très peu d'études ont été menées. En collaboration avec le Centre de Santé de Bobo Dioulasso, au Burkina Faso, une étude a permis d'investiguer l'épidémiologie moléculaire des souches de NoV circulant dans cette région chez 418 enfants.

Alors que NoV GII.4 est le génotype prédominant dans la majorité des études réalisées en Afrique, une remarquable diversité des souches circulantes a été observée lors de l'étude menée au Burkina Faso, avec une proportion étonnamment élevée de NoV GI en comparaison avec les génogroupes habituellement rapportés dans cette région du globe.

Le taux de portage mis en évidence chez les jeunes enfants asymptomatiques est considérable. Ces enfants pourraient dès lors jouer un rôle de 'réservoir' pour les infections à NoV.

Les rencontres fréquentes avec les NoV et l'exposition à de nombreuses souches différentes sont vraisemblablement favorisées par un accès limité à l'eau potable et un niveau d'hygiène moindre dans ces régions. Ceci pourrait expliquer une certaine protection de l'hôte, et le portage élevé qui en résulterait.

Après une période d'incubation courte de 24 à 72 heures, le tableau clinique classique d'une infection à NoV chez une personne préalablement en bonne santé est celui d'une gastro-entérite, dans la plupart des cas bénigne et spontanément résolutive en 2 à 3 jours. Il n'en est pas de même chez les patients immunocompromis : ceux-ci peuvent présenter des diarrhées persistantes et chroniques dont l'agent causal est souvent méconnu et sous-diagnostiqué.

Ces infections persistantes sont décrites depuis de nombreuses années chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, et ont été décrites par la suite chez les patients ayant bénéficié d'une greffe d'organe solide. Chez les patients présentant une immunosuppression profonde due à une infection par le VIH, des cas de diarrhées chroniques à NoV ont également été rapportés.

Dans un hôpital universitaire où plus de 2000 patients ont bénéficié à ce jour d'une greffe d'organe, il semblait opportun d'étudier les NoV chez ces patients. Grâce à des collaborations efficaces avec l'équipe du Service de Néphrologie et une aide financière

obtenue auprès du CHU de Liège, une étude prospective a été réalisée durant près de quatre ans chez des 117 patients transplantés rénaux, présentant ou non des symptômes gastro-intestinaux. Lors de cette étude, une excrétion virale prolongée a été mise en évidence chez les patients transplantés rénaux présentant une symptomatologie gastro-intestinale, mais également chez les patients asymptomatiques, avec des durées d'excrétions d'au moins 8 et 6 mois respectivement. Cette excrétion prolongée était assortie de charges virales qui restaient élevées chez certains patients, constituant dès lors une source potentielle de transmission virale.

La détection des NoV par méthode de biologie moléculaire devrait faire partie de l'exploration des troubles digestifs persistants chez les patients immunocompromis. Cela permettrait de faire le diagnostic différentiel avec d'autres causes de troubles digestifs et d'améliorer leur prise en charge clinique. En effet, la résolution des infections chroniques à NoV chez les patients immunocompromis à la suite d'une greffe est liée à la reconstitution du système immunitaire, et cette étude a effectivement montré l'impact d'une réduction du traitement immunosuppresseur sur la symptomatologie.

L'étude des NoV a indéniablement contribué à développer et à acquérir des compétences particulières en la matière, concernant un entéropathogène encore insuffisamment recherché chez les patients à l'heure actuelle.

Summary

Noroviruses are non-enveloped single stranded RNA viruses. The norovirus genus contains seven genogroups (G) including genogroups I, II and IV which infect humans.

Human noroviruses (NoV) are recognized as worldwide leading pathogens causing viral gastro-enteritis, and as the main pathogenic agent responsible for foodborne gastro-enteritis.

Ten years ago, NoV were not well known by microbiologists and clinicians in Belgium. The commercial detection methods now available did not yet exist and NoV were not routinely detected in patients. In particular, the University Hospital of Liège did not have a method for NoV detection in patients.

As a prerequisite to further NoV study, development and implementation of a NoV detection method was necessary.

This work describes the development of a quantitative real time PCR, allowing the detection of pathogenic human NoV genogroups I, II and IV in a single reaction.

When dealing with a gastro-enteritis outbreak of suspected viral etiology, a rapid NoV identification is the key to effective control of viral transmission. To enable this, a given diagnostic laboratory needs a simple and rapid method that does not require expensive or complicated equipment. Despite molecular diagnosis methods remaining the gold standard for NoV detection, a rapid immunologic test for viral antigen detection was also evaluated and implemented in this study. In the context of a gastro-enteritis outbreak, these easy-to use tests are a rapid and efficient diagnosis method which can leading to quick implementation of prevention strategies.

NoV outbreaks are difficult to control, mainly since NoV are highly contagious and resistant in the environment, complicating complete disinfection and leading to recurrent outbreaks. In hospitals in particular, NoV outbreaks can have a real public health impact and can lead to high costs. The rapid implementation efficient hygiene measures is essential to limit the size of such outbreaks.

In developing countries, gastro-enteritis remains an important cause of morbidity and mortality. In Africa in particular, NoV detection is not or not often performed due to the prohibitive cost; the impact of NoV infections is thus probably under-estimated. In this continent very few studies have been realized. Via a collaboration with the Bobo Dioulasso health care center in Burkina Faso, the second study performed in the context of this thesis

addressed this lack of information and allowed the investigation of molecular epidemiology of NoV strains circulating in 418 children from this region. While NoV GII.4 is typically identified as the predominant genotype in most studies performed in Africa, a large circulating strain diversity was observed in the study realized in Burkina Faso, with a surprisingly high NoV GI proportion. The number of NoV carriers observed in asymptomatic young children was high. These children could therefore play a reservoir role for NoV infections. The frequent contacts with NoV and exposure to numerous different strains, probably due to limited access to drinking water and a low hygiene level, could explain the host protection and the high carrier level in these countries.

After a short incubation period of 24 to 72 hours, the usual clinical presentation of a NoV infection in a healthy patient is a gastro-enteritis, benign in most cases and spontaneously resolved in two to three days. In immunocompromised patients, clinical evolution of a NoV infection is not the same. In these patients, NoV are responsible for persistent and chronic diarrhea, and often remain under-diagnosed. Such persistent infections have long been described in hematopoietic stem cell transplant patients and, more recently, in solid organ transplant patients. Chronic diarrhea has also been reported in patients with high immunosuppression due to HIV infection.

In a university hospital where more than 2000 patients have been transplanted up to the time of writing, a NoV study in this patient category was indicated. Via an effective collaboration with the Service of Nephrology and financial support obtained from the University Hospital of Liège, a prospective study was realized during more than four years in 117 kidney transplanted patients, presenting or not gastro-intestinal symptoms. In this study, prolonged viral excretion was observed in symptomatic kidney transplanted patients but also in asymptomatic patients, with maximal excretion duration of more than to eight and six months respectively. During these prolonged excretions, viral loads remained high in some patients, which could represent a potential source of viral transmission.

NoV detection with molecular biology methods should be a part of the exploration of persistent digestive troubles in immunocompromised patients to allow differentiation with other origins of digestive and improvement of clinical care of these patients. Indeed, solving NoV chronic infections in immunocompromised, transplant patients is linked with the immune system recovery. This study has shown a positive impact of immunosuppressive treatment reduction on symptomatology.

The study of NoV has undoubtedly contributed to develop specific skills in this field, and had improved knowledge concerning this enteropathogen that is still underinvestigated in patients.

Remerciements

La thèse de doctorat s'inscrivant dans la durée, de nombreuses personnes ont eu l'occasion de parcourir avec moi une partie plus ou moins longue du chemin et de contribuer à la concrétisation de cette thèse. Ce sont toutes ces personnes grâce auxquelles j'ai pu mener cet ouvrage à son terme que j'aimerais mettre en avant dans mes remerciements.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidée dans l'élaboration, la réalisation et la finalisation de ma thèse, et qui ont cru en moi.

Mes premiers remerciements sont naturellement adressés au Professeur Patrick De Mol, mon précédent promoteur et Chef de Service, qui a inspiré et permis la concrétisation de ces travaux de thèse portant sur les NoV. Je le remercie chaleureusement pour son aide, ses conseils, les moyens nécessaires qu'il a mis en œuvre, de m'avoir fait partager ses idées et de m'avoir soutenue lors de mes démarches pour mener à bien les différents projets de cette thèse, et d'a donné une dimension toute autre à ce projet en initiant une collaboration avec le Professeur Etienne Thiry, Chef du Service de Virologie Vétérinaire de l'Université de Liège.

Mes plus vifs remerciements vont à mon promoteur de thèse, le Professeur Etienne Thiry, qui m'a tout au long de ces projets prodigué avec rigueur ses conseils avisés. Je tiens à le remercier chaleureusement de m'avoir accueillie dans son service, de m'avoir accordé sa confiance et son temps précieux tout au long de ces projets, de m'avoir fait partager son expertise dans le domaine des NoV. J'aimerais également lui exprimer toute ma gratitude pour sa relecture méticuleuse de chacun des chapitres de ce manuscrit, sa grande disponibilité, sa bienveillance, son soutien et ses encouragements. J'exprime également ma sincère gratitude à ma Cheffe de Service et co-promotrice, le Professeur Pierrette Melin, pour le temps qu'elle m'a accordé et pour sa relecture enrichissante.

Je tiens à remercier les membres du Comité et du Jury de thèse d'avoir accepté d'en faire partie, de m'avoir suivie dans mon parcours et de m'avoir consacré de leur temps et leur expertise afin d'aboutir à bien la finalisation de cette thèse, et tout particulièrement le Professeur Michel Moutschen, Président du jury, pour ses précieux conseils et son amitié.

Durant les années passées à travailler sur ce sujet, des collaborations fructueuses se sont créées. Je remercie vivement et chaleureusement mes collègues médecins vétérinaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler sur les différents thématiques de cette thèse, en particulier le Docteur Elisabeth Mathijs qui m'a initiée aux techniques de détection moléculaire des NoV, le Docteur Axel Mauroy avec qui j'ai travaillé durant plusieurs années sur différents

projets, le Docteur Louisa Ludwig-Begall et le Docteur Ravo Razafimahefa pour leur conseils, leur disponibilité et leur sympathie. Chacun d'entre eux m'a transmis une partie de son expertise et sa passion pour cette thématique, et je tiens à leur exprimer toute ma gratitude de m'avoir accueillie dans leur équipe.

J'adresse mes remerciements chaleureux à toutes les personnes du Service de Microbiologie Clinique qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration et à la concrétisation de cette thèse, en particulier Raphaël Boreux et Françoise Toussaint.

Je tiens également à remercier mes confrères cliniciens qui ont pris part aux études menées dans le cadre de cette thèse, de même que les étudiants en dernière année de Pharmacie et de Sciences Biomédicales de l'ULiège qui, en s'investissant dans leur travail de fin d'études sous ma direction, m'ont aidée à mener à bien les différentes études présentées dans ce manuscrit.

Une partie de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier du budget FIRS octroyé par le CHU.

Et enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, chacun à sa manière, m'ont soutenue dans ce projet. Il ne m'est pas possible de les citer tous mais j'ai la certitude qu'ils se reconnaîtront.

Mes derniers remerciements et non des moindres sont adressés à mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée, qui m'ont donné le goût du travail et sans qui je n'aurais pu entreprendre de passionnantes études, et à ma très chère sœur Rachel qui a toujours été à mon écoute et présente à mes côtés.

Table des matières

| | |
|--|----|
| I. Introduction : les norovirus | 23 |
| 1. Historique..... | 25 |
| 2. Caractéristiques virologiques et classification..... | 26 |
| 3. Multiplication virale et recombinaison..... | 29 |
| 4. Pathogenèse..... | 31 |
| 5. Norovirus et immunité..... | 36 |
| 6. Manifestations cliniques..... | 37 |
| 7. Diagnostic..... | 39 |
| 8. Epidémiologie..... | 41 |
| 8.1. Voies de transmission..... | 41 |
| 8.2. Répartition démographique, géographie et impact socio-économique..... | 42 |
| 9. Prévention des épidémies..... | 44 |
| 10. Traitement et vaccin..... | 45 |
| II. Objectifs | 59 |
| 1. Objectifs principaux..... | 61 |
| 2. Objectifs spécifiques..... | 61 |
| III. Etudes et résultats | 63 |
| 1. Diagnostic microbiologique des norovirus..... | 65 |
| 1.1. <i>Mise au point d'une RT-PCR quantitative en temps réel</i> | 66 |
| A. Objectifs..... | 66 |
| B. Matériel et méthodes..... | 66 |
| B.1. Préparation de l'échantillon..... | 66 |
| B.2. Extraction de l'ARN..... | 66 |
| B.3. Amplification et détection de l'ARN par RT-PCR en temps réel..... | 67 |
| B.4. Quantification des échantillons..... | 68 |
| C. Résultats..... | 68 |
| C.1. Évaluation de la méthode à l'aide d'échantillons caractérisés..... | 68 |
| C.2. Spécificité..... | 70 |

| | |
|--|------------|
| C.3. Absence d'interférences dues à la présence de sang dans les selles..... | 70 |
| C.4. Non contamination entre échantillons | 71 |
| C.5. Précision..... | 71 |
| C.6. Robustesse..... | 72 |
| C.7. Quantification virale..... | 72 |
| D. Conclusion..... | 74 |
| 1.2. Évaluation d'un test antigénique immunochromatographique..... | 76 |
| A. Objectifs..... | 76 |
| B. Matériel et méthodes..... | 76 |
| C. Résultats..... | 77 |
| C.1. Détection moléculaire et génogroupes..... | 77 |
| C.2. Concordance entre le test antigénique et la RT-PCR développée..... | 77 |
| C.3. Performance du test antigénique..... | 78 |
| D. Conclusions..... | 79 |
| 2. Investigation d'une épidémie de gastro-entérites à norovirus en milieu hospitalier..... | 81 |
| 3. Étude de l'épidémiologie clinique et moléculaire des norovirus au Burkina Faso..... | 89 |
| 4. Étude des infections à norovirus chez les patients transplantés rénaux..... | 101 |
| IV. Discussion..... | 123 |
| 1. Diagnostic microbiologique des norovirus..... | 125 |
| 1.1. Mise au point d'une RT-PCR quantitative en temps réel..... | 125 |
| 1.2. Evaluation d'un test antigénique immunochromatographique..... | 129 |
| 2. Investigation d'une épidémie de gastro-entérites à norovirus en milieu hospitalier..... | 130 |
| 3. Étude de l'épidémiologie clinique et moléculaire des norovirus au Burkina Faso..... | 134 |
| 4. Étude des infections à norovirus chez les patients transplantés rénaux..... | 136 |

| | |
|---|-----|
| V. Conclusion | 139 |
| VI. Perspectives | 143 |
| VII. Références Bibliographiques | 149 |

Acronymes et symboles

| | |
|---------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| CHU | Centre Hospitalier Universitaire |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| CNR | Centre National de Référence |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| FIRS | Fonds d'Investissement pour la Recherche Scientifique |
| FUT2 | α -1,2-fucosyl-transférase |
| G | Génogroupe |
| GII.4 | Norovirus génogroupe II génotype 4 |
| HGBA | <i>Histo Blood Group Antigens</i> |
| HICPAC | <i>Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee</i> |
| IC | Intervalle de confiance |
| IFREMER | Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer |
| INAMI | Institut National d'Assurance Maladie Invalidité |
| Kb | Kilobase |
| MNV | Norovirus murin |
| NoV | Norovirus |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PMA | Propidium monoazide |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcriptase-PCR</i> |
| QCMD | <i>Quality Control for Molecular Diagnostic</i> |
| ULiège | Université de Liège, Liège, Belgique |
| VLP | <i>Virus-Like Particle</i> |
| VIH | Virus de l'Immunodéficience Humaine |

I. Introduction : les norovirus

HUYNEN Pascale. *Les norovirus : qui sont-ils ? Le point sur la question.* Noso-info 2013,17(1):7-12. Revue.

HUYNEN Pascale, MAUROY Axel, MELIN Pierrette, THIRY Etienne. *Les norovirus, ces entéro-pathogènes épidémiques mondiaux méconnus.* Rev Med Liege 2019,74(1):41-46.

1. Historique

Les premiers norovirus (NoV) furent décrits à la fin des années soixante à l'occasion d'une épidémie de gastro-entérites dans une école de Norwalk (Ohio, USA). En 1972, on décrit pour la première fois en microscopie électronique une particule de 27 nm de diamètre, isolée de matières fécales de volontaires sains à qui avait été administré un ultrafiltrat fécal obtenu lors de l'épidémie survenue quatre ans plus tôt. Cette particule fut nommée 'virus de Norwalk', du nom de la ville où il a été découvert (Kapikian 1972).

En 1979 fut créée la famille *Caliciviridae*, qui tire son nom de la forme observée en microscopie électronique de ces virus qui possèdent à leur surface des dépressions en forme de calice (Matthews *et al* 1979) (figure 1).

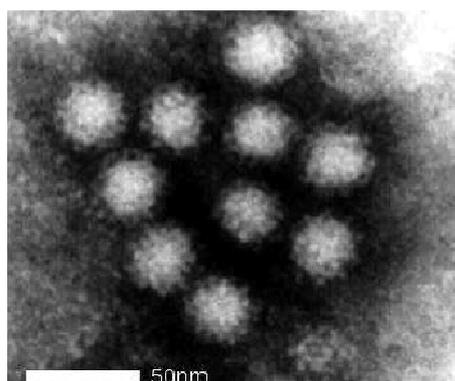


Figure 1. *Caliciviridae* - Norovirus visualisés en microscopie électronique (Adapté de Kohli *et al* 2005).

La description du génome viral ouvrit ensuite la voie à leur diagnostic par les méthodes de biologie moléculaire, conduisant dans les années 1990 à une classification de la famille *Caliciviridae* basée cette fois sur des critères génétiques (Jiang *et al* 1992, Vinjé *et al* 1996). La famille *Caliciviridae* comprend actuellement cinq genres : les *Vesivirus*, *Lagovirus* et *Nabovirus*, pathogènes pour les animaux, et les *Norovirus* et *Sapovirus*, pathogènes pour l'Homme et l'animal (Green *et al* 2000, Mayo *et al* 2002, Banyai *et al* 2018, Leftkowitz *et al* 2018).

2. Caractéristiques virologiques et classification

Les NoV sont des virus à ARN simple brin, non enveloppés, de polarité positive. Leur génome contient approximativement ~7,6 kb de nucléotides et est protégé par une capsidie de symétrie icosaédrique (Green *et al* 2013).

Le genre *Norovirus* comprend 7 génogroupes (G) parmi lesquels les génogroupes I, II et IV sont pathogènes pour l'Homme (Vinjé *et al* 2015). Les souches animales font partie de cette classification, et comprennent des souches porcines, bovines, canines, félines et murines (Scipioni *et al* 2008, Zheng *et al* 2006) (figure 2). Les NoV sont caractérisés par une très grande variabilité génétique, à la base de la classification des souches. Les génogroupes renferment au moins 38 génotypes (Kroneman *et al* 2013), et les génotypes peuvent eux-mêmes contenir plusieurs variants, en particulier le génotype GII.4 (Verhoef *et al* 2008, Mathijs *et al* 2011).

La proximité génétique de certaines souches de NoV humaines et animales soulève la question d'une éventuelle zoonose. Jusqu'à présent, aucune transmission de NoV entre l'homme et l'animal n'a été rapportée.

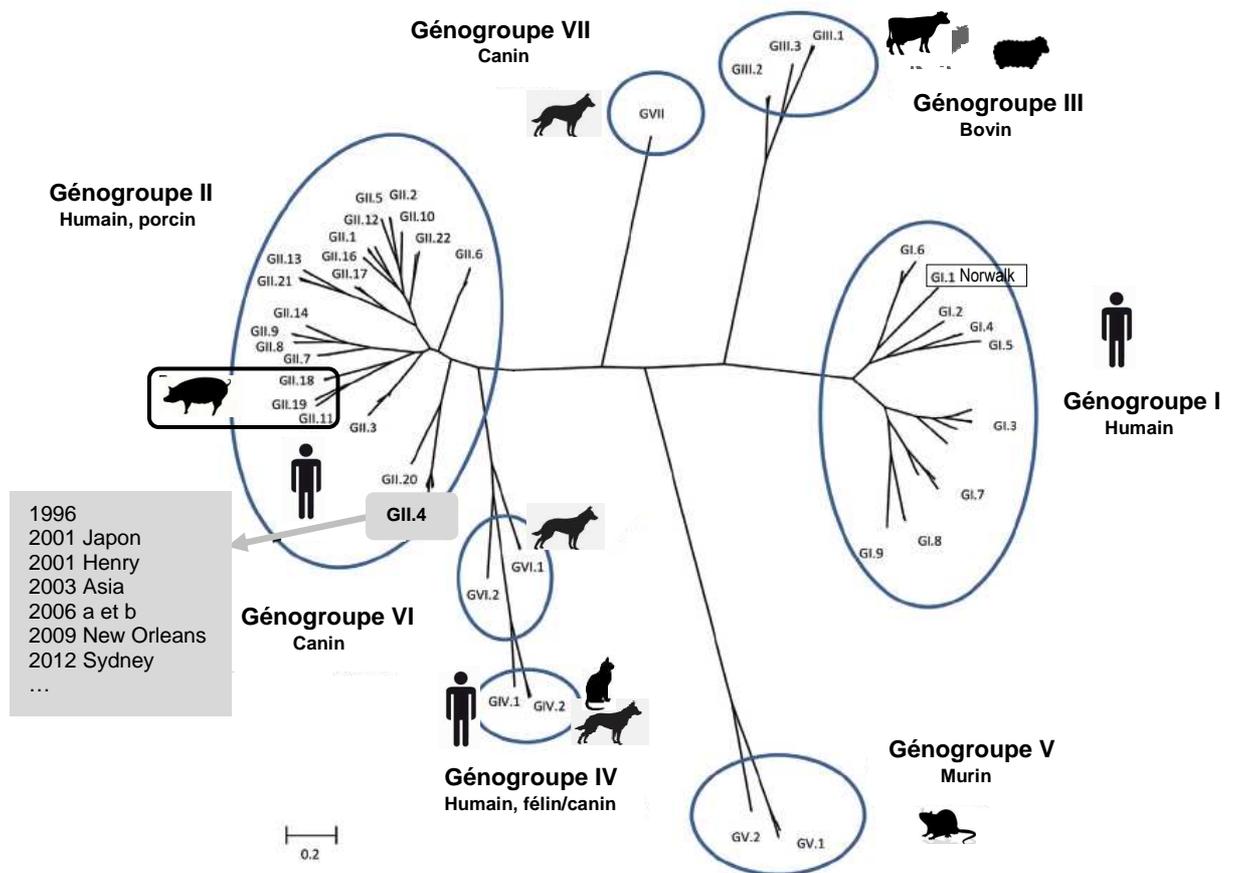


Figure 2. Classification des NoV en 7 génogroupes (GI à GVII) basée sur la diversité des séquences en acides aminés de la protéine de capsid VP1 (adapté de Vinjé 2015).

Les *Open Reading Frame* (ORF ; 'Cadres de Lecture Ouverts') sont au nombre de trois chez les NoV humains, un quatrième ayant été décrit chez le NoV murin (McFadden *et al* 2011). L'extrémité 5' proximale de l'ORF1 code un précurseur de protéines non structurales, dont l'ARN polymérase. L'ORF2 et l'ORF3 codent les composants structuraux du virion, les protéines de capsid majeure et mineure, VP1 et VP2 respectivement.

Les protéines VP1 de la capsid des NoV sont composées de deux domaines majeurs : le domaine conservé S (*interior shell*), qui contient l'ARN et confère à la particule sa stabilité, et le domaine variable P (*protruding domain*), exposé à la surface externe du virus. Ce domaine P est impliqué dans les interactions entre l'hôte et le virus, et présente un haut degré de diversité de séquences corrélé à la grande variabilité antigénique des NoV. Le domaine P est constitué d'un dimère P1/P2. La sous-unité P2 est impliquée dans les interactions avec les cellules de l'hôte (Figure 3).

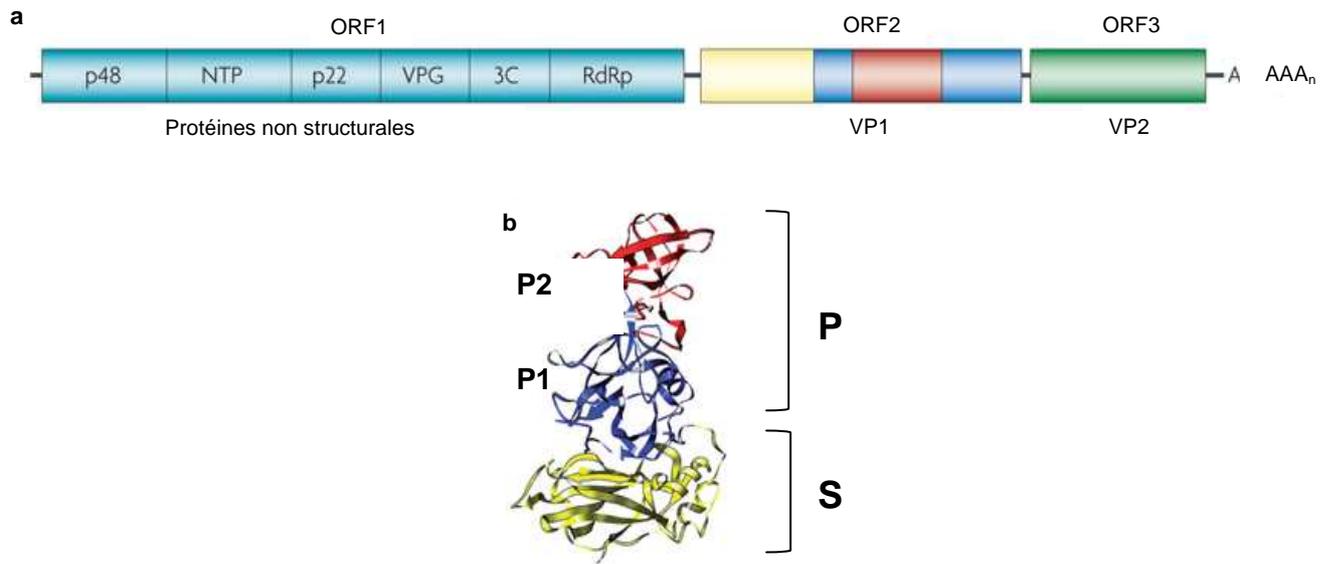


Figure 3. a- Organisation du génome des NoV - b- Structure schématisée de la protéine virale VP1, comprenant les domaines S (en jaune) et P, lui-même subdivisé en sous-domaines P1 (en bleu) et P2 (en rouge) (Adapté de Donaldson *et al* 2010).

3. Multiplication virale et recombinaison

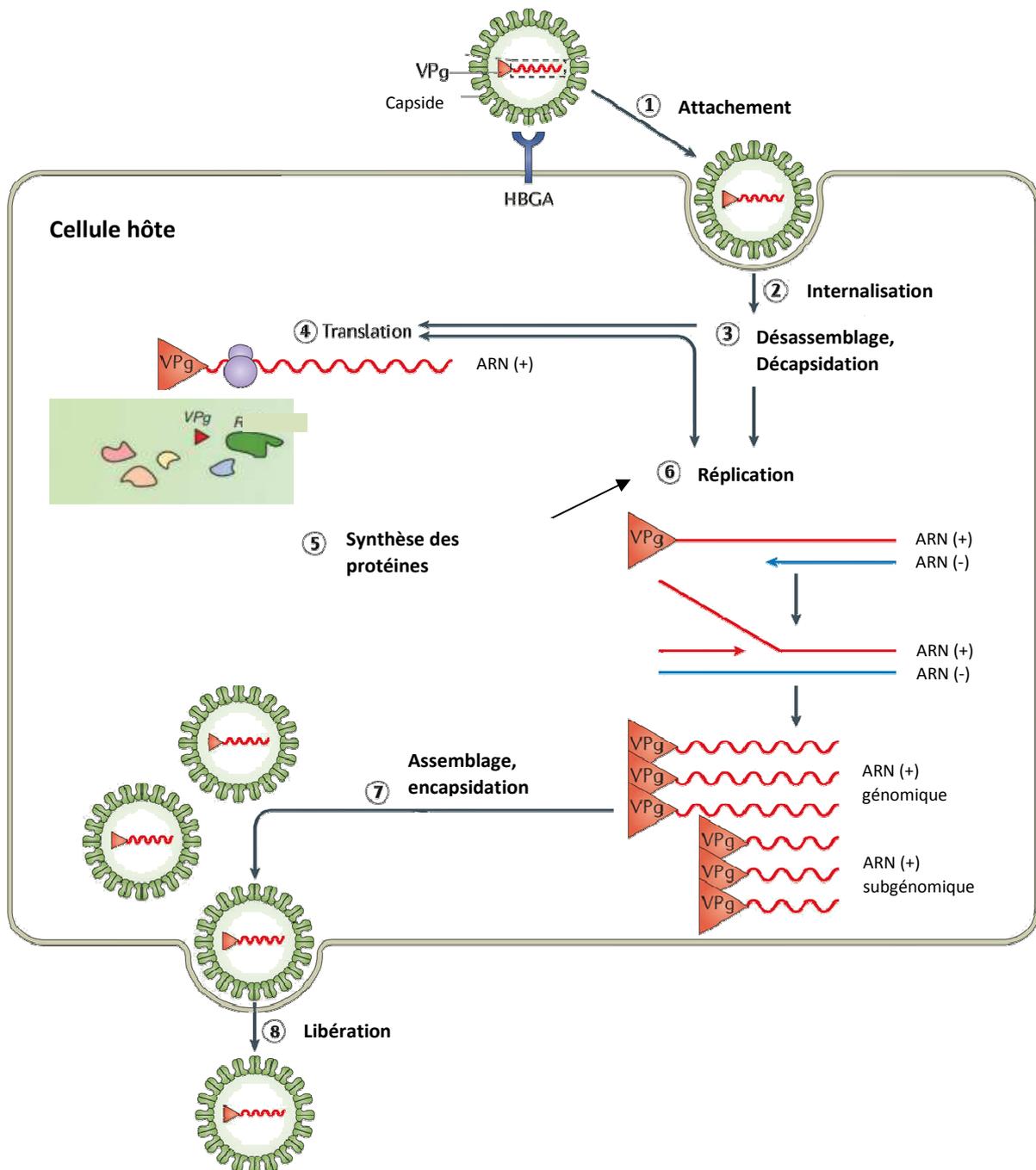


Figure 4. Cycle de répliation des norovirus. Attachement du virion à la cellule hôte par l'interaction de la protéine VP1 du virion et l'antigène de surface HBGA de la cellule (1), suivi d'une internalisation, d'une décapsidation et d'un désassemblage du virion (2 et 3). L'ARN de polarité positive (+) est transcrit et traduit dans le cytoplasme de la cellule hôte. La translation est médiée par des facteurs de translation de l'hôte recrutés par la protéine virale non structurale VPg, qui est liée à l'extrémité 5' du génome (4). Les protéines virales sont ensuite synthétisées (5). Durant la répliation du génome, l'ARN (+) est transcrit en ARN de polarité négative, ARN (-), qui est ensuite utilisé pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN (+) génomiques et subgénomiques (6). Les brins d'ARN (+) subgénomiques contiennent uniquement les séquences ORF2 et ORF3, et sont utilisés pour la production des protéines VP1 et VP2 des NoV. Lors de l'encapsidation (7), les ARN (+) sont assemblés en nouveaux virions, qui sont ensuite relargués de la cellule hôte (8) (adapté de de Graaf *et al* 2016 et de Thorne et Goodfellow 2014).

Les NoV se servent de leur propre ARN polymérase pour se multiplier dans la cellule hôte. Cette polymérase ne disposant pas de fonction correctrice, des mutations surviennent fréquemment lors de la multiplication des NoV, conduisant à une grande diversité génétique des souches de NoV (figure 4) (de Graaf *et al* 2016, Thorne et Goodfellow 2014).

Un autre mécanisme important contribuant à l'évolution continue des NoV au fil du temps et au dynamisme de leur circulation est le phénomène de recombinaison. Ces recombinaisons résultent d'échanges de séquences génomiques virales survenant le plus souvent au niveau de la région conservée de la jonction ORF1/ORF2 entre souches de NoV, et dans une moindre mesure au niveau du gène codant l'ARN polymérase (Bull *et al* 2005, Waters *et al* 2007) (figure 5).

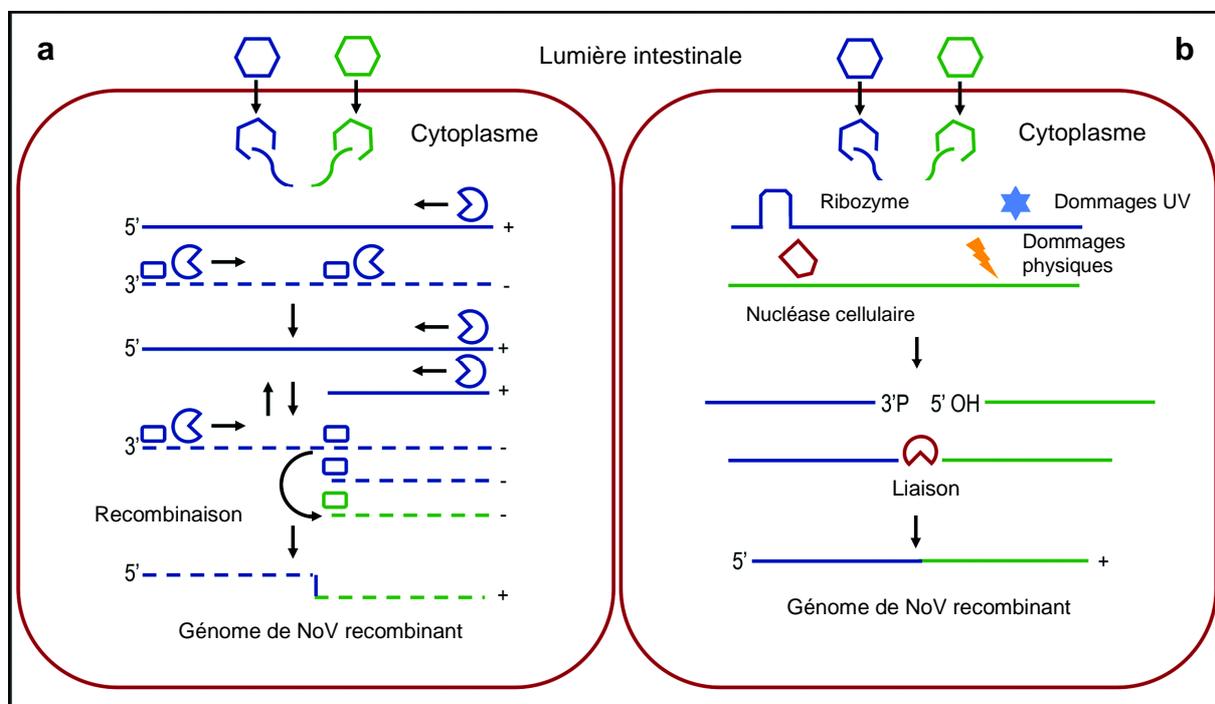


Figure 5. Modèles proposés pour la recombinaison chez les NoV suite à l'infection de la cellule par deux souches de NoV différentes (en bleu et en vert). a- Recombinaison répliquative, à gauche. La recombinaison entre les deux souches survient lors de la réplication. Une partie de l'ARN d'une des deux souches de NoV reste au stade d'ARN subgénomique (dans la région jouxtant l'ORF-1 et l'ORF-2), pour ensuite se dissocier du virus et se recombiner avec l'ARN subgénomique de la souche de NoV co-infectant la cellule. b- Recombinaison non-répliquative, à droite. Les brins d'ARN peuvent être clivés lors de dommages créés par les UV, les agents physiques, l'activité ribozyme ou encore les endoribonucléases cellulaires. Les fragments sont ensuite reliés par une ligase cellulaire pour former un génome de NoV recombinant (adapté de Ludwig-Begall *et al* 2018).

Les souches recombinantes conduisent à des variations génétiques et à l'émergence de nouvelles souches virales qui sont suffisamment différentes que pour impacter la classification phylogénétique des NoV, et également la mise au point de vaccins (Ludwig-Begall *et al* 2018, Jones et Karst 2018, Scipioni *et al* 2008).

Trois types de recombinaisons sont observés chez les NoV : les recombinaisons inter-génogroupes, qui surviennent entre deux génogroupes, par exemple entre les génogroupes I et II (Nayak *et al* 2008) ; les recombinaisons inter-génotypes, entre deux génotypes d'un même génogroupe (de Graaf *et al* 2015, Fu *et al* 2017) ; et les recombinaisons intra-génogroupes qui correspondent à la combinaison de NoV appartenant au même génogroupe au sein de la même espèce (Ludwig-Begall *et al* 2018).

Le génotype GII.4, en particulier, est un génotype largement dominant parmi les NoV et c'est également celui qui renferme le plus grand nombre de nouveaux variants. Des variations génétiques de plus en plus fréquentes ont été mises en évidence au fil de ces dix dernières années au sein de ce génotype, avec l'apparition de nouveaux variants tous les deux à quatre ans. Il a par ailleurs été observé qu'un nouveau variant de GII.4 détecté durant le printemps et l'été correspond à une activité accrue des NoV lors de l'hiver qui suit (Rohayem 2009). L'épidémiologie des souches de NoV du génotype GII.4 mimerait celle du virus influenza, avec une émergence et une propagation rapides et mondiales de nouveaux variants (Siebenga *et al* 2009). Depuis peu, d'autres souches non-GII.4, comme GII.17 et GII.2, ont remplacé les souches GII.4 dans plusieurs pays asiatiques.

Malgré de multiples tentatives, on ne dispose pas pour les NoV humains, à l'heure actuelle, d'un système classique, efficace et aisé, de culture cellulaire *in vitro*, ni d'un modèle animal pour l'étude de leur réplication et de leur pathogenèse telle qu'elle a lieu chez l'Homme (Ettayebi *et al* 2016, Jones *et al* 2014).

Cette difficulté à cultiver les NoV humains impacte la mise au point de vaccins par le biais de la culture cellulaire classique, et a conduit à la synthèse de particules de NoV recombinantes, '*Virus Like Particles*' en littérature anglosaxonne, produites par l'expression et l'assemblage de la protéine majeure de capsid VP1 (Riddle et Walker 2016).

4. Pathogenèse

Lors de l'infection chez l'Homme, les NoV s'attacheraient aux cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal par l'intermédiaire de séquences polysaccharidiques spécifiques des groupes sanguins A, B, O et Lewis (Wilén *et al* 2018, Minton 2018).

Les récepteurs cellulaires des NoV humains permettant l'attachement des particules virales seraient des antigènes tissulaires de groupes sanguins ou HBGA (*Histo-Blood Group Antigens*), exprimés entre autres sur les cellules du tractus gastro-intestinal. Une séquence d'acides aminés situés à la surface distale de la capsid virale adopte une conformation particulière et interagit avec les résidus oligo-saccharidiques des récepteurs HBGA (Schroten *et al* 2016, Liu *et al* 2015) (Figure 6).

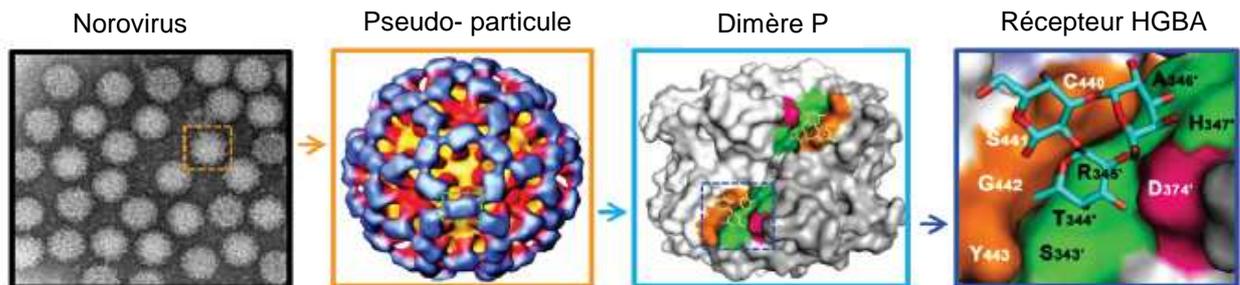


Figure 6. Liaison HBGA. De gauche à droite : NoV visualisés en microscopie électronique, une unité de pseudo-particule (VLP), un dimère P avec l'indication de la zone carbohydre servant d'interface (région colorée), et la structure en forme de cristal des récepteurs HBGA (adapté de Liu *et al* 2015).

Les NoV présentent différents profils de liaison aux récepteurs associés aux groupes sanguins ABO, aux groupes sécréteurs et Lewis (non-sécréteurs).

L'interface de liaison avec le récepteur diffère chez les génogroupes GI et GII par leur structure, leur localisation, leur mode de liaison et par leur composition en acides aminés (Figure 7) (Liu *et al* 2015, Tan *et al* 2009, Tan et Jiang 2010).

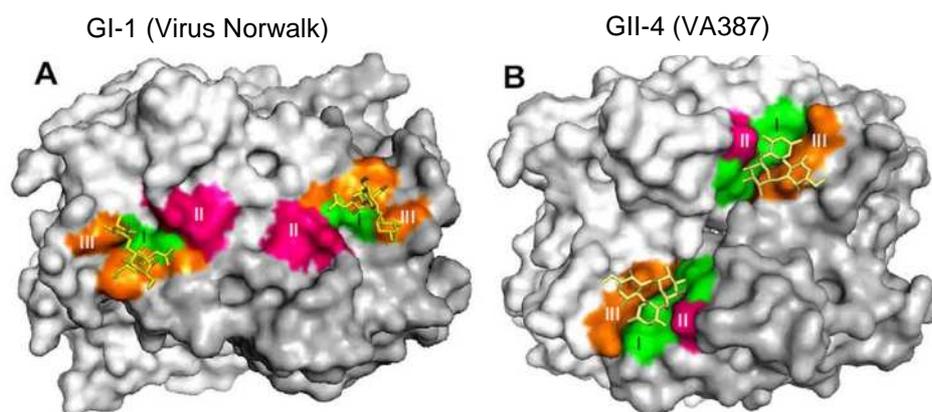


Figure 7. La structure en forme de cristal des récepteurs des virus Norwalk (GI-1) et VA387 (GII-4). A et B : modélisation des surfaces des dimères P (vus du dessus). Les zones du récepteur HBGA sont indiquées en couleur (adapté de Tan *et al* 2009).

Les entérocytes, exprimant dans une importante mesure ces antigènes sanguins, représentent des cellules cibles pour les NoV. En l'absence de modèle animal reproduisant la maladie telle qu'elle a lieu chez l'homme, les informations quant à la pathogenèse et à la physiopathologie des infections à NoV humains émanent initialement d'études réalisées chez des volontaires sains (Graham *et al* 1994, Atmar *et al* 2008).

En comparant un épithélium duodéal sain à un épithélium duodéal infecté par des NoV, l'observation histologique met en évidence des modifications structurales et fonctionnelles, notamment une vacuolisation et une desquamation des cellules épithéliales, une diminution de la résistance de l'épithélium et une réduction de la surface des villosités (Troeger *et al* 2009) (Figure 8). Ces modifications structurales conduisent à une altération de la barrière intestinale, entraînent une malabsorption et de la diarrhée. Un ralentissement de la motricité gastrique est également observé et contribue aux nausées et vomissements (Meeroff *et al* 1980).

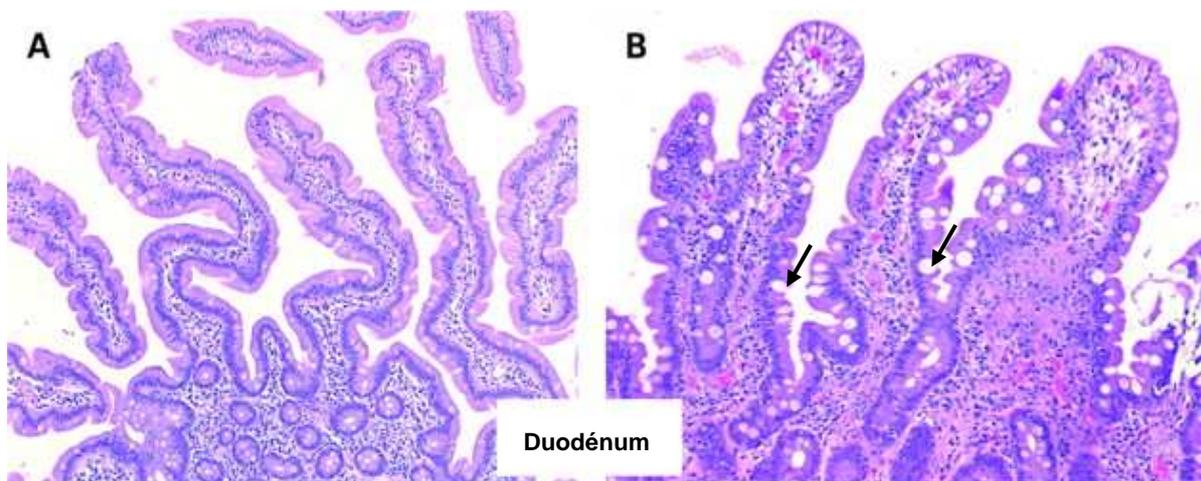


Figure 8. Modifications structurales et fonctionnelles du duodénum lors de l'infection à NoV chez l'homme : vacuolisation et desquamation des cellules épithéliales intestinales (→) (B) par rapport à un duodénum sain (A). Coupes histologiques. (Adapté de Troeger *et al* 2009).

Depuis quelques années, les infections reproduites chez la souris sont étudiées grâce à la découverte du NoV murin (MNV-1) qui se réplique dans des cultures cellulaires dendritiques ou de macrophages (Wobus *et al* 2004). Le modèle murin ne permet cependant pas d'étudier les NoV humain en raison d'une pathogénie différente induite chez la souris et chez l'homme. En effet, l'inoculation de NoV à des souris immunocompétentes n'entraîne aucune symptomatologie, quand l'inoculation à des souris immunodéficientes mène au décès.

Plus récemment, la découverte d'une répllication efficace de souches de NoV dans des organoïdes intestinaux humains préalablement infectés *in vitro* a ouvert la voie vers un modèle d'étude prometteur des NoV humains. Le terme 'organoïde' désigne une culture en trois dimensions, dérivée de cellules reproduisant l'organisation et la fonctionnalité du tissu ou de l'organe spécifique, et de l'hôte duquel il est dérivé. Dans le cas de l'étude des NoV humains, ces organoïdes sont des cultures multicellulaires *in vitro* d'entérocytes matures, dérivés du tissu épithélial de l'intestin grêle humain (Stelzner *et al* 2012, Ettayebi *et al* 2016, Dutta *et al* 2017, Ramani *et al* 2018) (figure 9). Le développement de ces cultures organoïdes *in vitro* représente un nouveau système remarquable pour étudier la pathogenèse des NoV humains et leurs interactions avec l'hôte.

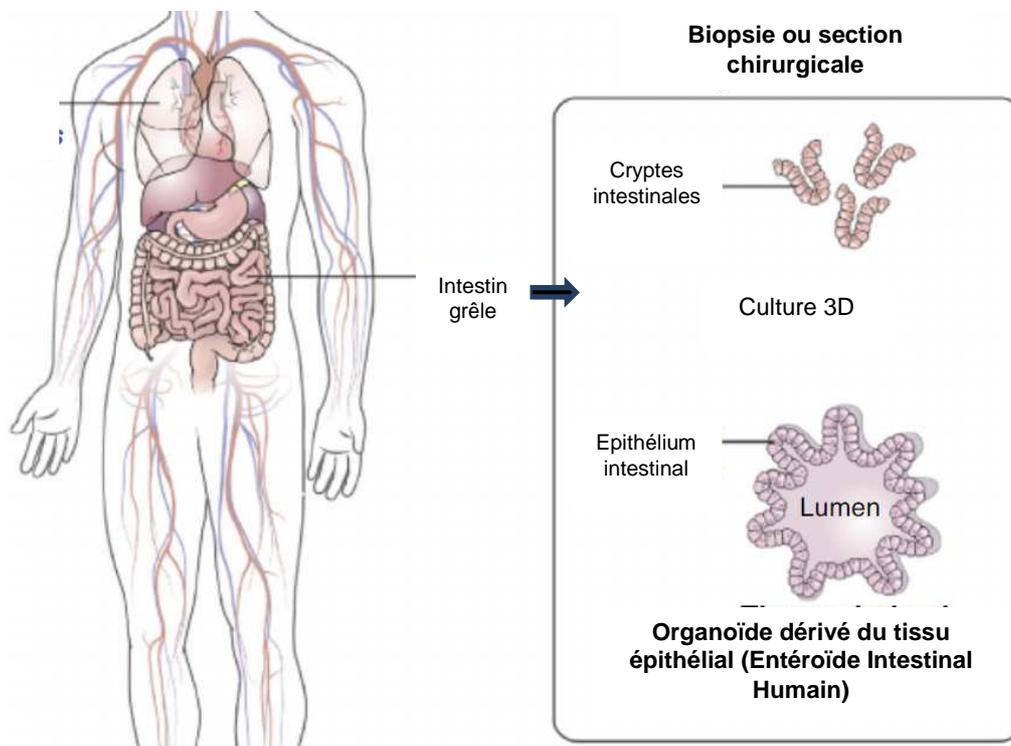


Figure 9. Organoïdes intestinaux humains utilisés pour l'étude de la pathogenèse des norovirus (Adapté de Ramani *et al* 2018).

Les NoV infectent, outre les entérocytes, un type particulier de cellules épithéliales intestinales protubérantes nommées cellules *tuft* (figure 10) en raison de leur morphologie particulière : elles présentent à leur surface des extensions multiples évoquant une touffe de cheveux ('*tuft*' pour 'touffe' en anglais) lors de leur observation en microscopie (Karst et Wobus 2015).

Les cellules *tuft* représentent environ 0,5% de l'épithélium intestinal (Banerjee *et al* 2018). Elles jouent un rôle de sentinelle lors des infections intestinales dues aux parasites et aux helminthes, en produisant des cytokines qui vont informer le système immunitaire, donnant lieu à une réponse immunitaire cellulaire médiée de type 2 (Gerbe et Jay 2016).

Alors que les cellules *tuft* sont peu nombreuses, les découvertes scientifiques indiquent qu'une fois ce type de cellules infectées, celles-ci multiplient rapidement les NoV et donnent lieu à des infections sévères. D'où l'hypothèse selon laquelle les NoV seraient responsables d'infections plus graves, menant à plus de décès dans les pays non industrialisés, en raison des co-infections parasitaires qui y sont plus fréquentes (Wilén *et al* 2018).

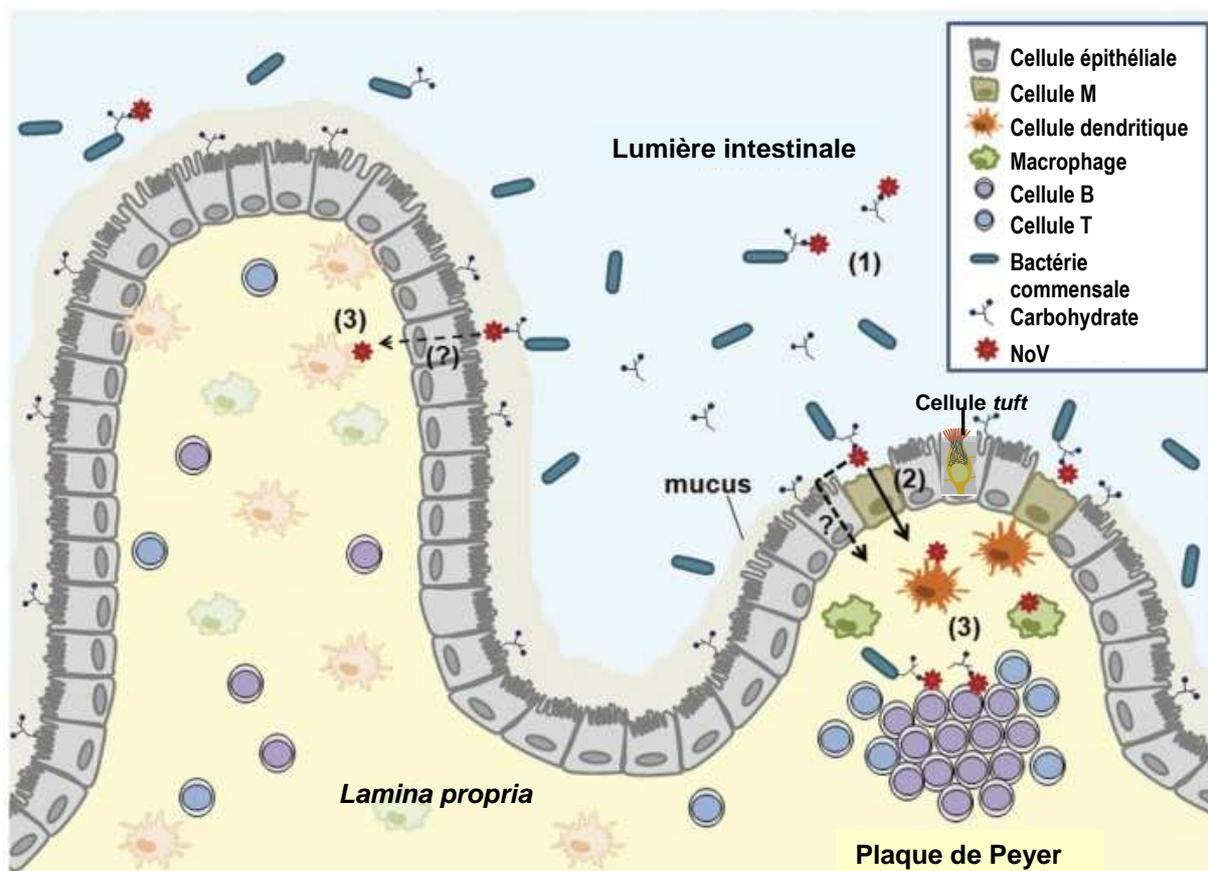


Figure 10. Vue schématique de l'épithélium intestinal. L'épithélium villositaire contient des cellules non-prolifératives, différenciées, incluant les entérocytes et les cellules *tuft*. Les carbohydrates sont exprimés à la surface des entérocytes et sécrétés dans la lumière intestinale. Certaines bactéries peuvent exprimer ces carbohydrates. Les NoV peuvent s'y attacher (1) et être transcytés au travers de la lumière intestinale par l'intermédiaire des cellules M (2). Les NoV peuvent ensuite infecter les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B (3) (Adapté de Karst et Wobus 2015).

5. Norovirus et immunité

Le domaine P de la protéine de capsid VP1 des NoV induit chez l'hôte une réponse immunitaire aussi bien humorale que cellulaire (Fang *et al* 2013). En raison de leur grande diversité génétique et de l'immunité de courte durée conférée à l'hôte suite à une infection à NoV, les réinfections chez un même individu ne paraissent guère étonnantes (Ramani *et al* 2016).

La raison pour laquelle les infections à NoV sont asymptomatiques chez certains individus est par contre moins évidente.

Une première explication réside dans le fait que l'immunité de l'hôte aux NoV humains est tout d'abord basée sur une sensibilité ou une résistance génétique innée à l'infection, liée à la présence ou non d'HGBA qui feraient office de facteurs d'attachement cellulaire requis pour mener à l'infection et à la pathologie clinique (Hutson *et al* 2005, Marionneau *et al* 2002).

Chez les hôtes de génotype HGBA non-sécréteur, l'absence d'expression d'un gène codant une enzyme fucosyl transférase, l' α -1,2-fucosyl transférase (FUT2) leur confère une résistance à certaines souches de NoV, en particulier aux souches GI.1 et à la plupart des souches GII.4. L'association entre l'expression des HBGA et la vulnérabilité de l'hôte à des génotypes spécifiques de NoV est maintenant bien établie (Lindesmith *et al* 2003, Huang *et al* 2005, Banyai *et al* 2018).

D'autre part, même s'il est exact que dans la majorité des cas, l'expression du gène codant la fonction FUT2 est requise lors des infections, d'autres mécanismes peuvent expliquer l'infection de l'hôte par certains variants en l'absence d'HBGA (Ramani *et al* 2016).

Outre les entérocytes, les lymphocytes B ont également été identifiés comme une cible cellulaire pour les NoV humains. L'infection des lymphocytes B par les NoV humains requiert la présence de bactéries entériques exprimant les HBGA, ces bactéries agissant en tant que facteur facilitant l'infection des lymphocytes B par les NoV. En effet, l'expression de ces carbohydrates à la surface de certaines bactéries comme *Enterobacter cloacae* permet aux NoV de s'y attacher et d'être transcytés au travers de la lumière intestinale par l'intermédiaire des cellules M. Les NoV peuvent ensuite infecter les lymphocytes B, mais également les cellules dendritiques et les macrophages (figure 10) (Jones *et al* 2014).

Cette découverte a contribué au développement d'un modèle *in vitro* d'infection pour les NoV humains (figure 9) (Grau *et al* 2017, Jones *et al* 2014, Jones *et al* 2015, Wobus 2018).

Une seconde réponse est apportée par la pathogénèse des NoV, donnant lieu à des infections chroniques asymptomatiques chez certains patients. Des chercheurs ont constaté que les NoV présents à l'intérieur des cellules *tuft* sont dissimulés efficacement aux yeux du système immunitaire, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains patients continuent à excréter les NoV aussi longtemps après la rémission des symptômes. Ces porteurs sains représentent une source potentielle de transmission des NoV, et la compréhension des mécanismes d'échappement des NoV au système immunitaire pourrait conduire à de meilleures méthodes de prévention des épidémies (Wilén *et al* 2018, Minton *et al* 2018).

L'étude des NoV chez des patients plus particulièrement susceptibles de présenter des infections prolongées ou chroniques en raison d'une immunosuppression induite, permet d'objectiver la prévalence des NoV chez ces patients ainsi que la durée d'excrétion des NoV (Green 2014). L'idéal serait de réaliser une étude prospective, et d'étudier les NoV chez les patients symptomatiques mais également asymptomatiques afin de mieux évaluer les risques de transmission virale ; en effet, ces patients fréquentant régulièrement le milieu hospitalier, que ce soit pour des consultations ou des hospitalisations de courte ou de longue durée, pourraient représenter une source sous-estimée de transmission des NoV.

6. Manifestations cliniques

Après une période d'incubation courte de 24 à 72 heures, le tableau clinique classique d'une infection à NoV chez une personne préalablement en bonne santé est celui d'une gastro-entérite aiguë (Glass *et al* 2009). Chez les personnes âgées, la présentation clinique peut toutefois être atténuée : l'infection à NoV peut se présenter sous forme de troubles intestinaux moins francs, si bien qu'elle est parfois confondue avec une affection préalable décompensée, pour n'être diagnostiquée qu'après une anamnèse fouillée.

La complication la plus fréquente est la déshydratation, survenant principalement chez les jeunes enfants et les personnes âgées ou fragilisées par une pathologie intercurrente. Dans nos pays industrialisés, les infections à NoV, sont dans la plupart des cas bénignes, et spontanément résolutive en deux à trois jours, avec toutefois une excrétion un peu plus prolongée du virus après la résolution des symptômes chez les enfants en bas âge et les personnes âgées (Murata *et al* 2007), et une certaine augmentation de la morbidité chez les patients âgés (Hall *et al* 2012, Harris *et al* 2008, Trivedi *et al* 2012). Par contre, en raison de ces complications insuffisamment prises en charge, les infections à NoV sont grevées d'une morbidité et d'une mortalité significatives dans les pays non industrialisés à faibles revenus (Thorne *et al* 2014, Patel *et al* 2008).

Chez les patients immunocompromis, les NoV sont responsables d'infections plus sévères ou prolongées, voire chroniques, avec une excrétion virale pouvant perdurer pendant plusieurs semaines et même plusieurs mois, et de multiples réinfections (Pettrigniani *et al* 2018, Daniel-Wayman *et al* 2018, Henke-Gendo *et al* 2009). Dans cette population en particulier, une augmentation de la mortalité et de la morbidité a été démontrée (Bok *et al* 2013, Roddie *et al* 2009, Westhoff *et al* 2009). C'est le cas chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou transplantés, et également chez les patients infectés immunocompromis dans le décours d'une infection par le VIH (Seid *et al* 2018, Wingfield *et al* 2010, Silva *et al* 2010, Rodríguez-Guillén *et al* 2005).

7. Diagnostic

Un épisode aigu de diarrhée non sanglante, avec ou sans vomissements, doit d'emblée faire évoquer une origine virale. Outre la prise en charge individuelle des patients et la surveillance épidémiologique, le diagnostic étiologique d'une gastro-entérite virale permet d'estimer la contagiosité.

En pratique, devant une épidémie de gastro-entérites dont l'origine bactérienne a été écartée, des critères cliniques proposés par Kaplan en 1982 peuvent être utiles pour évaluer la probabilité que le NoV en soit l'agent causal (Kaplan *et al* 1982). Ces critères, quelque peu revus en 2006 et assez prédictifs lorsqu'ils sont tous présents, sont : des vomissements (souvent en salve) dans >50% des cas, une diarrhée aqueuse non sanglante, une durée de la maladie et une période d'incubation courtes, et une atteinte des patients mais également du personnel (Turcios *et al* 2006).

Les épidémies à NoV sont difficiles à contrôler et leur impact socio-économique peut se révéler important. Ces coûts peuvent être limités par un diagnostic précoce permettant l'instauration rapide de mesures de contrôle efficaces visant à enrayer l'épidémie.

Les méthodes de diagnostic microbiologique des infections à NoV restent à l'heure actuelle un défi en raison de la variabilité continue des souches (Zhuo *et al* 2017).

La méthode diagnostique de choix est la détection génomique du virus par méthode de biologie moléculaire dans les matières fécales, *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* ou RT-PCR, utilisant des amorces visant la région de l'ORF1 codant l'ARN polymérase (Stals *et al* 2009, Stals *et al* 2012). De par sa sensibilité et sa spécificité optimales, la RT-PCR est considérée comme la méthode de référence pour la détection des NoV humains. Le seul écueil de cette technique est son inaptitude à attester du caractère infectieux ou non des particules virales mises en évidence dans les prélèvements.

Les techniques de RT-PCR actuellement utilisées pour la détection des NoV dans les échantillons humains sont des méthodes commerciales, pour la plupart automatisées, et détectent de manière qualitative (ce qui signifie une réponse en termes de 'présence' ou 'absence' de génome viral dans le prélèvement) et indifférenciée les génogroupes I et II des NoV les plus fréquemment rencontrés. En quelques années, les avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire sont remarquables, alliant simplification des étapes à réaliser et diminution du temps d'analyse de l'échantillon, avec un résultat disponible dans l'heure à l'aide de certaines méthodes qualifiées de 'RT-PCR rapides' (Rovida *et al* 2016).

Depuis quelques années, de nouvelles méthodes de biologie moléculaire permettent de détecter, en sus des NoV, différents entéro-pathogènes (virus, bactéries, parasites) en une seule et même réaction (McHugh *et al* 2018).

Outre la mise en évidence des NoV dans les échantillons, pour tout laboratoire s'intéressant à l'étude d'autres abords des NoV, il est indispensable de disposer d'une méthode RT-PCR plus performante que les méthodes commerciales présentes sur le marché, ces dernières ne permettant pas la détection du génogroupe IV et une quantification virale dans les échantillons (McHugh *et al* 2018). Ces méthodes développées permettent en sus d'envisager une caractérisation moléculaire de la souche virale isolée par un séquençage des produits d'amplification et la comparaison à une banque de données (Stals *et al* 2012), et de contribuer ainsi à l'amélioration des connaissances épidémiologiques des souches circulantes.

A l'heure actuelle dans notre pays, le remboursement de la RT-PCR n'est pas octroyé par l'INAMI, et les méthodes de biologie moléculaire sont onéreuses et représentent dès lors un coût élevé pour le patient. De plus, ces techniques ne sont pas accessibles à tous les laboratoires en raison des équipements sophistiqués qu'elles requièrent.

Un autre type de méthode consiste à détecter les antigènes viraux de NoV dans les matières fécales par des tests immuno-enzymatiques. A partir des années 2000, des méthodes immuno-enzymatiques en microplaques permettant de détecter les antigènes des NoV GI et GII de manière combinée étaient disponibles. Après une lecture du résultat en densité optique, ces tests commerciaux fournissaient un résultat en 4 à 6 heures à l'aide de méthodes peu automatisées, et étaient adaptés à la détection de NoV dans un grand nombre d'échantillons testés dans une même série. En raison du temps et de l'expertise requis, la réalisation des analyses au fur et à mesure de l'arrivée des échantillons n'était pas envisageable avec ce type de technique (Siqueira *et al* 2011, Wilhelmi *et al* 2007, Dimitriadis *et al* 2006).

En pratique courante, on a actuellement recours à des tests immunochromatographiques utilisables à l'unité, plus communément appelés 'tests rapides' car ils fournissent un résultat endéans la demi-heure, ce qui présente un intérêt non négligeable dans la prise en charge des épidémies de gastro-entérites aiguës. Les antigènes de NoV peuvent être retrouvés dans les échantillons jusqu'à 15 jours après l'épisode infectieux. La détection antigénique ne nécessite aucun équipement, rendant cette méthode plus facile à implémenter dans un laboratoire de routine et avec un coût moindre pour le patient. Les tests de détection rapide sont très spécifiques, mais affichent une sensibilité trop faible pour être utilisés seuls dans le diagnostic des cas sporadiques. Toutefois, dans un contexte épidémique, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques spécifiques aux NoV (Khamrin *et al* 2008, Thongprachum *et al* 2010), et ce pour autant qu'un minimum de 6 patients symptomatiques soient testés, afin d'accroître la sensibilité de la méthode (MacCanel *et al* 2011).

Il est important pour un laboratoire hospitalier de disposer de ce type d'outil diagnostique antigénique rapide et spécifique, permettant d'identifier précocement un début d'épidémie à NoV sans avoir nécessairement recours à la technologie RT-PCR.

Un Centre de Référence Belge des NoV (Sciensano, Bruxelles) a été créé en Belgique en 2012 et contribue à l'étude épidémiologique des NoV en Belgique en confirmant les cas d'infections à NoV suspects dans le cadre d'épidémies et en caractérisant les souches isolées.

La sérologie infectieuse n'a pas sa place dans le diagnostic étiologique d'une gastro-entérite virale aiguë. Dans le cas précis des infections à NoV, le dosage des anticorps anti-NoV peut être réalisé par des méthodes immuno-enzymatiques utilisant des pseudo-particules de NoV. Ce dosage n'est pas disponible dans les laboratoires de diagnostic, et son usage est réservé aux études rétrospectives et de séroprévalence des NoV. Les concentrations d'anticorps mesurées ne sont par ailleurs pas corrélées à la sensibilité ou à la résistance de l'hôte à l'infection, puisque ces méthodes mesurent les anticorps qui se sont simplement liés aux particules lors de l'analyse (Banyai *et al* 2018). Le rôle protecteur de l'immunité humorale réside dans la production d'anticorps capables d'entraver l'attachement des NoV aux HBGA. Chez les individus 'sécréteurs', la présence d'une concentration élevée de ce type d'anticorps dans le sérum, préalablement à l'infection, est corrélée à un risque d'infection moindre vis-à-vis de certaines souches de NoV (Atmar *et al* 2015).

Les méthodes immuno-enzymatiques dosant les anticorps bloquant les HBGA mesurent en quelque sorte la fonctionnalité des anticorps. La possibilité de doser des anticorps fonctionnels corrélés à la protection immunitaire facilite l'évaluation de l'efficacité des vaccins nouvellement développés contre les NoV (Malm *et al* 2014, Reeck *et al* 2010).

8. Epidémiologie

8.1. Voies de transmission

La voie de transmission des NoV est féco- orale, principalement lors des contacts directs (80% des cas) ou indirects par l'intermédiaire de l'environnement contaminé (figure 11). Les aérosols formés lors des vomissements peuvent par ailleurs représenter un autre mode de transmission qui accélérera la propagation des virus dans les collectivités (Ludwig-Begall *et al* 2018, Mathijs *et al* 2012).

Les cas les plus rapportés et les plus médiatisés concernent les infections lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, encore appelées toxi-infections alimentaires collectives, donnant lieu à des épidémies qui peuvent avoir un impact considérable lorsqu'elles ont lieu dans des collectivités confinées, comme c'est le cas dans les hôpitaux, les maisons de repos, les crèches, les écoles, les grands rassemblements (festivals, sports,...), les camps de vacances ou encore les bateaux de croisière (Hall *et al* 2014).

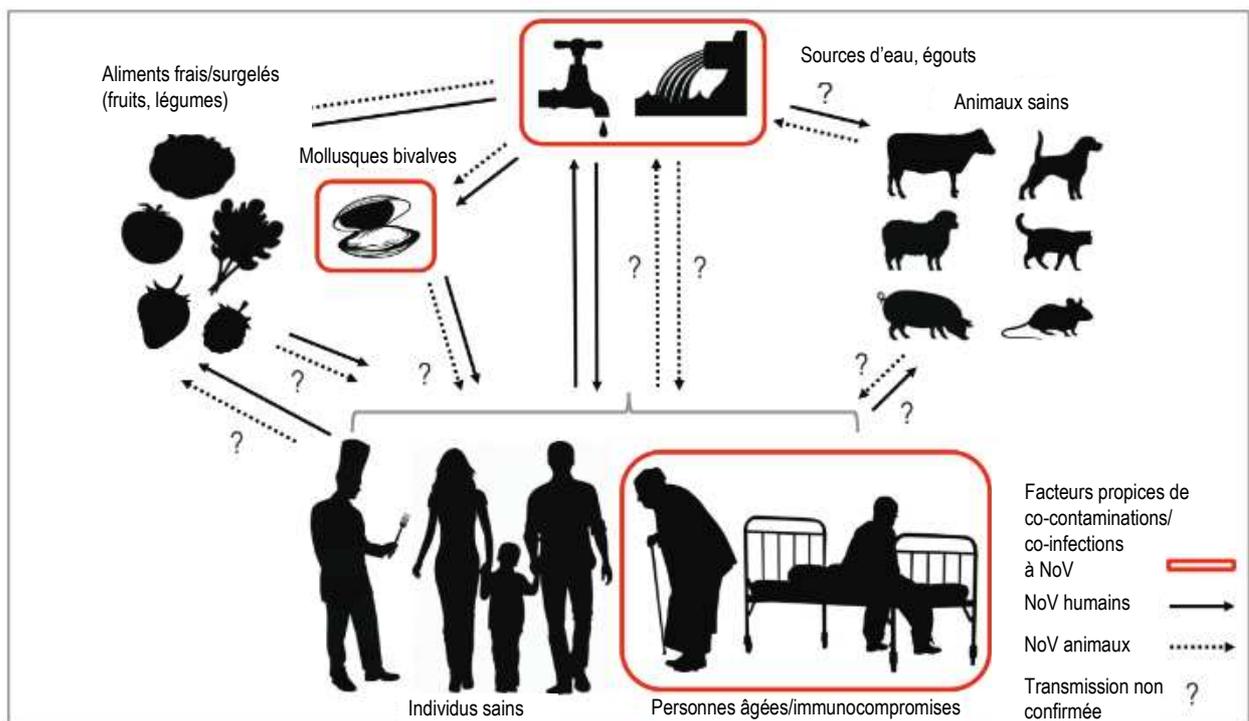


Figure 11. Voies de transmission et de dispersion des NoV avec, encadré en rouge, les facteurs propices à la concentration de NoV favorisant les co-contaminations et les co-infections avec de multiples souches de NoV. Ces facteurs propices sont principalement les eaux stagnantes et les eaux usagées, ainsi que les mollusques bivalves (adapté de Ludwig-Begall *et al* 2018).

De nombreux aliments peuvent être incriminés dans les infections alimentaires à NoV et peuvent être responsables d'épidémies touchant des milliers de personnes. Ces aliments sont contaminés soit par un environnement hydrique souillé (lavage de denrées, irrigation de légumes ou de fruits consommés crus, coquillages agissant comme un véritable filtre marin), soit lors de leur manipulation par des personnes infectées, symptomatiques ou non (Le Guyader *et al* 2006, Le Guyader *et al* 2008, Schaeffer *et al* 2018, Shao *et al* 2018, Malek *et al* 2009). Ce mode de transmission serait responsable de plus de 60% des épidémies d'origine alimentaire (Koopmans *et al*, 2004), dont on connaît la grande ampleur.

Le dernier exemple médiatique en date est celui des Jeux Olympiques de Pyeongchang en février 2018, au cours desquels 1200 agents de sécurité ont été infectés, mobilisant plusieurs centaines de militaires pour les remplacer. L'épidémie s'est par la suite largement et rapidement propagée, infectant plus de 200 athlètes en quelques jours seulement (John 2018).

Un autre exemple, mémorable bien que d'ampleur moindre, est celui du restaurant danois 'Noma', sacré meilleur restaurant du monde à quatre reprises : en 2013, 63 convives furent infectés lors d'une même soirée gastronomique suite à la contamination des aliments par un membre du personnel infecté (Forbes 2013).

En dehors des infections toxi-alimentaires, bien que la transmission de personne à personne soit le plus souvent incriminée, le point de départ des épidémies à NoV ne peut pas être identifié, l'introduction du virus dans la collectivité se faisant par une personne qui excrète le virus, qu'elle soit symptomatique ou non. Les transmissions virales sont amplifiées par les contaminations féco-orales directes mais aussi indirectes, et par une configuration d'autant plus confinée des lieux.

8.2. Répartition démographique, géographie et impact socio- économique

Les NoV sont actuellement reconnus comme étant la cause majeure de gastro-entérites non bactériennes sporadiques et épidémiques au niveau mondial, et la première cause d'infections d'origine alimentaire.

Les NoV infectent les personnes de tous âges (Dewey *et al* 2018, Banyai *et al* 2018). Chez les enfants de moins de 5 ans, bien que le rotavirus reste actuellement la seconde cause de gastro-entérites virales, force est de constater que les NoV sont en passe de devenir la première cause dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été introduite (Rimoldi *et al* 2011).

Dans les pays où elle a été étudiée, la séroprévalence des NoV est élevée. Elle croît avec l'âge d'autant plus rapidement que le revenu du pays est faible et peut dépasser largement

les 90% à l'âge adulte (Thorn *et al* 2018, Son *et al* 2013, Parker *et al* 1995, Nicollier-Jamot *et al* 2003, Van Beek *et al* 2016).

Une saisonnalité hivernale des infections à NoV est habituellement observée sous les climats tempérés, avec un pic d'incidence d'octobre à avril et une prédominance durant les mois les plus froids de l'année (Ahmed *et al* 2013). Bien que nous ne disposions à l'heure actuelle que de peu d'explications à ce sujet, la compréhension de la dépendance saisonnière des infections à NoV représenterait une étape importante vers la compréhension de leur épidémiologie, permettant d'implémenter des mesures de surveillance et de contrôle efficaces (Wang *et al* 2018, Rohayem 2009).

Les caractéristiques des NoV les rendent très contagieux et facilitent leur propagation lors des épidémies dans les collectivités, qu'elles soient communautaires ou nosocomiales.

Ce sont :

- Une survie prolongée dans l'environnement où ils peuvent persister durant plusieurs jours (Duizer *et al* 2004),
- Une résistance relative à l'inactivation : résistance aux valeurs extrêmes de pH, aux désinfectants usuels, aux concentrations de chlore utilisées pour le traitement de l'eau potable (Zonta *et al* 2016a),
- Une thermo-résistance (-20 à +60°C) (Zonta *et al* 2016b, Glass *et al* 2009),
- Une charge virale excrétée élevée (plusieurs millions de virions par gramme de selles) et une dose infectieuse faible estimée inférieure à 100 virions (Robilotti *et al* 2015, Atmar *et al* 2008, Teunis *et al* 2008),
- Une immunité de courte durée (quelques mois à quelques années) suite à l'infection, autorisant dès lors les réinfections,
- L'existence de formes asymptomatiques,
- Une excrétion virale parfois prolongée assortie de charges virales élevées (Sukhrie *et al* 2010).

Dans les pays industrialisés, l'impact socio-économique des épidémies à NoV est considérable, lié au taux d'attaque élevé (plus de 50%) et aux conséquences qui en découlent (absentéisme du personnel, fermeture d'écoles et de salles d'hospitalisation, allongement des durées d'hospitalisation des patients, ...).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a positionné les NoV comme premier agent causal d'infections et de décès liés à une diarrhée d'origine alimentaire. Selon leurs estimations les NoV sont, chaque année, responsables de 684 millions d'épisodes de diarrhée infectieuse et de 212 000 décès, tous âges et modes de transmission confondus (Barsch *et al* 2016).

D'où l'importance de mieux caractériser l'implication de ces virus dans les collectivités, et plus particulièrement dans des institutions comme le milieu hospitalier où l'état de santé des patients avant l'infection à NoV est souvent déjà altéré. Seule une étude relative à une épidémie survenue dans une salle d'hospitalisation belge a été publiée jusqu'à présent (Verbelen *et al* 2004).

De nombreuses études portant sur l'épidémiologie moléculaire des NoV ont été et sont réalisées dans les pays industrialisés. En ce qui concerne les données belges, une étude de prévalence étalée sur une décennie chez plus de 300 patients du Nord du pays présentant une gastro-entérite aiguë a mis en évidence la présence de NoV chez 18,5% des patients (Wollants *et al* 2015).

Les données sont par contre moins étoffées voire absentes pour bien des pays non ou peu industrialisés, notamment en raison d'un niveau socio-économique ne permettant pas le diagnostic des infections à NoV (da Silva *et al* 2016, Kabue *et al* 2016). L'impact des infections dans ces régions du globe est donc moins connu et est probablement sous-estimé (Bartsch *et al* 2016).

Prenons le continent africain par exemple : les études locales, nationales et régionales relatives à l'épidémiologie et à la diversité moléculaire des NoV font clairement défaut (Mans *et al* 2016).

Il serait dès lors intéressant et contributif d'étudier la prévalence et l'épidémiologie moléculaire des NoV dans un de ces pays.

9. Prévention des épidémies

L'élément clé face aux infections à NoV est de limiter leur transmission. Pour ce faire, une hygiène des mains adéquate (lavage des mains au savon, désinfection à l'aide d'une solution hydro-alcoolique), la limitation des contacts avec les personnes infectées et une désinfection des surfaces contaminées à l'aide de solutions efficaces contre les NoV sont les piliers de base pour prévenir les infections à NoV et contrôler leur propagation (Banyai *et al* 2018, Liu *et al* 2010).

En cas d'épidémie, l'adhésion aux mesures d'hygiène doit être renforcée, particulièrement en milieu hospitalier ou de soins, où des mesures supplémentaires doivent être prises. Le personnel de même que les patients et les visiteurs doivent être informés. Les patients infectés devraient être isolés ou cohortés, et les visites et les déplacements des patients limités. Idéalement le personnel soignant devrait être dédié à la salle concernée, et le

personnel infecté devrait être écarté durant au minimum 48 heures après la fin des symptômes. Ces éléments paraissent évidents en théorie, mais sont souvent bien difficiles à mettre en œuvre sur le terrain. Dans tous les cas, une collaboration optimale entre les salles d'hospitalisation, l'équipe d'hygiène hospitalière et le laboratoire d'analyses est indispensable.

10. Traitement et vaccin

Comme pour la plupart des gastro-entérites aiguës, il n'existe pas de thérapeutique spécifique pour traiter une infection à NoV. Le traitement symptomatique consiste en une réhydratation et une correction des désordres électrolytiques.

Des arguments tant économiques qu'en termes de Santé Publique sont en faveur du développement d'un vaccin efficace contre les NoV. La diversité antigénique des NoV, l'absence d'un modèle de culture *in vitro* robuste des NoV humains, le manque d'immunité protectrice à long terme et l'absence de modèle animal reproduisant la maladie telle qu'elle a lieu chez l'Homme et l'impossibilité actuelle de corrélérer de façon concluante un taux d'anticorps circulant avec une protection vaccinale représentent les obstacles majeurs à l'élaboration d'un vaccin efficace (Ramani *et al* 2016, Robilotti *et al* 2015, Atmar *et al* 2011).

Plusieurs stratégies vaccinales sont en développement et ont démontré une certaine efficacité dans des études réalisées chez l'Homme (Kim *et al* 2018, Riddle et Walker 2016). Les vaccins actuellement à l'étude utilisent soit des particules VLP, antigéniquement et structurellement proches des virions de NoV mais dépourvues de matériel génomique, soit des particules formées par l'auto-assemblage du domaine P de la protéine de capsid de NoV, soit un virus recombinant basé sur un virus vecteur ayant inséré le gène de capsid de NoV (Lucero *et al* 2018, Hallowell *et al* 2018, Atmar *et al* 2011, Bernstein *et al* 2015).

Des études d'efficacité vaccinale en sont au stade d'évaluation clinique, mais aucun vaccin efficace contre les NoV n'est, à l'heure actuelle, prêt à être commercialisé. Jusqu'à présent, toutes les études ont été menées chez des adultes en bonne santé (Atmar *et al* 2016). Les voies d'administration intranasale et orale ont été testées, mais un vaccin intramusculaire se montrerait plus efficace, éventuellement combiné avec un vaccin contre l'hépatite E ou le rotavirus (Xia *et al* 2016, Sundararajan *et al* 2015, Treanor *et al* 2014, Ramirez *et al* 2012). La question quant à la capacité des vaccins à produire une immunité durable mais également efficace contre les différentes souches de NoV, reste sans réponse (Atmar *et al* 2011, Banyai *et al* 2018). Au vu des connaissances actuelles sur les NoV et des résultats

des premières études cliniques menées, le vaccin nécessiterait d'être polyvalent, combinant au moins un type de VLP des génogroupes I et II (Lindersmith *et al* 2015, Czako *et al* 2015, Rouhani *et al* 2016). De plus, en raison de l'apparition de nouvelles souches de NoV au fil du temps et du manque d'immunité à long terme, il serait probablement nécessaire de revacciner au bout d'un certain nombre d'années, avec le risque d'une potentielle évolution virale en réponse à la vaccination de la population.

La possibilité, depuis peu, d'étudier la pathogenèse et le tropisme cellulaire de NoV humains sur de nouveaux modèles de culture *in vitro* comme les organoïdes intestinaux humains représente une avancée prometteuse pour le développement de vaccins en permettant de tester leur efficacité, et ouvre une porte vers la possibilité de produire des vaccins vivants atténués.

Quant au choix des populations cibles à vacciner, la question reste ouverte. Les travailleurs des soins de santé et les personnes manipulant les denrées alimentaires pourraient en faire partie dans la mesure où ces personnes, une fois infectées, sont à haut risque de transmission des NoV (Yang *et al* 2018). Par contre, l'efficacité vaccinale paraît moins évidente chez des entités plus fragiles telles que les enfants, les personnes âgées et les patients immunocompromis (Hallowell *et al* 2018, Aliabadi *et al* 2015).

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les épidémies de norovirus sont de plus en plus fréquentes dans nos hôpitaux et occasionnent quelques fois la fermeture temporaire d'unités d'hospitalisation.

Ces épidémies n'épargnent pas les soignants qui peuvent à leur tour contaminer les patients et entretenir l'épidémie. Ce sont d'ailleurs souvent les soignants malades qui nous mettent la puce à l'oreille et qui nous font rapidement penser à cet agent pathogène.

La moindre suspicion d'infection à norovirus doit nous faire réagir sans attendre car il est primordiale de mettre en place rapidement les mesures de prévention spécifiques liées aux propriétés physiques du virus et sans en attendre l'identification.

Les norovirus : qui sont-ils ? Le point sur la question

Dr Pascale Huynen, MD, Chef de Clinique

Service de Microbiologie Médicale, CHU de Liège (Belgique)

Historique

Le premier norovirus (NoV) fut découvert en 1968 à l'occasion d'une épidémie de gastro-entérites dans une école de Norwalk (Ohio, USA). En 1972, on décrit pour la première fois en microscopie électronique une particule de 27 nm de diamètre, isolée de matières fécales de volontaires à qui avait été administré un ultrafiltrat fécal obtenu lors de l'épidémie survenue quatre ans plus tôt. On nomma cette particule « virus de Norwalk », du nom de la ville où il a été découvert⁽¹⁾. Ces particules virales ont ensuite été classées sur base de critères morphologiques, et reprises sous le vocable de « Petits Virus de Structure Arrondie ».

En 1979 fut créée la famille *Caliciviridae*, qui tire son nom de la forme observée en microscopie électronique : les virus de cette famille possèdent à leur surface des dépressions en forme de calices (Figures 1 et 2).

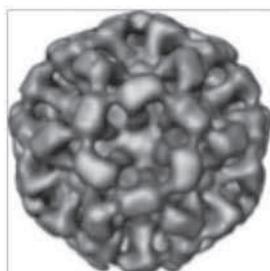


Figure 1 : Modèle de Norovirus (source : Emory edu)

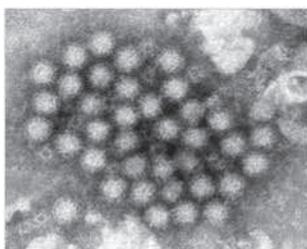


Figure 2 : Norovirus. Observation au microscope électronique (source : CDC, Charles D Humphrey)

La description du génome viral a représenté une étape importante dans la connaissance de ces virus non cultivables, et a ouvert la voie à leur diagnostic par les méthodes de biologie moléculaire. Si bien qu'en 1995 a été amplifié pour la première fois le génome viral du virus de Norwalk, conduisant en 1998 à une classification de la famille *Caliciviridae* basée cette fois sur des critères génétiques. La famille *Caliciviridae* comprend quatre genres : les Vesivirus et Lagovirus, pathogènes pour les animaux, et les Norovirus et Sapovirus, pathogènes pour l'Homme et l'animal.

Classification

Le genre Norovirus comprend 5 génogroupes (G) parmi lesquels les génogroupes I, II et IV sont pathogènes pour l'Homme. Les norovirus sont caractérisés par une très grande variabilité aboutissant à la définition de plusieurs génotypes. Ainsi pour les génogroupes I et II, les plus importants chez l'homme, au moins 8 et 21 génotypes respectivement ont été caractérisés. Les génotypes sont numérotés dans l'ordre de leur découverte, et portent le nom de la ville dans laquelle ils ont été décrits pour la première fois. C'est ainsi que le virus de Norwalk est le premier génotype du génogroupe 1 (GI.1). Les NoV animaux font partie de cette classification, dans laquelle on retrouve des souches porcines, bovines et murines⁽²⁾ (Figure 3).

Parmi les génotypes de NoV, le GI.4 est le principal agent étiologique des épidémies de gastro-entérites virales d'origine alimentaire à travers le monde.

Les NoV présentent un haut degré de diversité génétique, si bien que chaque génotype peut à son tour être subdivisé en une multitude de variants. C'est le cas de la souche GI.4, qui en présente un nombre considérable. Cette variabilité génétique est à la base de la classification des souches de NoV.

La proximité génétique de certaines souches de NoV

humaines et animales soulève la question d'une éventuelle zoonose. Mais jusqu'à présent, aucune transmission de NoV entre l'homme et l'animal n'a été rapportée.

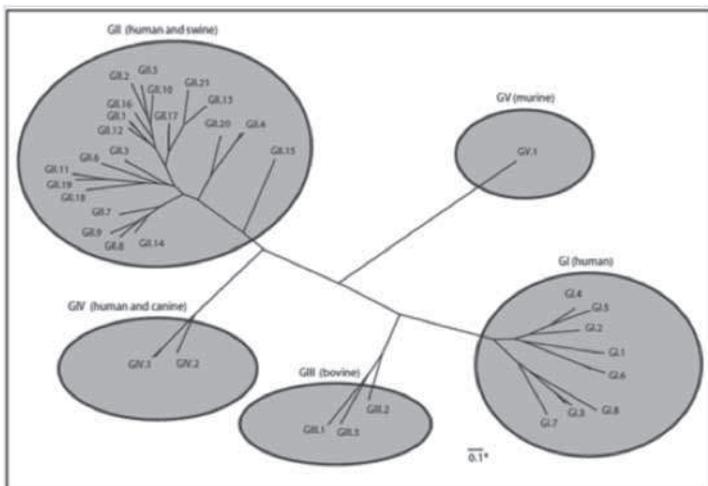


Figure 3 : Classification des norovirus. (source: CDC, 2011)

Caractéristiques virologiques

Les *Caliciviridae* sont des virus à ARN simple brin, non enveloppés, de polarité positive. Leur génome contient approximativement 7600 nucléotides, et est protégé par une capsid de symétrie icosaédrique. Certaines séquences du gène de l'ARN polymérase des NoV sont constantes pour les souches d'un même groupe, et sont utilisées pour le diagnostic par amplification génique. Ces séquences sont nommées Cadre de Lecture Ouvert, plus communément appelées « ORF » pour « Open Reading Frame » dans la littérature anglo-saxonne. Elles sont au nombre de trois. L'ORF1 code un précurseur de protéines non structurales, dont l'ARN polymérase. L'ORF2 et l'ORF3 codent les protéines de capsid majeure (VP1) et mineure (VP2) respectivement. Les régions situées à la jonction de l'ORF1 et de l'ORF2, considérées comme les plus conservées du génome, sont habituellement utilisées comme cible lors du diagnostic par biologie moléculaire.

Les protéines VP1 de la capsid des NoV sont composées de deux domaines majeurs : le domaine S, qui contient l'ARN, et le domaine P, situé à la surface externe du virus, lui-même composé du dimère P1/P2. Ce domaine P est impliqué dans les interactions entre l'hôte et le virus, et présente un haut degré de diversité de séquences corrélé à la grande variabilité antigénique des NoV (Figure 4).

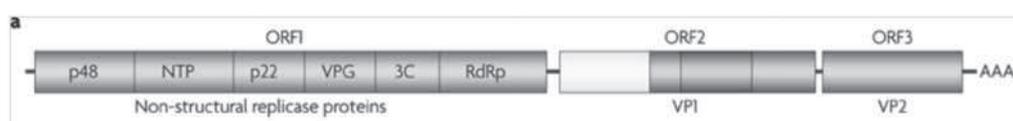


Figure 4a : Organisation du génome des norovirus

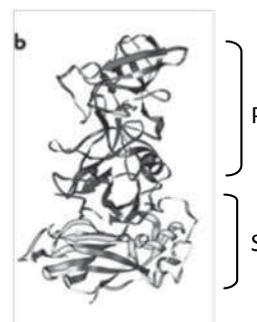


Figure 4b : Structure schématisée de la protéine virale VP1, comprenant les domaines S (en jaune) et P, lui-même subdivisé en sous-domaines P1 (en bleu) et P2 (en rouge) (Source : Nature Reviews Microbiology 2010;8:231-241).

Propriétés physiques

Les NoV sont caractérisés par une grande stabilité dans l'environnement, où ils peuvent persister pendant plus de dix jours (43), et une relative résistance à l'inactivation. Ils résistent à des valeurs extrêmes de pH (de 2 à 12), à de nombreux désinfectants et notamment aux concentrations usuelles de chlore utilisées pour le traitement de l'eau potable, et sont thermorésistants (de -20 à +60°C) (4).

Transmission

La voie de transmission des NoV est féco-orale, principalement (80% des cas) lors des contacts directs, le plus souvent responsables de cas sporadiques (par exemple au sein d'une famille) (Figure 5).

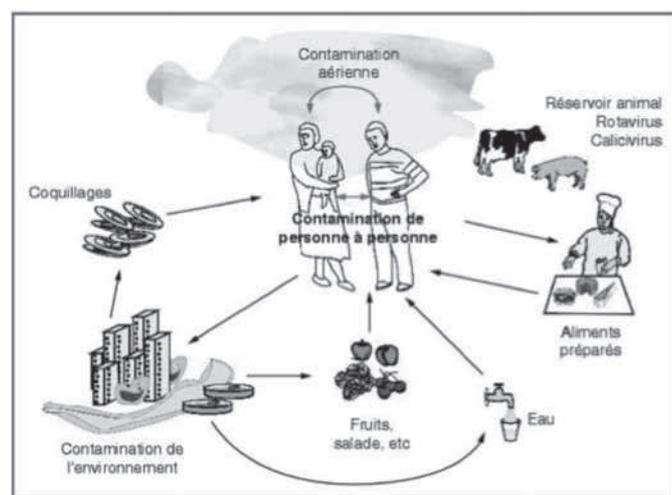


Figure 5. Voies de transmission et modes de contamination des norovirus humains. (D'après P. Pothier, Laboratoire de Virologie, CHU de Dijon, France.)

Les cas les plus rapportés concernent cependant les contacts indirects lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, donnant lieu à des épidémies qui peuvent avoir un impact considérable lorsqu'ils ont lieu dans des collectivités (comme c'est le cas dans les hôpitaux, les maisons de repos, les crèches, les écoles ou encore les bateaux de croisières).

Les mollusques bivalves sont reconnus comme source importante d'infections toxi-alimentaires à NoV, d'une part en raison de leur mode d'alimentation : ces coquillages sont un véritable filtre et concentrent les virus provenant d'une eau contaminée, et d'autre part de par notre mode d'alimentation puisque nous les consommons crus ou peu cuits.

Epidémiologie

Les NoV sont actuellement reconnus comme étant les principaux agents de gastro-entérites virales d'origine alimentaire, et infectent toutes les tranches d'âge. Leur répartition est mondiale⁽⁵⁾. Chez les enfants de moins de 5 ans, bien que le rotavirus reste actuellement la seconde cause de gastro-entérites virales, force est de constater que les NoV sont en passe de devenir la première cause dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été introduite⁽⁶⁾.

Une saisonnalité hivernale des infections à NoV est habituellement observée sous les climats tempérés, avec un pic d'incidence d'octobre à avril et une prédominance durant les mois de février et mars. Bien que nous ne disposions à l'heure actuelle que de peu d'explications à ce sujet, la compréhension de la dépendance saisonnière des infections à NoV représenterait une étape importante vers la compréhension de leur épidémiologie, permettant d'implémenter des mesures de surveillance et de contrôle efficaces⁽⁷⁾.

Le génotype GII.4 en particulier, est un génotype largement dominant parmi les NoV, et c'est également celui qui renferme le plus grand nombre de nouveaux variants⁽⁸⁾. On constate des variations génétiques de plus en plus fréquentes au fil des ans au sein de ce génotype, avec l'apparition de nouveaux variants tous les 2 à 3 ans. Il a par ailleurs été constaté qu'un nouveau variant de GII.4 détecté durant le printemps et l'été correspond à une activité accrue des NoV lors de l'hiver qui suit. L'épidémiologie des souches de NoV du génotype GII.4 mimerait celle du virus influenza, avec une émergence et une propagation rapides et mondiales de nouveaux variants⁽⁹⁾.

Les phénomènes de recombinaison génétique contribuent à la variabilité génétique des souches de NoV et au dynamisme de leur circulation. Mais ils ont également un impact sur la conception des vaccins, qu'ils rendent difficile à mettre au point.

Les caractéristiques des NoV facilitent leur propagation lors des épidémies dans les collectivités, qu'elles

soient communautaires ou nosocomiales : une survie prolongée dans l'environnement, une résistance relative à l'inactivation, une forte contagiosité en raison d'une charge virale excrétée élevée et d'une dose infectieuse vraisemblablement faible (estimée inférieure à 100 virions)⁽¹⁰⁾, une immunité de courte durée suite à l'infection autorisant dès lors les réinfections, l'existence de formes asymptomatiques et une excrétion virale parfois prolongée assortie de charges virales élevées⁽¹¹⁾.

En Belgique, les données épidémiologiques fournies par l'Institut de la Santé Publique, devenu récemment le Centre National de Référence des Norovirus, mettent en évidence un accroissement au fil des ans du nombre d'épidémies à NoV d'origine alimentaire, ayant atteint 20% de la totalité des épidémies d'origine alimentaire en 2010. Cette augmentation du nombre d'infections à NoV rapportées est corrélée avec l'amélioration des méthodes de diagnostic que nous avons à notre disposition depuis l'année 2006.

Pathogenèse

Malgré de multiples tentatives, les NoV humains ne disposent pas d'un système de culture cellulaire in vitro, ni d'un modèle animal pour l'étude de leur réplication et de leur pathogenèse. Depuis peu, les infections reproduites chez la souris peuvent être étudiées grâce à la découverte du NoV murin (MNV-1). Ces virus se multiplient aisément en culture cellulaire, ce qui offrirait des possibilités de modèle pour les NoV humains.

Lors de l'infection chez l'Homme, il semblerait que les NoV se lient aux cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal par l'intermédiaire de séquences polysaccharidiques spécifiques des groupes sanguins A, B, O et Lewis. Les entérocytes, exprimant dans une importante mesure ces antigènes sanguins, serviraient de cellules cibles préférentielles aux NoV. Lorsque l'on compare un épithélium duodéal sain à un épithélium duodéal infecté par des NoV, l'observation histologique met en évidence des modifications structurelles et fonctionnelles, notamment une vacuolisation et une desquamation des cellules épithéliales, une diminution de la résistance de l'épithélium et une réduction de la surface des villosités⁽¹²⁾. Ces modifications structurelles entraînent une malabsorption et de la diarrhée.

Manifestations cliniques

Après une période d'incubation courte de 12 à 48 heures durant laquelle la personne infectée est déjà contagieuse, le tableau clinique d'une infection à NoV est celui d'une gastro-entérite aiguë, incluant nausées, vomissements parfois incoercibles, diarrhée aqueuse non sanglante, et crampes abdominales. Une fièvre modérée est occasionnellement observée. La complication la plus fréquente est la déshydratation,

survenant principalement chez les jeunes enfants et les personnes âgées ou fragilisées par une affection intercurrente. Les infections à NoV sont dans la plupart des cas bénignes et spontanément résolutive en 2 à 3 jours, mais leur impact socio-économique peut se révéler important en cas d'épidémie, de par le caractère explosif de ces épidémies qui présentent d'emblée d'un taux d'attaque élevé pouvant atteindre 50%, avec les conséquences socio-économiques qui en découlent en termes d'absentéisme du personnel, de fermetures de salles d'hospitalisation ou d'établissements scolaires.

Il a été démontré que chez les patients immunodéprimés, entre autres greffés rénaux ou ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'excrétion des NoV peut perdurer durant plusieurs semaines voire plusieurs mois, avec des présentations cliniques plus sévères ou prolongées, voire chroniques⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁵⁾. A l'heure actuelle, les NoV sont des agents entéro- pathogènes encore trop peu fréquemment évoqués en première intention car méconnus en tant que responsables de diarrhées chroniques et sévères chez ces patients. Le diagnostic est donc le plus souvent retardé ou même ignoré⁽¹⁶⁾.

On a observé chez les jeunes enfants, une excrétion des NoV durant parfois plus de dix jours après la fin des symptômes⁽¹⁷⁾. Il conviendrait de tenir compte de ces durées d'excrétion virales prolongées et d'éventuellement adapter le nombre de jours d'isolement recommandé lors d'épidémies nosocomiales⁽¹⁸⁾.

Diagnostic

Un épisode aigu de diarrhée non sanglante, avec ou sans vomissements, doit d'emblée faire évoquer une origine virale.

L'utilité du diagnostic étiologique d'une gastro-entérite virale réside en plusieurs points :

- Le diagnostic et la prise en charge individuelle des patients.
- L'estimation de la contagiosité. En effet, face à une infection à NoV, le Conseil Supérieur de la Santé recommande la mise en place de mesures de précautions complémentaires visant à limiter la transmission des virus.
- La prise en charge des épidémies. Les épidémies à NoV sont difficiles à contrôler et peuvent engendrer des coûts considérables. Ces coûts peuvent toutefois être limités par un diagnostic précoce et l'instauration rapide de mesures de contrôle efficaces afin de limiter l'ampleur de l'épidémie.
- La surveillance épidémiologique.

La méthode diagnostique de choix est la détection génomique du virus par RT-PCR dans les matières fécales, utilisant des amorces visant la région de l'ORF1 codant l'ARN polymérase⁽¹⁹⁾. De par sa sen-

sibilité et sa spécificité optimales, cette méthode est considérée comme la méthode de référence. Elle permet en outre de réaliser une caractérisation moléculaire de la souche virale isolée par un séquençage des produits d'amplification et la comparaison à une banque de données, et de contribuer ainsi à l'amélioration des connaissances épidémiologiques des souches circulantes. Le seul écueil de cette technique est son inaptitude à attester du caractère infectieux ou non des particules virales détectées dans les prélèvements.

Les méthodes de diagnostic par biologie moléculaire ne sont cependant pas accessibles à tous les laboratoires en raison du coût élevé et des équipements sophistiqués qu'elles requièrent. Par ailleurs, à l'heure actuelle, aucun remboursement n'est octroyé en Belgique par l'INAMI pour la recherche de NoV par RT-PCR.

Une autre méthode de diagnostic consiste à détecter les antigènes viraux dans les matières fécales par des méthodes immuno-enzymatiques, soit en microplaques permettant de tester simultanément un nombre élevé d'échantillons, soit sous forme de monostests rapides immunochromatographiques. Les antigènes de NoV peuvent être retrouvés dans les échantillons de selles jusqu'à 15 jours suivant l'épisode infectieux. La détection antigénique requiert moins d'équipement que la RT-PCR, rendant cette méthode moins onéreuse et plus facile à implémenter dans un laboratoire de routine. Les tests rapides sont faciles d'utilisation et fournissent un résultat endéans la demi-heure, ce qui présente un intérêt non négligeable dans la prise en charge des épidémies de gastro-entérites aiguës en milieu hospitalier. Les tests de détection rapide sont très spécifiques, mais affichent une sensibilité trop faible pour être utilisés seuls dans le diagnostic des cas sporadiques. Cependant, dans un contexte épidémique, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾.

La sérologie infectieuse n'a pas sa place dans le diagnostic étiologique d'une gastro-entérite virale aiguë.

Outre les méthodes de diagnostic utilisées au laboratoire, devant une épidémie de gastro-entérite dont l'origine bactérienne a été écartée, des critères établis par Kaplan en 1982 peuvent être appliqués pour évaluer la probabilité que le NoV en soit l'agent causal⁽²²⁾. Ces critères sont très spécifiques lorsqu'ils sont tous présents, et sont les suivants : vomissements (souvent en salve) dans >50% des cas, diarrhée aqueuse non sanglante, durée de la maladie et période d'incubation courtes, personnel et patients atteints.

Prévention

Il n'existe pas de thérapeutique spécifique pour traiter les patients infectés par les NoV. Le traitement symptomatique consiste en une réhydratation et une correction des désordres électrolytiques.

En dépit de nombreuses recherches, aucun vaccin efficace contre les NoV n'est actuellement disponible, principalement en raison de la diversité antigénique des NoV et du manque d'immunité protectrice à long terme⁽²³⁾.

L'élément clé face aux infections à NoV est de limiter leur transmission. En Belgique, le Conseil Supérieur de la Santé recommande l'application des précautions générales dans notre pratique quotidienne. Une hygiène des mains adéquate paraît la méthode la plus importante pour prévenir les infections à NoV et contrôler leur propagation.

En cas d'épidémies nosocomiales à NoV, le Conseil Supérieur de la Santé conseille l'implémentation de mesures complémentaires, dont l'isolement du patient et l'application de précautions additionnelles de type « contact », et « gouttelettes » en cas de vomissements. Les mesures d'hygiène des mains recommandées sont le lavage des mains au savon pendant 1 minute suivi d'un rinçage de 20 secondes suivi d'une désinfection à la SHA. Une désinfection des mains (si elles ne sont pas souillées) par une SHA répondant au moins à la norme EN 14776 est une alternative envisageable.

Il convient également d'initier les investigations aussitôt que possible, incluant la collecte d'échantillons mais également d'informations cliniques et épidémiologiques afin de tenter d'identifier le mode prédominant de transmission et la source possible de contamination.

En ce qui concerne la désinfection de l'environnement, l'efficacité de l'eau de javel diluée (1000 à 5000 ppm selon les surfaces) est bien documentée⁽²⁵⁾. D'autres solutions, notamment à base de phénols et de peroxyde d'hydrogène à 0,5% sont également efficaces contre les NoV. La liste complète des agents efficaces contre les NoV est disponible sur le site du Conseil Supérieur de la Santé et sur celui de l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (http://www.epa.gov/oppad001/list_g_norovirus.pdf).

Les mouvements des patients, du personnel et des visiteurs doivent être restreints autant que possible. En particulier, le personnel travaillant dans une salle affectée ne devrait pas travailler dans une autre salle, et le personnel infecté devrait être écarté durant au moins 48h suivant la résolution des symptômes.

Le CDC (Centers for Disease Control and Prevention,

USA) décrit de manière détaillée les mesures de prévention et de contrôle à appliquer face à une épidémie nosocomiale due aux NoV^{(26) (27)}.

Conclusion

Les norovirus sont reconnus comme le principal agent étiologique de gastro-entérites virales aiguës au niveau mondial.

Les épidémies nosocomiales à NoV ont un réel impact en termes de santé publique, et peuvent engendrer des coûts considérables, qui peuvent être limités par un diagnostic précoce et la mise en place précoce des mesures préventives, essentielles pour limiter l'ampleur des épidémies.

L'excrétion prolongée des NoV après un épisode infectieux est une notion importante dont il conviendrait de tenir compte pour l'estimation de la durée d'isolement des patients, en raison de l'impact que cela peut avoir sur la propagation des virus.

On ne saurait trop insister sur ce point : il faut penser aux NoV devant une épidémie de gastro-entérites aiguës, mais également devant un tableau de diarrhée prolongée chez des patients fragilisés par un état d'immunosuppression ou un âge avancé.

Bien que la méthode diagnostique de référence reste la détection génomique du virus par RT-PCR dans les matières fécales, une détection des antigènes viraux peut également être réalisée par méthode rapide immunologique. Dans le contexte d'épidémies de gastro-entérites, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques, qui devrait toutefois être complétée par un génotypage des souches.

Perspectives

Une surveillance épidémiologique étendue aux pays d'Afrique et d'Amérique du Sud, mais également aux pays européens pour lesquels nous disposons de peu de données à l'heure actuelle permettra d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie des NoV, et de mettre en place des mesures de prévention efficaces pour limiter la propagation de ces virus. Dans cette optique, des outils de surveillance ont été développés, parmi lesquels le réseau européen NoroNet (<http://www.noronet.nl/noronet>).

L'étude approfondie de la réponse immunitaire suite aux infections à NoV pourrait apporter des éléments de réponse pour optimiser la mise au point d'un vaccin.

Références

- (1) Kapihian AZ et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with

- acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10(5):1075-81
- (2) Zheng DP et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-23.
- (3) Cheesebrough et al. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect* 1997;35:325-6
- (4) Doultree JC et al. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect* 1999;41:51-7
- (5) Glass RI et al. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009; 361:1776-1785
- (6) Giordana Rimoldi S et al. Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol* 2011;156:1583-1589
- (7) Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(6):524-7.
- (8) Verhoef L. et al. Emergence of New Norovirus Variants on Spring Cruise Ships and Prediction of Winter Epidemics. *Emerg Infect Dis* 2008;14(2):238-243
- (9) Siebenga JJ et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 2009;200(5):802-12
- (10) Atmar et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1553-1557.
- (11) Sukhrie FH et al. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4303-5.
- (12) Troeger H et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009;58:1070-1077
- (13) Westhoff TH et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1051-3.
- (14) Roddie C et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis* 2009 Oct 1;49(7):1061-8.
- (15) Wingfield T et al. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: A novel cause. *J Clin Virology* 2010;49(3):219-22
- (16) Roddie C et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis* 2009;49(7):1061-8.
- (17) Henke-Gendo C et al. New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children. *J Clin Microbiol* 2009;47(9):2855-62
- (18) Marshall J. et al. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *J Clin Microbiol* 2009;47:2855-2862
- (19) Stals A et al. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus. *J Virol Methods* 2009;161:247-253
- (20) Khamrin et al. Evaluation of a new immunochromatographic assay kit for the rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 2008;147(2):360-363
- (21) Thongprachum A et al. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *J Med Virol* 2010;82:2106-2109
- (22) Kaplan JE et al. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72:1329-1332
- (23) Robert L. Atmar et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. *N Engl J Med* 2011; 365;23
- (24) Liu P et al. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:394-9.
- (25) Duizer E. et al. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2007;70:4538-43
- (26) MacCannell T. et al. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in health-care settings. CDC; 2011.
- (27) Norovirus in healthcare facilities fact sheet. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2006.

Figure 2: Sources: Data from Zheng DP et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-23; Wang QH et al. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1874-81; Graphic developed by Everardo Vega, PhD, CDC.

Glass RI et al. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1776-85.

LES NOROVIRUS, CES ENTÉRO-PATHOGENES ÉPIDÉMIQUES MONDIAUX MÉCONNUS

HUYNEN P (1), MAUROY A (2), MELIN P (3), THIRY E (4)

RÉSUMÉ : Découverts dans les années 1970, les norovirus humains (NoV) sont reconnus comme les principaux agents pathogènes responsables de toxi-infections d'origine alimentaire et d'épidémies de gastro-entérites au niveau mondial. Ils infectent toutes les tranches d'âge. Chez les enfants de moins de 5 ans, bien que le rotavirus reste actuellement la première cause de gastro-entérites virales, force est de constater que les NoV sont en passe d'en devenir la première cause dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été introduite. Le traitement des gastro-entérites virales est symptomatique. L'élément clé face aux infections à NoV est de limiter leur transmission. La prévention des infections à NoV repose principalement sur l'application de mesures d'hygiène des mains adéquates et la désinfection de l'environnement contaminé. Lors des épidémies de gastro-entérites aiguës, l'identification précoce des NoV par des méthodes de laboratoire rapides ou de biologie moléculaire est primordiale afin de mettre en place rapidement les mesures d'hygiène permettant de limiter leur propagation. La diversité antigénique des NoV et le manque d'immunité protectrice à long terme rendent la mise au point de vaccins difficile.

MOTS-CLÉS : *Norovirus - Gastro-entérite*

NOROVIRUSES, THESE UNKNOWN WORLDWIDE EPIDEMIC ENTEROPATHOGENS

SUMMARY : Discovered in the 1970s, human noroviruses (NoV) are the leading cause of foodborne disease and gastroenteritis outbreaks worldwide. NoV affect people of all ages. In children less than 5 years old, despite rotavirus remains the main enteropathogen responsible for viral gastroenteritis, NoV become the first etiological virus in countries where the rotavirus vaccine was introduced. Treatment of viral gastroenteritis is symptomatic. The key element in front of NoV infection is limiting their transmission. A rapid NoV detection during outbreak is important in the aim to rapidly implement hygiene measures to limit the size of the outbreak. Prevention of NoV infections relies on the use of adequate hand hygiene measures and disinfection of contaminated environmental surfaces. In face of an acute gastroenteritis outbreak, the early NoV identification with rapid laboratory tests or molecular biology methods is needed in the aim to implement as soon as possible hygiene measures to limit the size of the NoV outbreak. Due to antigenically diverse NoV strains and the lack of long term immunity, the development of an effective vaccine is difficult.

KEYWORDS : *Norovirus - Gastro-enteritis*

INTRODUCTION

Les premiers norovirus (NoV) furent décrits à la fin des années soixante à l'occasion d'une épidémie de gastro-entérites dans une école de Norwalk (Ohio, USA). En 1972, on décrit, pour la première fois en microscopie électronique, une particule de 27 nm de diamètre. Cette particule fut nommée «virus de Norwalk», du nom de la ville où le virus a été découvert (1).

En 1979 fut créée la famille *Caliciviridae*, qui tire son nom de la forme observée en microscopie électronique de ces virus qui possèdent, à leur surface, des dépressions en forme de calices. La description du génome viral ouvrit ensuite la voie au diagnostic de ces virus par les méthodes de biologie moléculaire, conduisant, en 1998, à une classification de la famille

Caliciviridae basée, cette fois, sur des critères génétiques. La famille *Caliciviridae* comprend actuellement 5 genres : les *Vesivirus*, *Lagovirus* et *Nobovirus*, pathogènes pour les animaux, et les *Norovirus* et *Sapovirus*, comprenant des virus pathogènes soit pour l'homme, soit pour l'animal.

CARACTÉRISTIQUES VIROLOGIQUES

Les NoV sont des virus à ARN simple brin, non enveloppés, appartenant à la famille *Caliciviridae*. Le genre *Norovirus* comprend 7 génogroupes (G) parmi lesquels les génogroupes I, II et IV possèdent des virus pathogènes pour l'homme (2). Les souches animales sont également présentes dans les autres génogroupes (Figure 1). Les NoV sont caractérisés par une très grande variabilité génétique, à la base de la classification des souches. Les génogroupes renferment au moins 38 génotypes. Parmi les génotypes de NoV, la souche GII.4, principal agent étiologique des épidémies de gastro-entérites virales d'origine alimentaire à travers le monde, est elle-même subdivisée en de nombreux variants, avec une apparition de nouveaux variants tous les 2 à 3 ans (3).

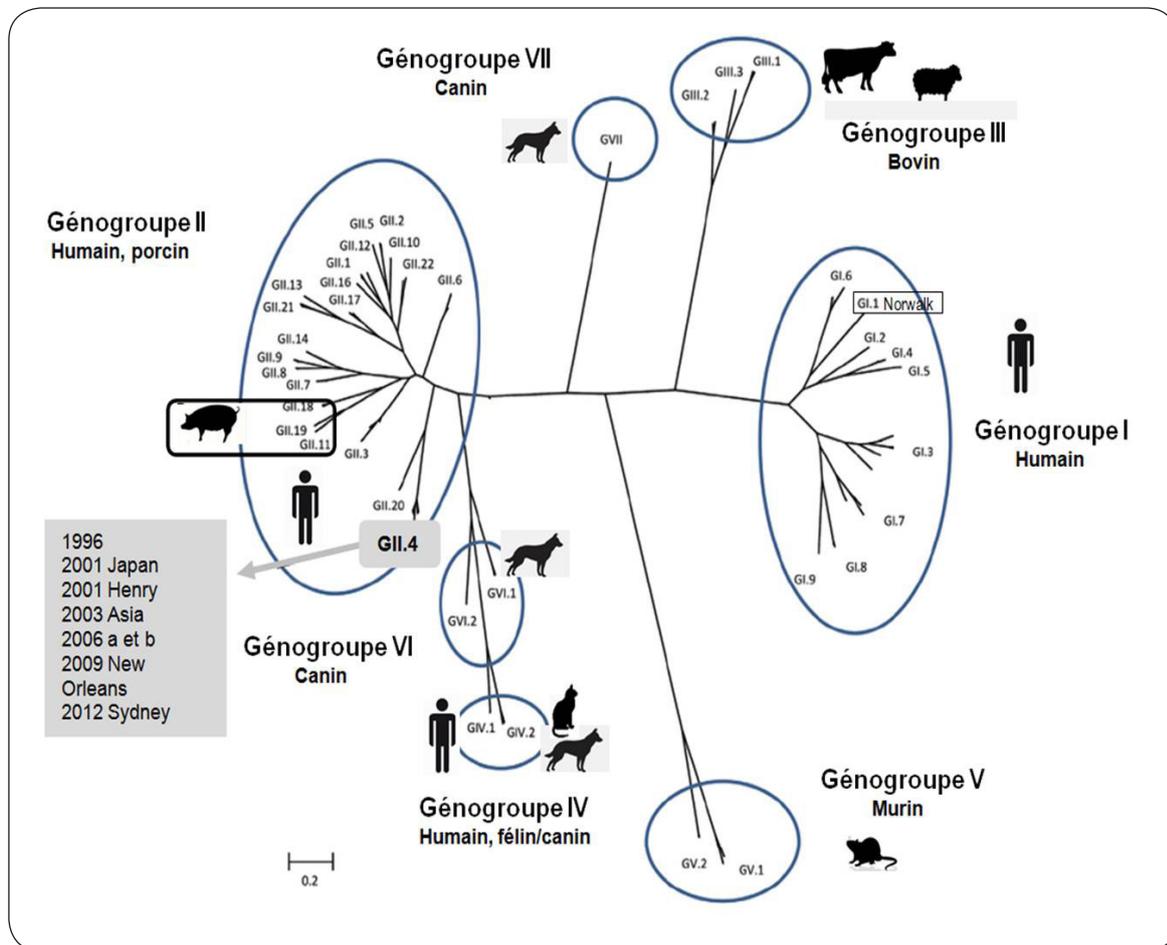
Les phénomènes de recombinaison génétique contribuent à la variabilité génétique des souches de NoV et au dynamisme de leur cir-

(1) Chef de Clinique, (3) Professeur, Chef de Service, Service de Microbiologie Clinique, CHU de Liège, Liège, Belgique.

(2) Médecin vétérinaire, Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA).

(4) Professeur, Chef de Service, Service de Virologie Vétérinaire et Maladies Virales Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre FARAH, Liège Université, Liège, Belgique.

Figure 1. Diversité génétique dans le genre *Norovirus*
(adapté de Vinjé, 2015, référence 2)



culation (4). Ils ont également un impact sur la conception des vaccins, qu'ils rendent difficile à mettre au point. La proximité génétique de certaines souches de NoV humaines et animales soulève la question d'une éventuelle zoonose. Mais jusqu'à présent, aucune transmission de NoV entre l'humain et l'animal n'a été rapportée.

TRANSMISSION

La voie de transmission des NoV est féco-orale, principalement (80 % des cas) lors des contacts directs, généralement responsables de cas sporadiques (Figure 2). Les cas les plus souvent rapportés concernent, cependant, les contacts indirects lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, donnant lieu à des épidémies qui peuvent avoir un impact considérable lorsqu'elles ont lieu dans des collectivités

(hôpitaux, maisons de repos, écoles, bateaux de croisières).

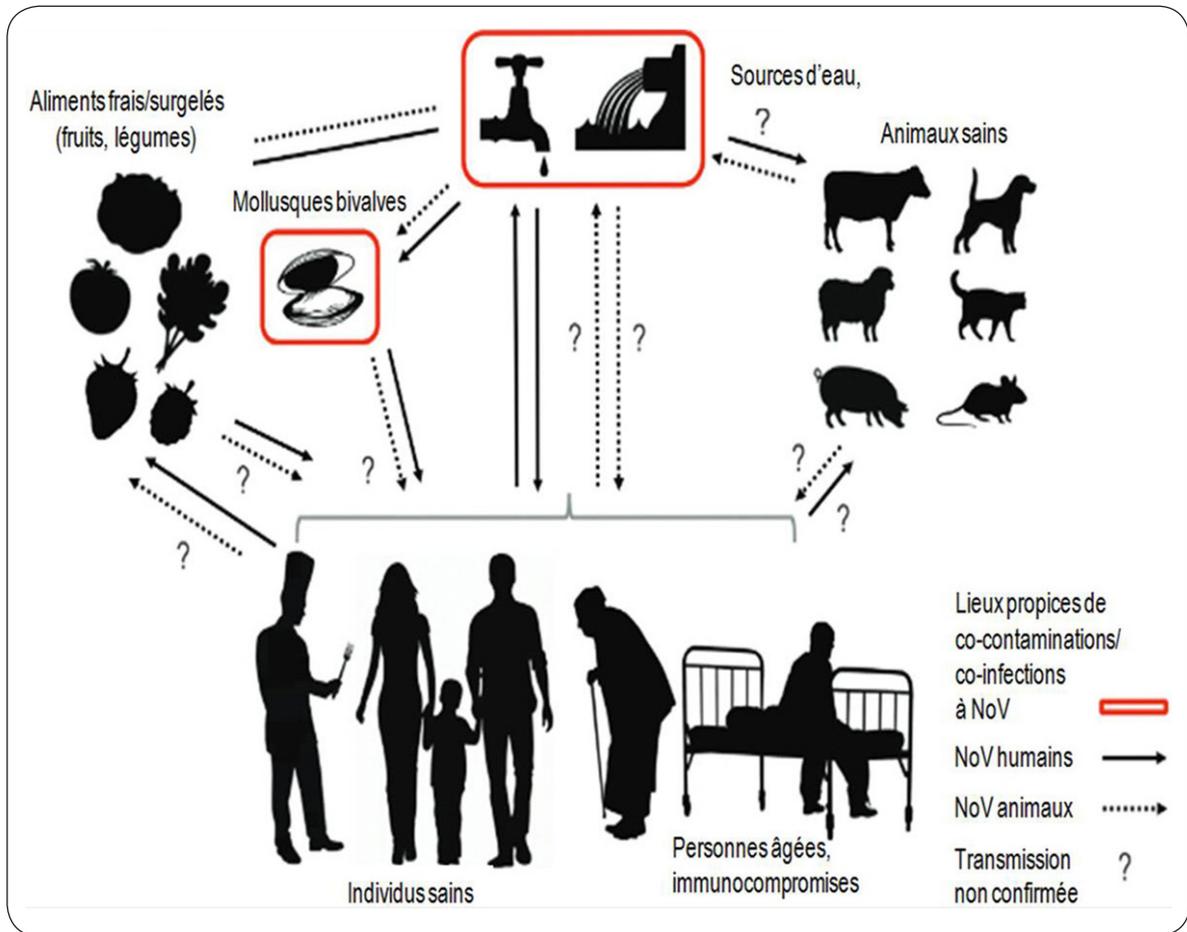
Les mollusques bivalves sont reconnus comme source importante de toxi-infections alimentaires à NoV, d'une part, en raison de leur mode d'alimentation - ces coquillages sont un véritable filtre et concentrent les virus provenant d'une eau contaminée - et, d'autre part, de par notre mode d'alimentation puisque nous les consommons crus ou peu cuits (5).

EPIDÉMIOLOGIE

Les NoV humains sont actuellement reconnus comme étant les principaux agents étiologiques de gastro-entérites non bactériennes sporadiques et épidémiques au niveau mondial, et infectent toutes les tranches d'âge.

Chez les enfants de moins de 5 ans, bien que le rotavirus reste actuellement la première cause de gastro-entérites virales, force est de

Figure 2. Voies de transmission des norovirus. Sont encadrés les facteurs propices à la concentration de norovirus (adapté de Ludwig et coll, 2018, référence 4)



constater que les NoV sont en passe de devenir la première cause dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été introduite (6). Une saisonnalité hivernale est habituellement observée sous les climats tempérés.

Les caractéristiques des NoV facilitent leur propagation lors des épidémies dans les collectivités, qu’elles soient communautaires ou nosocomiales : une survie prolongée dans l’environnement où ils peuvent persister pendant plus de dix jours, une résistance relative à l’inactivation (résistance aux valeurs extrêmes de pH, aux désinfectants usuels, aux concentrations de chlore utilisées pour le traitement de l’eau potable, thermorésistance (-20 à +60°C) (7), une forte contagiosité en raison d’une charge virale excrétée élevée et d’une dose infectieuse faible (estimée inférieure à 100 virions), une immunité de courte durée (quelques mois à quelques années) suite à

l’infection autorisant, dès lors, les réinfections, l’existence de formes asymptomatiques (8) et une excrétion virale parfois prolongée assortie de charges virales élevées (9).

Dans les pays industrialisés, l’impact socio-économique des épidémies à NoV est considérable, lié au taux d’attaque élevé (plus de 50 %), et à toutes les conséquences qui en découlent (absentéisme du personnel, fermeture d’écoles et de salles d’hospitalisation, allongement des durées d’hospitalisation des patients...) (10). On retrouve principalement les souches du génotype GII.4, avec une émergence et une propagation rapides et mondiales de nouveaux variants (11).

Dans les pays à faible revenu, les données sont, par contre, nettement moins étoffées, voire absentes (12, 13). L’impact des infections à NoV dans ces pays ou régions du globe est ainsi méconnu, et est probablement sous-estimé.

MANIFESTATIONS CLINIQUES

Après une période d'incubation courte de 12 à 48 heures, le tableau clinique d'une infection à NoV est celui d'une gastro-entérite aiguë. La complication la plus fréquente est la déshydratation, survenant principalement chez les jeunes enfants et les personnes âgées ou fragilisées par une affection intercurrente. Les infections à NoV sont, dans la plupart des cas, bénignes et spontanément résolutive en 2 à 3 jours (14). Cependant, chez les patients immunodéprimés, l'excrétion des NoV peut perdurer plusieurs semaines, voire des mois, avec des présentations cliniques parfois plus sévères ou prolongées (15, 16).

Un épisode aigu de diarrhée non sanglante, avec ou sans vomissements, doit d'emblée faire évoquer une origine virale. Outre la prise en charge individuelle des patients et la surveillance épidémiologique, le diagnostic étiologique permet d'estimer la contagiosité. En effet, la présentation clinique d'une gastro-entérite à NoV n'est pas toujours aussi franche, et peut évoquer une étiologie autre qu'infectieuse. C'est notamment le cas chez les patients âgés hospitalisés.

Les épidémies à NoV sont difficiles à contrôler et leur impact socio-économique peut se révéler important. Ces coûts peuvent toutefois être limités par un diagnostic précoce et l'instauration rapide de mesures de contrôle appropriées, efficaces contre les NoV, afin de limiter l'ampleur de l'épidémie.

DIAGNOSTIC

La méthode diagnostique de choix est la détection génomique du virus par une méthode de biologie moléculaire (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ou RT-PCR) dans les matières fécales (17). De par sa sensibilité et sa spécificité optimales, cette technique est considérée comme la méthode de référence pour la détection des NoV humains, par ailleurs difficilement cultivables. En outre, elle permet de réaliser une caractérisation moléculaire de la souche virale isolée, et de contribuer ainsi à l'amélioration des connaissances épidémiologiques des souches circulantes (18). Le seul écueil de cette technique est son inaptitude à attester du caractère infectieux ou non des particules virales détectées dans les prélèvements. La détection de NoV par RT-PCR, technique pour laquelle à l'heure actuelle, aucun remboursement n'est octroyé par l'INAMI en Belgique, n'est pas accessible à tous les laboratoires en

raison du coût élevé et des équipements sophistiqués qu'elle requiert.

Une autre méthode de diagnostic consiste à détecter les antigènes viraux de NoV par des méthodes immuno-enzymatiques, notamment par des tests immunochromatographiques. Ces tests rapides sont faciles d'utilisation et fournissent un résultat endéans la demi-heure, ce qui présente un intérêt non négligeable dans la prise en charge des épidémies de gastro-entérites aiguës en milieu hospitalier. Les antigènes de NoV peuvent être retrouvés dans les échantillons de selles jusqu'à 15 jours suivant l'épisode infectieux. Contrairement à la RT-PCR, la détection antigénique ne requiert pas d'équipement particulier, rendant cette méthode moins onéreuse et plus facile à implémenter dans un laboratoire de routine. Ces tests de détection rapide sont très spécifiques, mais affichent une sensibilité trop faible pour être utilisés seuls dans le diagnostic des cas sporadiques. Cependant, dans un contexte épidémique, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques, pour autant qu'un minimum de 5 patients symptomatiques soient testés et ce, afin d'accroître la sensibilité de la méthode (19).

La sérologie infectieuse n'a pas sa place dans le diagnostic étiologique d'une gastro-entérite virale aiguë. Il n'existe, d'ailleurs, aucun test sérologique disponible dans les laboratoires de diagnostic. La séroprévalence envers les NoV augmente avec l'âge et est élevée, atteignant plus de 90 % à l'âge adulte.

Outre les méthodes de diagnostic utilisées au laboratoire, devant une épidémie de gastro-entérite en milieu hospitalier, dont l'origine bactérienne a été écartée, des critères établis par Kaplan en 1982 peuvent être appliqués pour évaluer la probabilité que le NoV en soit l'agent causal (20). Ces critères sont très spécifiques lorsqu'ils sont tous présents, et sont les suivants : vomissements (souvent en salve) dans > 50 % des cas, diarrhée aqueuse non sanglante, durée de la maladie et période d'incubation courtes, personnel et patients atteints.

TRAITEMENT ET PRÉVENTION

Il n'existe pas de thérapeutique spécifique pour traiter une infection à NoV, comme pour la plupart des gastro-entérites. Le traitement est symptomatique. L'élément clé face aux infections à NoV est de limiter leur transmission. Une hygiène des mains adéquate (lavage des mains au savon, désinfection à l'aide d'une solution hydro-alcoolique) paraît la méthode la plus

importante pour prévenir les infections à NoV et contrôler leur propagation. En ce qui concerne la désinfection de l'environnement, l'efficacité de l'eau de Javel diluée (1.000 à 5.000 ppm selon les surfaces) est bien documentée. D'autres solutions, notamment à base de phénols et de peroxyde d'hydrogène à 0,5 %, sont également efficaces contre les NoV (21).

Quant aux vaccins, leur mise au point s'avère difficile, principalement en raison de la diversité antigénique des NoV et du manque d'immunité protectrice à long terme. Plusieurs stratégies vaccinales sont en développement, et les résultats sont encourageants (22).

CONCLUSION

Les NoV sont reconnus comme le principal agent étiologique de gastro-entérites virales aiguës au niveau mondial. Les épidémies nosocomiales à NoV ont un réel impact en termes de santé publique, et peuvent engendrer des coûts considérables, qui peuvent être limités par un diagnostic précoce et la mise en place rapide des mesures préventives, essentielles pour limiter l'ampleur des épidémies.

L'excrétion parfois prolongée des NoV après un épisode infectieux est une notion importante dont il conviendrait de tenir compte, en raison de son impact sur la propagation des virus. Il convient d'insister sur l'importance d'inclure la recherche de NoV dans le diagnostic différentiel d'une épidémie de gastro-entérites aiguës, mais également devant un tableau de diarrhée prolongée chez un patient fragilisé par un état d'immunosuppression ou un âge avancé.

Bien que la méthode diagnostique de référence reste la détection génomique du virus par RT-PCR dans les matières fécales, une détection des antigènes viraux peut également être réalisée par méthode rapide immunologique lorsque le prélèvement contient une charge élevée en virus, comme c'est le cas lors des gastro-entérites aiguës. Dans le contexte d'épidémies de gastro-entérites aiguës, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques. Ce diagnostic étiologique devrait toutefois être complété par un génotypage des souches.

Une surveillance épidémiologique étendue aux pays d'Afrique et d'Amérique du Sud, mais également aux pays européens pour lesquels peu de données sont disponibles à l'heure actuelle, permettra d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie des NoV, et de mettre

en place des mesures de prévention efficaces pour limiter la propagation de ces virus. L'étude approfondie de la réponse immunitaire suite aux infections à NoV pourrait apporter des éléments de réponse pour optimiser la mise au point d'un vaccin.

Dans un prochain article, et afin d'illustrer pratiquement les notions théoriques rappelées dans le présent travail, nous décrirons l'expérience d'un hôpital de la région liégeoise à propos d'une épidémie nosocomiale à norovirus (23).

BIBLIOGRAPHIE

1. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al.— Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, 1972, **10**, 1075-1081.
2. Vinjé J.— Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*, 2015, **53**, 373-381.
3. Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, et al.— Animal noroviruses. *Vet J*, 2008, **178**, 32-45.
4. Ludwig-Begall L, Mauroy A, Thiry E, et al.— Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab – a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Virol*, 2018, **99**, 970-988.
5. Mathijs E, Stals A, Baert L, et al.— A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food Environ Virol*, 2012, **4**, 131-152.
6. Rimoldi GS, Stefani F, Pagani C, et al.— Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol*, 2011, **156**, 1583-1589.
7. Zonta W, Mauroy A, Farnir F, et al.— Comparative virucidal efficacy of seven disinfectants against murine norovirus and feline calicivirus, surrogates of human norovirus. *Food Environ Virol*, 2016, **8**, 1-12.
8. Sukhrie FH, Siebenga JJ, Beersma MF, et al.— Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**, 4303-4305.
9. Glass R, Parashar UD, Estes MK.— Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, 2009, **361**, 1776-1785.
10. Verbelen V, Bodéus M, Garrino MG, et al.— Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium. *Acta Clin Belg*, 2004, **59**, 30-33.
11. Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, et al.— Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virology*, 2011, **18**, 310.
12. Huynen P, Mauroy A, Martin C, et al.— Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol*, 2013, **58**, 515-521.
13. da Silva Poló T, Peiró JR, Mendes LC, et al.— Human norovirus infection in Latin America. *J Clin Virol*, 2016, **78**, 111-119.

14. Mauroy A, Huynen P, De Mol P, Thiry E.— Norovirus : grands coupables méconnus de gastro-entérites. *Rev Med Gen*, 2011, **286**, 316-321.
15. Roddie C, Paul JP, Benjamin R, et al.— Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis*, 2009, **49**, 1061-1068.
16. Pettrignani M, Verhoef L, de Graaf M, et al.— Chronic sequelae and severe complications of norovirus infection: A systematic review of literature. *J Clin Virol*, 2018, **105**, 1-10.
17. Stals A, Baert L, Botteldoorn N, et al.— Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus. *J Virol Meth*, 2009, **161**, 247-253.
18. Stals A, Mathijs E, Baert L, et al.— Molecular detection and genotyping of noroviruses. *Food Environ Virol*, 2012, **4**, 153-167.
19. MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, et al.— Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011, **32**, 939-969.
20. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, et al.— The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health*, 1982, **72**, 1329-1332.
21. Zonta W, Mauroy A, Farnir F, et al.— Virucidal efficacy of a hydrogen peroxide nebulization against murine norovirus and feline calicivirus, two surrogates of human norovirus. *Food Environ Virol*, 2016, **8**, 275-282.
22. Riddle MS, Walker RI.— Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine*, 2016, **34**, 2895-2899.
23. Huynen P, Mauroy A, Lambert N, et al. Epidémie nosocomiale à norovirus : l'expérience d'un hôpital de la région liégeoise en Belgique. *Rev Med Liege*, 2019, **74**, sous presse.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr P. Huynen, Service de Microbiologie Clinique, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.
Email : p.huynen@chuliege.be

II. Objectifs

1. Objectifs principaux

Il y a de cela une décennie, les NoV étaient méconnus des microbiologistes et des cliniciens en Belgique. Les méthodes de détection commerciales telles que nous les connaissons actuellement n'existaient pas encore, et ces virus ne faisaient pas partie des entéropathogènes recherchés en routine chez les patients, que ce soit à titre individuel ou face à une épidémie de gastro-entérite aiguë. Par ailleurs, le Centre de Référence Belge (CNR) des Norovirus n'avait pas encore été créé.

De découverte relativement récente et en l'absence de modèle de culture *in vitro* aisé pour les NoV humains, les domaines d'exploration de ces virus étant nombreux et vastes - qu'ils concernent les recombinaisons virales, la pathogenèse, la réponse immunitaire, les méthodes de diagnostic au laboratoire, l'épidémiologie ou encore les méthodes de prévention - il a dès lors été décidé dès le départ d'aborder une partie ciblée du sujet.

Les objectifs ont visé dans un premier temps la mise au point et l'implémentation au laboratoire de méthodes de détection performantes des NoV humains chez les patients. Ces outils constituent un prérequis indispensable pour envisager l'étude des NoV, avec pour but d'atteindre les objectifs suivants : caractérisation des souches de NoV, et étudier l'épidémiologie clinique et moléculaire des NoV.

2. Objectifs spécifiques

Le premier objectif a donc été de mettre au point et d'implémenter au laboratoire une méthode de biologie moléculaire (RT-PCR), qualifiée de méthode de référence, permettant de détecter les NoV humains, en s'appuyant sur l'expertise de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULiège.

La réalisation d'une RT-PCR nécessitant du temps et du personnel habilité, il s'est rapidement avéré nécessaire de disposer d'une méthode de diagnostic plus rapide, spécifique, aisée et adaptée à la réalisation d'analyses au coup par coup afin de faire face à une éventuelle épidémie de gastro-entérite aiguë qui surviendrait à l'hôpital. C'est ainsi que, dans un second temps, un objectif supplémentaire s'est profilé : évaluer une méthode commerciale nouvellement proposée sur le marché, basée sur la détection des antigènes de NoV.

Le second objectif visait à étudier la problématique des NoV dans les collectivités.

Équipés au laboratoire des outils diagnostiques nécessaires, le choix des collectivités qui permettraient de rencontrer ce second objectif devrait être fait dans des populations ciblées, mais déterminées de façon à obtenir au final des données sur les NoV :

- chez des patients hospitalisés et non hospitalisés,
- dans un contexte épidémique et lors de cas sporadiques,
- chez des patients présentant des symptômes digestifs et chez des individus sains,
- chez des patients immunocompétents et chez des patients immunocompromis.

Le choix de la première collectivité, de par sa facilité d'accès, s'est porté naturellement vers l'étude des NoV en milieu hospitalier, plus particulièrement avec l'objectif d'étudier les NoV lors d'une épidémie chez des patients hospitalisés présentant des symptômes de gastro-entérite aiguë.

Les patients étudiés dans ce cadre ne sont pas représentatifs de la population en général, et les souches de NoV mises en évidence lors des épidémies sont loin d'être le reflet de l'ensemble des souches circulant dans la population.

Il paraissait dès lors opportun d'étudier les NoV dans une collectivité moins ciblée, ce qui a amené au choix de la seconde collectivité : l'étude des NoV chez des individus non hospitalisés, présentant ou non des symptômes de gastro-entérite, dans le contexte particulier d'un pays africain, permettant également de pallier le manque cruel de données dans les pays en développement.

Après avoir défini ces deux collectivités, il manquait cependant une troisième population à étudier, sans doute la plus importante pour un hôpital universitaire où plus de 2000 patients ont bénéficié à ce jour d'une greffe d'organe : étudier les NoV chez cette catégorie de patients, immunocompromis, et plus particulièrement chez des patients greffés rénaux. Ceci avec, pour objectif secondaire, de tenter d'inclure dans l'étude des patients asymptomatiques en plus des patients présentant des troubles gastro-intestinaux.

III. Études et résultats

1. Diagnostic microbiologique des NoV

Il y a une dizaine d'années, contrairement aux entéropathogènes usuellement recherchés chez les patients, les NoV étaient peu connus en Belgique et ne faisaient pas partie des entéro-pathogènes détectables en routine. En particulier, le CHU de Liège ne disposait pas de méthode de détection des NoV chez les patients.

Préalablement à l'étude des NoV à proprement parler, il fut dès lors nécessaire de mettre au point et d'implémenter une méthode de détection des NoV.

Les NoV étaient par contre étudiés depuis plusieurs années à deux pas de là, dans le Service de Virologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'ULiège. La collaboration entre ces deux services a permis de mettre au point une RT-PCR performante et de l'implémenter au CHU. Les trousseaux commerciaux ne détectant que les NoV des génotypes I et II, le choix s'est porté sur une méthode RT-PCR non commerciale détectant également les souches du génogroupe IV, également pathogènes pour l'Homme.

1.1. Mise au point d'une RT-PCR quantitative en temps réel

A. Objectifs

En l'absence de modèle de culture *in vitro* aisé des NoV humains, les méthodes de biologie moléculaire constituent la référence pour la détection des NoV chez les patients.

L'objectif était de valider une RT-PCR quantitative en temps réel pour la détection des acides nucléiques de NoV des génogroupes I, II et IV dans les échantillons de selles de patients en une seule et même réaction, d'après le protocole de Stals *et al* 2009.

Cette RT-PCR permettrait en outre de différencier les NoV GI et GIV des NoV GII grâce à l'utilisation de deux fluorochromes différents.

B. Matériel et méthodes

Les performances de la méthode ont été évaluées à l'aide d'extraits d'ARN de NoV et d'échantillons de patients contenant des souches caractérisées de NoV des génogroupes I, II et IV fournis par le laboratoire de Virologie Vétérinaire de l'ULiège, et d'échantillons de contrôles de qualité externes commandés auprès du programme international de contrôles de qualité externes 'QCMD Norovirus' (Quality Control for Molecular Diagnosis, Glasgow, Scotland, UK).

Un contrôle de qualité externe (QCE) est un échantillon fourni à plusieurs laboratoires qui vont analyser cet échantillon à l'aide de la méthode dont ils disposent. L'utilisation d'un QCE permet au laboratoire de comparer les résultats qu'il a obtenus à ceux d'autres laboratoires ayant réalisé la même analyse. Sa fonction première est de vérifier l'exactitude des résultats d'une méthode.

B.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons de patients ont été dilués au 10^{ème} dans une solution de PBS- Azide, dans le but d'inhiber la prolifération bactérienne, et ont ensuite été conservés entre +4 et +8°C.

B.2. Extraction de l'ARN

Après une étape d'homogénéisation suivie d'une centrifugation, le surnageant a été utilisé pour réaliser l'étape d'extraction de l'ARN de NoV.

Afin de faciliter l'étape d'extraction et de limiter les étapes de manipulation des échantillons, l'extraction de l'ARN a été automatisée sur l'automate MAXWELL® (Promega, Leiden, The Netherlands), en utilisant le kit d'extraction Maxwell® 16 Cell LEV Total RNA Purification (Promega). Le principe est le suivant : l'automate procède à la lyse du virus pour libérer les

acides nucléiques qui sont ensuite liés à des particules magnétiques, s'ensuivent plusieurs étapes de lavage servant à purifier l'ARN pour terminer par une élution. L'ARN purifié est alors récupéré dans de l'eau stérile qui pourra être ultérieurement utilisé pour la RT-PCR.

L'ARN purifié a été conservé entre +4°C et +8°C si la PCR était réalisée le jour même, et à -80°C (ou moins) si elle était différée.

Lors de chaque série d'extraction, deux contrôles de qualité ont été ajoutés :

- *Un contrôle externe d'extraction* : Universal Inhibition Control (Cy5) (Diagenode® , Liège, Belgique) afin de vérifier l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs (Scipioni *et al* 2008),
- *Un contrôle négatif interne d'extraction et d'amplification* : il s'agit d'eau stérile qui subit le même traitement que les échantillons et permet dès lors de vérifier l'absence de contamination.

B.3. Amplification et détection de l'ARN par RT-PCR en temps réel

Les amorces et les sondes (Eurogentec®, Liège, Belgique) utilisées pour la RT-PCR, reçues sous forme lyophilisées, ont été reconstituées et diluées de manière à obtenir une concentration finale adéquate pour réaliser la RT-PCR en temps réel (tableau I). La solution obtenue a ensuite répartie en aliquotes conservés à -80°C.

| Primers/probes | Sequence (5'-3') ^a | Polarity ^b | Position ^c | Final conc. | Fluoro phore ^d (5')/Quencher (3') |
|----------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|--|
| NoV GI | | | | | |
| QNIF4 | CGCTGGATGCGNTTCCAT | + | 5291-5308 | 500 nM | |
| NV1LCR | CCTTAGACGCCATCATCATTTAC | - | 5354-5376 | 900 nM | |
| NVGG1p | TGGACAGGAGAYCGCRATCT | + | 5321-5340 | 100 nM | 6-FAM/BHQ-1 |
| NoV GII | | | | | |
| QNIF2 | ATGTTACAGRTGGATGAGRTTCTCWGA | + | 5012-5038 | 500 nM | |
| COG2R | TCGACGCCATCTCATTACACA | - | 5100-5080 | 900 nM | |
| QNIFS | AGCACGTGGAGGGCGATCG | + | 5042-5061 | 250 nM | Texas Red/BHQ-1 |
| MNV-1 | | | | | |
| FW-ORF1/ORF2 | CACGCCACCGATCTGTCTG | + | 4972-4991 | 200 nM | |
| RV-ORF1/ORF2 | GCCTGCGCCATCACTC | - | 5064-5080 | 200 nM | |
| MGB-ORF1/ORF2 | CGCTTGGAACAATG | + | 5001-5015 | 200 nM | NED/MGBNFQ |

^a Mixed bases in degenerate primers and probes are as follows: Y, C or T; R, A or G; N, any.

^b +, virus sense; -, anti-virus sense.

^c Corresponding nucleotide position of Norwalk/68 virus (accession nr. M87661) for NoV GI, Lonsdale virus (accession nr. X86557) for NoV GII or murine norovirus 1 clone CW1 (accession nr. DQ285629).

^d BHQ-1: Black Hole Quencher - 1, MGBNFQ: Minor Groove Binding Non-Fluorescent Quencher.

Tableau I. Concentrations finales des sondes et amorces utilisées pour la RT-PCR NoV en temps réel (adapté de Stals *et al* 2009).

Pour chaque série d'échantillons, 3 contrôles internes ont été ajoutés afin de s'assurer du bon déroulement de l'analyse :

- Deux contrôles positifs : ARN de NoV GI.4 et ARN de NoV GII.2
- Un contrôle négatif : Eau stérile (RNA free water, QUIAGEN® Onestep RT-PCR).

La réaction de RT-PCR a été réalisée sur le thermocycler 7500 Fast® (Applied biosystem, Foster City, Californie, États-Unis). Cette réaction débute par une étape de transcription inverse (30 minutes, 50°C), suivie d'une étape de dénaturation initiale/activation (15 minutes, 95°C). Les 50 cycles d'amplification comprennent deux étapes : 15 secondes à 95°C de dénaturation suivis de 60 secondes à 60°C d'extension.

B.4. Quantification des NoV dans les échantillons

Étant donné la difficulté actuelle de cultiver les NoV humains en culture *in vitro*, une estimation de la charge virale de NoV GI et de NoV GII présente dans les prélèvements de patients a été effectuée en utilisant des plasmides.

Un gène d'une longueur de 100 paires de bases pour NoV GI et de 110 pour NoV GII a été inséré dans les plasmides respectivement.

L'analyse de l'échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre, le NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.), utilisant la technologie de la fibre optique et la tension de surface, donne un spectre complet d'absorbance de 220 à 750 nm. L'absorbance lue est ensuite directement convertie en concentration (ng/µl).

Des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir une droite de calibration et d'établir la limite de détection inférieure de la technique.

C. Résultats

C.1. Évaluation de la méthode à l'aide d'échantillons caractérisés

La présence de NoV a été correctement détectée dans tous les échantillons. Par ailleurs, aucune réaction croisée n'a été observée entre les génogroupes GI d'une part et GII/GIV d'autre part (Tableaux II et III).

| Génogroupe/ Génotype | Réf. | Type d'échantillon | Ct NoV GI | Ct NoV GII/GIV |
|-------------------------|------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| GI.4 | 1 | ARN extrait | 22,2 | <i>Non détecté</i> |
| GI.4 | 2 | ARN extrait – dilué 1/1000 | 30,7 | <i>Non détecté</i> |
| GI.4 | 3 | selles | 43,9 | <i>Non détecté</i> |
| GII.4 | 4 | ARN extrait | <i>Non détecté</i> | 29,1 |
| GII.4 | 5 | ARN extrait | <i>Non détecté</i> | 23,4 |
| GII.2 | 6 | selles | <i>Non détecté</i> | 21,2 |
| GII.4 | 7 | selles | <i>Non détecté</i> | 19,8 |
| GII.4 | 8 | selles | <i>Non détecté</i> | 23,4 |
| GII.4 | 9 | selles | <i>Non détecté</i> | 28,4 |
| GII.4 | 10 | selles | <i>Non détecté</i> | 25,1 |
| GII.4 | 11 | selles | <i>Non détecté</i> | 18,5 |
| GII.4 | 12 | selles | <i>Non détecté</i> | 22,4 |
| GII.7 | 13 | selles | <i>Non détecté</i> | 25,5 |
| GII.4 | 14 | selles | <i>Non détecté</i> | 20,0 |
| GII.4/GII.2 | 15 | selles | <i>Non détecté</i> | 27,8 |
| GIV.1 | 16 | selles | <i>Non détecté</i> | 25,5 |

Tableau II. Échantillons d'ARN extrait et échantillons de patients : résultats (Ct = Cycle threshold).

| Référence | NoV GI (Ct) | NoV GII (Ct) | Résultat QCMD |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| QCMD1 | <i>Non détecté</i> | 39,0 | NoV GII |
| QCMD2 | <i>Non détecté</i> | 32,2 | NoV GII |
| QCMD3 | 37,1 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |
| QCMD4 | <i>Non détecté</i> | <i>Non détecté</i> | <i>Non détecté</i> |
| QCMD5 | 30,4 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |
| QCMD6 | <i>Non détecté</i> | 27,4 | NoV GII |
| QCMD7 | <i>Non détecté</i> | 41,6 | NoV GII |
| QCMD8 | 30,9 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |
| QCMD9 | 43,1 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |
| QCMD10 | 24,0 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |
| QCMD11 | <i>Non détecté</i> | <i>Non détecté</i> | <i>Non détecté</i> |
| QCMD12 | 44,4 | <i>Non détecté</i> | NoV GI |

Tableau III : Contrôles de qualité externe QCMD : résultats.

C.2. Spécificité

La spécificité d'une méthode est sa capacité à identifier de manière correcte les vrais négatifs.

La RT-PCR a été réalisée sur 15 échantillons de selles ne contenant pas de NoV mais bien d'autres entéro-pathogènes, afin de s'assurer de l'absence de réactions croisées non spécifiques, qui engendreraient un résultat erronément positif.

Aucune réaction croisée avec les pathogènes testés n'a été observée (tableau IV).

| Agent pathogène | | Méthode de détection | NoV GI/II/IV |
|------------------------|-------|-----------------------------|---------------------|
| Sapovirus | (n=1) | ARN par RT-PCR | <i>Non détecté</i> |
| Rotavirus | (n=1) | Antigène par IC | <i>Non détecté</i> |
| Adenovirus | (n=5) | Antigène par IC | <i>Non détecté</i> |
| <i>Salmonella sp</i> | (n=4) | Culture bactérienne | <i>Non détecté</i> |
| <i>H.pylori</i> | (n=1) | Antigène par IC | <i>Non détecté</i> |
| <i>C.difficile</i> | (n=3) | Culture bactérienne/ IC | <i>Non détecté</i> |

Tableau IV. Absence de réactions croisées envers les NoV dans des échantillons de selles contenant d'autres entéropathogènes (n : nombre d'échantillons, IC : Immunochromatographie sur membrane)

C.3. Absence d'interférences dues à la présence de sang dans les selles

La RT-PCR a été réalisée sur un échantillon négatif (eau purifiée) et sur un échantillon de selles de patient caractérisé positif pour le NoV GII par RT-PCR, auxquels ont été ajoutés arbitrairement 0,5, 5 et 10% de sang, afin de s'assurer du bon fonctionnement de la réaction en présence de sang dans l'échantillon. On note l'absence d'interférence du sang avec la RT-PCR, aux concentrations testées (tableau V).

| Échantillon | NoV GII.2 (Ct) |
|---------------------|-----------------------|
| Eau | <i>Non détecté</i> |
| Eau + 0,5% sang | <i>Non détecté</i> |
| Eau + 5% sang | <i>Non détecté</i> |
| Eau + 10% sang | <i>Non détecté</i> |
| NoV GII | 24,2 |
| NoV GII + 0,5% sang | 37,5 |
| NoV GII + 5% sang | 34,3 |
| NoV GII + 10% sang | 35,7 |

Tableau V. Absence d'interférence avec le sang : résultats.

C.4. Non contamination entre échantillons

Un échantillon de patient positif pour NoV GII a été alterné avec un échantillon négatif (eau purifiée). Aucune contamination de l'eau par les échantillons positifs n'a été constatée.

C.5. Précision

La précision est une mesure de la dispersion des résultats lors du dosage d'un même échantillon à plusieurs reprises à l'aide d'une même technique et se traduit en termes de coefficient de variation (CV) défini au préalable lors des épreuves de répétabilité et de reproductibilité.

Répétabilité. La répétabilité a pour but de vérifier, dans les conditions réelles d'utilisation, le bon fonctionnement du système analytique dans un laps de temps court. Deux échantillons de patients caractérisés positifs pour NoV GII (un fortement et un faiblement positif) ont été testés à 3 reprises dans une même série d'échantillons. Le coefficient de variation (CV) maximal fixé au préalable était de 5% (tableau VI).

| Échantillons | Résultat pour NoV GII.2 (Ct) | | | CV (%) |
|---------------------------|------------------------------|------|------|--------|
| Témoin positif | 24,7 | 24,8 | 24,4 | 0,7 |
| Témoin faiblement positif | 39,4 | 40,7 | 39,9 | 1,3 |

Tableau VI. Répétabilité : résultats.

La reproductibilité. La reproductibilité permet de connaître la variabilité analytique d'une même méthode au fil du temps, en testant les échantillons trois fois dans une même série, mais à deux dates différentes. Les données acquises peuvent être ultérieurement utilisées pour mettre en évidence un dysfonctionnement au cours du temps. Le coefficient de variation (CV) maximal fixé au préalable était de 5% (tableau VII).

| Échantillons | Date de l'analyse | Résultat pour NoV GII.2 (Ct) | | | CV (%) |
|---------------------------|-------------------|------------------------------|------|------|--------|
| Témoin positif | 18/11/2010 | 22,1 | 23,2 | 22,5 | 2,4 |
| | 26/10/2010 | 27,2 | 27,0 | 27,0 | 0,4 |
| Témoin faiblement positif | 18/11/2010 | 34,3 | 34,4 | 34,3 | 0,3 |
| | 26/10/2010 | 37,3 | 37,4 | 37,4 | 0,2 |

Tableau VII. Résultats de la reproductibilité.

C.6. Robustesse

L'évaluation de la robustesse est nécessaire afin de déterminer si des variations fortuites dans le mode opératoire modifient fortement ou non les résultats obtenus.

Pour ce faire, les paramètres suivants ont été modifiés :

- Les quantités d'échantillons utilisées (80% et 120%),
- La température lors des cycles d'amplification : nous avons réalisé les analyses à 59°C et 61°C.

La RT-PCR résiste bien à des variations de quantité à analyser ainsi qu'à une diminution de température, mais pas à une augmentation de la température (tableau VIII).

Une élévation des valeurs de Ct a été observée, avec une détection plus tardive, lorsque l'analyse est effectuée à 61°C (tableau IX).

| Échantillons | Quantité | NoV GII.2 (Ct) |
|--------------|----------|--------------------|
| Eau | 100% | <i>Non détecté</i> |
| Eau | 80% | <i>Non détecté</i> |
| Eau | 120% | <i>Non détecté</i> |
| NoV GII | 100% | 22,1 |
| NoV GII | 80% | 21,8 |
| NoV GII | 120% | 22,3 |

Tableau VIII. Variation de la quantité d'échantillons : résultats.

| Échantillons | Température | NoV GII.2 (Ct) |
|--------------|-------------|--------------------|
| Eau | 60°C | <i>Non détecté</i> |
| Eau | 59°C | <i>Non détecté</i> |
| Eau | 61°C | <i>Non détecté</i> |
| NoV GII | 60°C | 22,1 |
| NoV GII | 59°C | 21,9 |
| NoV GII | 61°C | 33,6 |

Tableau IX. Variation de la température d'analyse : résultats.

C.7. Quantification virale

Le nombre de copies génomiques de NoV/ml a été obtenu en remplaçant la valeur de Y, correspondant à la valeur de Ct obtenue, dans l'équation de la droite de régression linéaire calculée pour la courbe de calibration des plasmides NoV GI et NoV GII (Figure 11).

La limite de détection est la plus petite quantité de copies virales détectable dans l'échantillon. Elle a été déterminée à l'aide de plasmides de NoV GI et GII de concentrations connues I, selon le protocole de Baert *et al* (2008).

Une limite de détection de 8 copies génomiques/ml de selles pour NoV GI et NoV GII a été obtenue (tableau X).

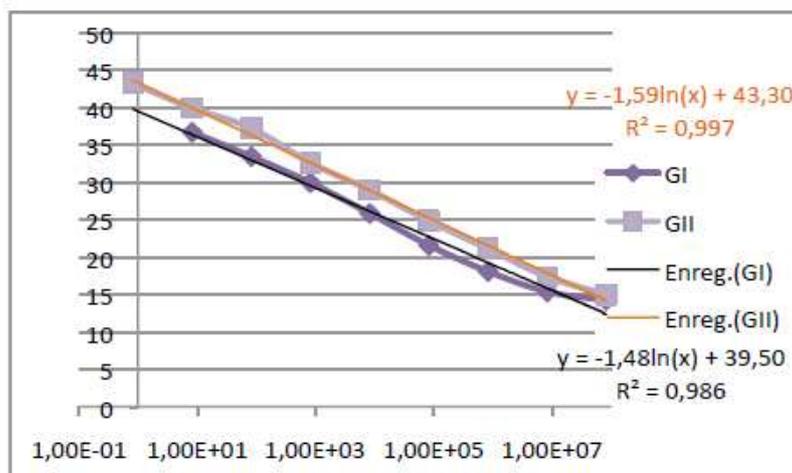


Figure 11. Courbes de dilution pour NoV GI.4 et GII.2.

| | Copies/ml | Ct |
|------------------|----------------|------|
| NoV GI.4 | | |
| | $8 \cdot 10^7$ | 14,8 |
| | $8 \cdot 10^6$ | 17,0 |
| | $8 \cdot 10^5$ | 21,2 |
| | $8 \cdot 10^4$ | 24,9 |
| | $8 \cdot 10^3$ | 29,1 |
| | $8 \cdot 10^2$ | 32,4 |
| | $8 \cdot 10^1$ | 36,8 |
| | 8 | 40,6 |
| | 0,8 | |
| NoV GII.2 | | |
| | $8 \cdot 10^6$ | 17,4 |
| | $8 \cdot 10^5$ | 20,9 |
| | $8 \cdot 10^4$ | 24,7 |
| | $8 \cdot 10^3$ | 28,8 |
| | $8 \cdot 10^2$ | 32,7 |
| | $8 \cdot 10^1$ | 36,2 |
| | 8 | 40,2 |
| | 0,8 | |

Tableau X. Courbes de dilution des plasmides NoV GI.4 et GII.2 : correspondance entre Ct et nombre de copies génomiques par ml.

La RT-PCR quantitative en temps réel a ensuite été testée sur des échantillons caractérisés de patients et sur des contrôles de qualité externes QCMD (Quality Control for Molecular Diagnosis, Scotland, UK) pour NoV GI et pour NoV GII.

Les résultats de la quantification de NoV dans les échantillons de patients et dans les échantillons de contrôle de qualité externes 'QCMD' sont repris dans le tableau XI.

| Réf. échantillon | NoV GI (Ct) | NoV GI (copies/ml) | NoV GII (Ct) | NoV GII (copies/ml) | Résultat du QCMD |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Échantillons de patients - NoV GII | | | | | |
| GII.7 | <i>Non détecté</i> | - | 22,9 | 55 311,3 | |
| GII.4 bene | <i>Non détecté</i> | - | 22,4 | 458 898,9 | |
| GI.4 UCL 21 | <i>Non détecté</i> | - | 19,9 | 2 094 610,2 | |
| GII.4/GII.2 | <i>Non détecté</i> | - | 25,8 | 17 685,3 | |
| GII.4 | <i>Non détecté</i> | - | 25,5 | 69 733,7 | |
| 186 | <i>Non détecté</i> | - | 22,2 | 512 133,9 | |
| 103 | <i>Non détecté</i> | - | 29,9 | 4680,8 | |
| 149 | <i>Non détecté</i> | - | 22,6 | 416 243,0 | |
| E | <i>Non détecté</i> | - | 25,5 | 75 948,1 | |
| S | <i>Non détecté</i> | - | 23,5 | 228 996,8 | |
| V | <i>Non détecté</i> | - | 30,9 | 2575,1 | |
| B | <i>Non détecté</i> | - | 34,1 | 363,7 | |
| Échantillons du QCMD – NoV GI | | | | | |
| QCMD 3 | 37,1 | 53,3 | <i>Non détecté</i> | - | NoV GI + |
| QCMD 5 | 30,8 | 2328,6 | <i>Non détecté</i> | - | NoV GI + |
| QCMD 8 | 20,7 | 1 059 697,4 | <i>Non détecté</i> | - | NoV GI +++ |
| QCMD 9 | 35,6 | 147,7 | <i>Non détecté</i> | - | NoV GI + |
| QCMD 10 | 19,0 | 2 915 471,7 | <i>Non détecté</i> | - | NoV GI +++ |
| Échantillons du QCMD – NoV GII | | | | | |
| QCMD 1 | <i>Non détecté</i> | - | 39,0 | 18,2 | NoV GII + |
| QCMD 2 | <i>Non détecté</i> | - | 32,2 | 1179,9 | NoV GII + |
| QCMD 4 | <i>Non détecté</i> | - | 28,2 | 13 117,6 | NoV GII ++ |
| QCMD 6 | <i>Non détecté</i> | - | 25,4 | 167,7 | NoV GII + |
| QCMD 7 | <i>Non détecté</i> | - | 18,7 | 4 407 333,8 | NoV GII +++ |

Tableau XI. Quantification des échantillons et des contrôles QCMD (Quality Control for Molecular Diagnosis) caractérisés NoV GI et GII : résultats (en valeur de Ct et en nombre de copies génomiques/ml) (+ : $<10^3$ copies/ml, ++ : $10^3 - 10^4$ copies/ml, +++ : $> 10^4$ copies/ml).

D. Conclusion

La performance de la RT-PCR quantitative en temps réel mise au point selon le protocole de Stals *et al* 2009 a été évaluée, et a détecté et quantifié efficacement et distinctement les souches de NoV de différents génogroupes et génotypes dans les différentes conditions d'analyse prédéfinies.

Avec des limites de détection <10 copies génomiques/ml pour NoV GI et NoV GII, la RT-PCR développée s'est avérée plus performante que les RT-PCR commerciales disponibles

au moment de l'évaluation, ces dernières détectant des copies génomiques minimales de 1000 à 10 000/ml (Pang *et al* 2015, Rupprom *et al* 2017, Schultz *et al* 2011).

Une limite de détection aussi faible que celle de la RT-PCR développée n'est certes pas nécessaire dans le cadre du diagnostic étiologique d'une gastro-entérite aiguë, mais peut s'avérer utile pour le suivi de l'excrétion virale chez les patients immunocompromis.

En termes de spécificité, la RT-PCR développée dans ce cadre a démontré une capacité d'amplification frôlant les 100% pour les 3 génogroupes, et une absence de réaction croisée entre les génogroupes de NoV ainsi qu'avec les entéro- pathogènes usuellement détectés.

1.2. Évaluation d'un test de détection antigénique des NoV

A. Objectifs

Outre le diagnostic des infections à NoV basé sur les méthodes de diagnostic moléculaire, une détection des antigènes viraux peut également être réalisée, et ce par des méthodes immunochromatographiques aussi appelées plus communément 'test rapides'. Dans un contexte d'épidémies, ces tests rapides peuvent se révéler utiles afin de diagnostiquer rapidement les NoV comme agent étiologique, afin d'appliquer rapidement des mesures d'hygiène visant à limiter la propagation de l'épidémie.

Les performances du test commercial ImmunoCardSTAT![®]Norovirus (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, États-Unis) (figure 10), permettant la détection combinée des NoV des génogroupes I et II par méthode d'immunochromatographie sur membrane, ont été évaluées en comparaison avec la RT-PCR. Cette méthode a l'avantage, par rapport à la RT-PCR, d'être plus facile et rapide à réaliser et est moins onéreuse.

B. Matériel et méthodes

Sur base de symptômes évocateurs de gastro-entérite recueillis dans le dossier médical, 205 patients ont été sélectionnés. La détection de NoV a été réalisée dans un échantillon de chacun de ces patients à l'aide de la RT-PCR et du test rapide de la firme Meridian (figure 12). Sur base du résultat de la détection de NoV par RT-PCR (Stals *et al* 2009), le statut des échantillons a été déterminé : 63 positifs et 142 négatifs. Parmi les échantillons négatifs, nous en avons sélectionné 16 pour lesquels un autre entéro- pathogène que le NoV a été identifié, dans le but d'évaluer la spécificité du test rapide. Cinquante des 205 échantillons ont été recueillis durant des épidémies nosocomiales à NoV et ont bénéficié d'une caractérisation génétique des souches de NoV.

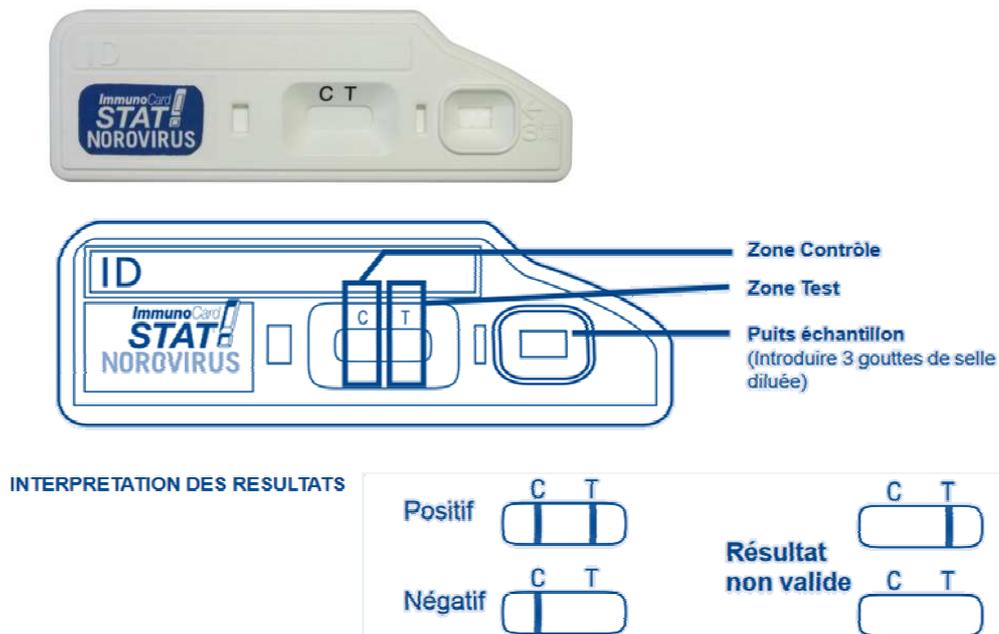


Figure 12. ImmunoCardSTAT!®Norovirus : carte test et interprétation des résultats.

C. Résultats

C.1. Détection moléculaire et génogroupes

Dans les 63 échantillons de patients évalués positifs parmi les 205 échantillons testés par la méthode RT-PCR développée, le NoV GI a été identifié dans 1 des 63 échantillons et le NoV GII dans les 62 autres.

C.2. Concordance entre le test antigénique et la RT-PCR développée

La concordance globale entre le test rapide ImmunoCardSTAT!®Norovirus et la RT-PCR développée était de 81,5% (tableaux XII et XIV), et de 80% en ne prenant en considération que les 50 échantillons de patients prélevés en phase aiguë lors d'épidémies de gastro-entérites à NoV (intervalle de confiance (IC) : 95%) (tableaux XIII et XIV).

| | | RT-PCR | | |
|------------------------|---------|---------|---------|-------|
| | | Positif | Négatif | Total |
| ImmunoCard STAT!NoV | Positif | 31 | 6 | 37 |
| | Négatif | 32 | 136 | 168 |
| Total | | 63 | 142 | 205 |

Tableau XII. Résultats obtenus pour la totalité des échantillons à l'aide du test rapide ImmunoCardSTAT!®Norovirus et la RT-PCR.

| | | RT-PCR | | Total |
|------------------------|---------|---------|---------|-------|
| | | Positif | Négatif | |
| ImmunoCard STAT!NoV | Positif | 22 | 0 | 22 |
| | Négatif | 10 | 18 | 28 |
| Total | | 32 | 18 | 50 |

Tableau XIII. Résultats obtenus pour les 50 échantillons de patients récoltés lors d'épidémies à NoV à l'aide du test rapide ImmunoCardSTAT!®Norovirus et la RT-PCR.

| | STAT!NoV | RT-PCR NoV | Conclusion | Remarques |
|--------|----------|---------------|-------------------|---|
| (n=10) | Négatif | Positif | Positif | Épidémie nosocomiale à NoV |
| (n=20) | Négatif | Positif | Positif | Transplanté rénal (diarrhée chronique) |
| (n=2) | Négatif | Positif | Positif | Enfant < 5 ans |
| (n=3) | Positif* | Négatif | Négatif | (Les 3 échantillons du même patient) |
| (n=1) | Positif* | Négatif | Négatif | Deux autres échantillons du même jour NEG |
| (n=1) | Positif* | Négatif | Antigène résiduel | Transplanté rénal (diarrhée chronique) |
| (n=1) | Positif* | Négatif | Négatif | - |

Tableau XIV. Résultats discordants entre le test rapide ImmunoCardSTAT!®Norovirus et la RT-PCR : détails (n = nombre d'échantillons) (* très faiblement positif, coloration rosée de la zone test à peine visible).

C.3. Performances du test antigénique

La sensibilité, la spécificité et l'exactitude du test rapide ImmunoCardSTAT!®NoV ont été calculées en prenant pour référence les résultats obtenus à l'aide de la RT-PCR développée. Des valeurs de sensibilité et de spécificité de 50% et de 96,3% ont été obtenues, respectivement (IC 95%) (tableau XV).

En prenant exclusivement en compte les 50 échantillons de patients provenant d'épidémies à NoV (GII.4 et GII.16), les résultats ont mis en évidence une performance accrue de la méthode par rapport à celle obtenue à partir de l'évaluation de la totalité des échantillons, avec des valeurs de spécificité et de sensibilité de 100% et de 68,8%, respectivement (IC 95%) (tableau 16).

| | Performances (%) | | | |
|---------------------------------|------------------|-------------|------------|---------|
| | Sensibilité | Spécificité | Exactitude | |
| STAT!NoV - tous les patients | 50 | 96,3 | 80,4 | (n=205) |
| STAT!NoV - épidémie nosocomiale | 68.8 | 100 | 80 | (n=50) |

Tableau XV. Performances du test ImmunoCard STAT!®NoV.

Par ailleurs, aucune interférence n'a été observée lors de l'utilisation du test rapide en présence d'autres entéropathogènes que les NoV dans les 15 échantillons testés (tableau XVI).

| Pathogène | | STAT!® NoV | RT-PCR NoV |
|-----------------------------------|-------|------------|------------|
| Virus | | | |
| Adenovirus | (n=2) | NEG | NEG |
| Rotavirus | (n=3) | NEG | NEG |
| Bactéries | | | |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | (n=3) | NEG | NEG |
| <i>Salmonella infantis</i> | (n=2) | NEG | NEG |
| <i>C.difficile</i> toxinogène | (n=4) | NEG | NEG |
| <i>C.difficile</i> non toxinogène | (n=2) | NEG | NEG |

Tableau XVI. Résultats de la détection de NoV à l'aide du test et de la RT-PCR développée dans les échantillons contenant d'autres entéropathogènes.

D. Conclusion

D'après les résultats obtenus lors de l'évaluation du test rapide immunochromatographique ImmunoCardSTAT!®Norovirus, cette méthode est très spécifique. Les résultats obtenus, proche des 100%, rejoignent ceux d'autres évaluations similaires qui rapportent des valeurs de spécificité variant de 65 à 100% selon la trousse utilisée (Morillo *et al* 2011, Khamrin *et al* 2008, Takanashi 2008, Bruins *et al* 2010, Battagliolo *et al* 2012, Kim *et al* 2012, Park *et al* 2012, Amber-Balay *et al* 2013).

Les résultats positifs obtenus à l'aide de la méthode antigénique évaluée sur des échantillons de patients négatifs par RT-PCR résultent d'une légère coloration à l'endroit de la zone test qui est surinterprétée comme positifs. Seuls les résultats fortement colorés doivent dès lors être pris en compte. Il est primordial de bien tenir en compte des instructions du fabricant lors de l'utilisation d'un test commercial afin d'éviter une surinterprétation des résultats obtenus.

En termes de sensibilité par contre, la performance du test rapide ImmunoCardSTAT!®Norovirus a cruellement fait défaut, avec la détection de NoV dans un échantillon sur deux par rapport à la RT-PCR lors de l'évaluation des 205 échantillons. Cependant, en examinant à part les résultats des prélèvements effectués lors des épidémies à NoV, la sensibilité est accrue, passant de 50 à 68,3% en raison de la quantité importante de NoV dans ces échantillons prélevés en phase aiguë de l'infection. Ce manque de

sensibilité était bien décrit dans la littérature au moment de l'évaluation du test Meridian, avec une sensibilité variant de 30 à 79% selon le contexte, épidémique ou non (Gray *et al* 2007, Bruggink *et al* 2011, Nguyen *et al* 2007).

Les performances du test antigénique ImmunoCardSTAT![®]Norovirus en font un outil de diagnostic rapide, efficace et accessible à tous les laboratoires sans nécessiter aucun équipement, mais sa sensibilité est insuffisante pour être utilisée dans le cadre du diagnostic étiologique de cas sporadiques d'infections à NoV. Dès lors, il serait souhaitable de vérifier à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire tout résultat négatif obtenu à l'aide de ce test rapide chez un patient présentant une symptomatologie évocatrice d'une gastro-entérite virale aiguë.

2. Investigation d'une épidémie de gastro-entérites à NoV en milieu hospitalier

HUYNEN Pascale, MAUROY Axel, LAMBERT Nathalie, MELIN Pierrette, DE MOL Patrick, THIRY Etienne. *Épidémie nosocomiale à norovirus : à propos d'une expérience hospitalière.*

Revue Médicale de Liège, 2019, 74 :86-89

Les NoV sont responsables de la majorité des épidémies de gastro-entérites virales aiguës dans les pays industrialisés, épidémies qui peuvent être problématiques, d'autant plus lorsqu'elles ont lieu dans collectivités confinées.

Une fois le laboratoire équipé de méthodes de diagnostic, le second objectif, visant à mieux caractériser l'implication des NoV dans les collectivités, a pu être envisagé.

A une période où peu de laboratoires belges étaient équipés de ces tests de détection des NoV, l'implémentation de ces méthodes au CHU a permis de diagnostiquer rapidement et efficacement l'étiologie d'une épidémie de gastro-entérites aiguë à NoV survenue durant l'hiver 2011-2012 dans deux salles de gériatrie localisées aux 1^{er} et 3^{ème} étages d'un hôpital de la région liégeoise. Ce fut l'occasion d'explorer un premier volet du second objectif, l'étude des NoV dans le cadre du suivi prospectif d'une épidémie dans cette collectivité en particulier : le milieu hospitalier.

RESUME

Introduction

Les norovirus (NoV) sont les principaux agents de gastro-entérites virales aiguës au niveau mondial.

Objectifs

Une épidémie de gastro-entérites s'est déclarée durant l'hiver 2011-2012 chez des patients hospitalisés dans plusieurs salles d'un hôpital de la région liégeoise, situées à deux étages différents.

Nos objectifs étaient de déterminer si une même souche de NoV était impliquée aux deux étages, et d'investiguer la manière dont l'épidémie s'était propagée d'un étage à l'autre.

Matériel et méthodes

Des prélèvements ont été collectés chez les patients et le personnel soignant. Les dossiers médicaux ont été examinés.

La détection, la quantification et la caractérisation des souches de NoV ont été réalisées par des méthodes de biologie moléculaire.

Résultats

Une même souche NoV, du génotype GII.4, a été mise en évidence chez deux patients hospitalisés aux deux étages différents. L'épidémie s'était déroulée en deux vagues.

Conclusion

La mise en évidence d'une souche de NoV GII.4 identique qu'il s'agit de la même épidémie qui s'est étendue du troisième au premier étage, vraisemblablement transmise par l'intermédiaire du personnel soignant commun.

L'identification précoce des NoV lors des épidémies est primordiale afin de mettre en place rapidement les mesures d'hygiène permettant de limiter leur propagation.

ÉPIDÉMIE NOSOCOMIALE À NOROVIRUS : À PROPOS D'UNE EXPÉRIENCE HOSPITALIÈRE

HUYNEN P (1), MAUROY A (2), LAMBERT N (3), DE MOL P (4), THIRY E (5), MELIN P (6)

RÉSUMÉ : Les norovirus humains (NoV) sont reconnus mondialement comme les principaux agents étiologiques de gastro-entérites virales sporadiques et épidémiques au niveau mondial. Une épidémie de gastro-entérites s'est déclarée chez des patients hospitalisés dans plusieurs salles d'un hôpital de la région liégeoise, situées à deux étages différents. L'objectif était de déterminer si une même souche de NoV était impliquée aux deux étages, et d'investiguer la manière dont l'épidémie se serait propagée d'un étage à l'autre. Des prélèvements ont été collectés chez les patients et le personnel soignant. Les dossiers médicaux ont été examinés. La détection, la quantification et la caractérisation des souches de NoV ont été réalisées par des méthodes de biologie moléculaire. Une même souche de NoV, du génotype GII.4, a été mise en évidence chez deux patients hospitalisés aux deux étages différents. Ce résultat indique qu'il s'agit de la même épidémie qui s'est étendue à deux étages, probablement transmise par l'intermédiaire du personnel soignant commun. L'identification précoce des NoV lors des épidémies est primordiale afin de mettre en place rapidement les mesures d'hygiène permettant de limiter leur propagation.

MOTS-CLÉS : *Norovirus - Gastro-entérite - Epidémie - Hôpital - Nosocomial*

NOROVIRUS NOSOCOMIAL OUTBREAK : THE EXPERIENCE OF A HOSPITAL IN LIÈGE, BELGIUM

SUMMARY : Human noroviruses (NoV) are the main pathogenic agents worldwide responsible for viral sporadic and epidemic gastroenteritis worldwide. A gastroenteritis outbreak broke out in patients hospitalized in several wards located in two different floors of a hospital in Liege, Belgium. The objective was to determine whether a same NoV strain would be involved in the two different floors, and to explore how this outbreak would have spread from a floor to the other. Stool samples from patients and healthcare workers were collected, as well as data from medical files. NoV detection, quantification and characterization were performed using molecular biology methods. A same NoV strain, from genotype GII.4, was detected in two patients hospitalized on the two different floors. This finding allowed to conclude that a same outbreak spread in the two floors, probably due to movements of common healthcare workers. A rapid NoV detection during outbreak is important in the aim to rapidly implement hygiene measures to limit the size of the outbreak.

KEYWORDS : *Norovirus - Gastro-enteritis - Hospital - Outbreak - Nosocomial*

INTRODUCTION

Découverts dans les années 1970, les norovirus humains (NoV) sont reconnus comme les principaux agents pathogènes responsables de toxi-infections d'origine alimentaire et d'épidémies de gastro-entérites au niveau mondial. Ils infectent toutes les tranches d'âge. Chez les enfants de moins de 5 ans, si le rotavirus reste actuellement la première cause de gastro-entérites virales, les NoV sont en passe de devenir la première cause dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été introduite.

Le traitement des gastro-entérites virales est symptomatique. L'élément clé face aux infections à NoV est de limiter leur transmission. La prévention des infections à NoV repose principalement sur l'application de mesures d'hygiène

des mains adéquates et la désinfection de l'environnement contaminé. Lors des épidémies de gastro-entérites aiguës, l'identification précoce des NoV par méthodes de laboratoire rapides ou de biologie moléculaire est primordiale afin de mettre en place rapidement les mesures d'hygiène permettant de limiter leur propagation. La diversité antigénique des NoV et le manque d'immunité protectrice à long terme rendent la mise au point de vaccins difficile.

Après avoir rappelé les aspects nosologiques des infections à NoV dans un précédent article (1), nous allons décrire, d'un point de vue pratique, les caractéristiques d'une épidémie de gastro-entérites à NoV observée dans un hôpital de la région liégeoise.

OBJECTIFS

Une épidémie de gastro-entérites à NoV s'est déclarée durant l'hiver 2011-2012 chez des patients hospitalisés dans trois salles d'hospitalisation d'un hôpital de la région liégeoise. L'épidémie a débuté dans les deux unités de gériatrie situées au 3^{ème} étage, et se serait ensuite rapidement propagée au 1^{er} étage, dans une unité de médecine interne.

Le premier objectif était de détecter la présence de NoV chez les patients symptomatiques, et de caractériser les souches de NoV afin de

(1) Chef de Clinique, (6) Professeur et Chef de Service, Service de Microbiologie Clinique, CHU de Liège, Liège, Belgique

(2) Médecin vétérinaire, Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA), Bruxelles, Belgique.

(3) Chef de Service, Hygiène hospitalière, Clinique André Renard, Herstal, Belgique.

(4) Professeur Honoraire, Liège Université, Liège, Belgique.

(5) Professeur, Chef de service, Virologie vétérinaire-Maladies virales animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Centre FARAH, Liège Université, Belgique.

déterminer si une même souche de NoV pouvait être impliquée aux deux étages de l'hôpital.

Le second objectif fut de tenter d'identifier la source, et d'explorer la chronologie et la propagation de l'épidémie. Dans le cas précis où une même souche de NoV serait identifiée chez des patients des deux étages différents, il y aurait lieu d'investiguer la manière dont l'épidémie pourrait s'être propagée d'un étage à l'autre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'hôpital dans lequel l'épidémie a eu lieu est un petit hôpital régional, doté de 160 lits d'hospitalisation répartis dans un seul et même bâtiment comportant 4 étages. Les patients et le personnel soignant présentant une gastro-entérite aiguë ont fourni un échantillon de selles le plus tôt possible après le début des symptômes, afin de réaliser le diagnostic étiologique de leur tableau clinique. Les échantillons ont été envoyés au laboratoire de biologie clinique de l'hôpital concerné afin de réaliser une culture bactérienne classique.

Pour chacun de ces échantillons, un aliquote a été envoyé au laboratoire de Microbiologie Clinique du CHU de Liège afin de réaliser une recherche de NoV. La détection et la quantification des NoV des génogroupes I, II et IV ont été réalisées à l'aide d'une RT-PCR quantitative en temps réel «faite maison» (RT-qPCR) (2). Par rapport aux méthodes commerciales disponibles sur le marché, cette RT-PCR a les avantages de détecter le génogroupe IV en plus des génogroupes I et II, de différencier les génogroupes I et IV du génogroupe II, et de quantifier la charge virale de NoV présente dans les échantillons. Les NoV présents dans les échantillons des deux étages concernés ont ensuite été caractérisés par une méthode de séquençage des produits d'amplification et la comparaison à une banque de données.

Les données cliniques et épidémiologiques des patients hospitalisés dans les deux salles ont été collectées dans les dossiers médicaux.

RÉSULTATS

L'épidémie a concerné une salle de médecine interne située au 1^{er} étage, ainsi que les deux salles de gériatrie de l'hôpital, situées au 3^{ème} étage. Vingt-cinq patients hospitalisés (20 femmes et 5 hommes) et une aide-soignante présentant des symptômes de gastro-entérite aiguë ont fourni chacun un échantillon de selles.

Tableau I. Symptômes présentés par les 26 patients ayant fourni un échantillon

| Symptômes | Nombre de patients | % patients |
|----------------------|--------------------|------------|
| Diarrhée | 26 | 100 |
| Vomissements | 7 | 27 |
| Myalgies | 4 | 15 |
| Douleurs abdominales | 6 | 23 |
| Fièvre | 7 | 27 |

| Référence échantillon | NoV GII (copies/ml) |
|-----------------------|----------------------|
| CHU 2 | 2,4x10 ⁵ |
| CHU 4 | 3,6x10 ⁵ |
| CHU 6 | 4,2x10 ⁵ |
| CHU 7* | 399 |
| CHU 8 | 3,3x10 ⁵ |
| CHU 11 | 1,3 x10 ⁶ |
| CHU 14 | 4,5 x10 ⁶ |
| CHU 16 | 2,6 x10 ⁵ |
| CHU 17 | 5,5 x10 ⁵ |
| CHU 18 | 1,6x10 ⁶ |
| CHU 19 | 9,1 x10 ⁵ |
| CHU 20 | 8,9 x10 ⁵ |
| CHU 21 | 1,6 x10 ⁵ |
| CHU 22 | 5,7 x10 ³ |
| CHU 23 | 3,4 x10 ⁵ |
| CHU 24 | 5,7 x10 ³ |
| CHU 25 | 1,7 x10 ⁶ |

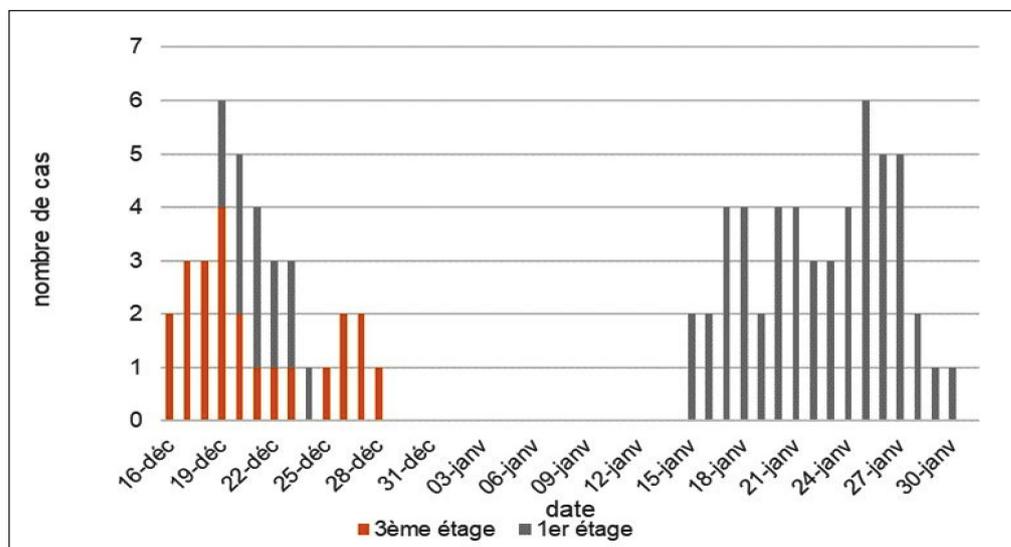
* Aide-soignante

Tableau II. Résultats de la quantification de NoV en copies génomiques/ml des 17 échantillons de patients dans lesquels la présence de NoV a été détectée

Parmi les 25 patients, 15 étaient hospitalisés au 1^{er} et 10 au 3^{ème} étage de l'hôpital. L'âge des 26 personnes s'étendait de 54 à 98 ans, avec une moyenne de 74,5 ans. Leurs symptômes et signes cliniques sont repris dans le **Tableau I**.

Les cultures bactériennes réalisées sur tous les échantillons se sont avérées négatives. La présence de NoV a été détectée chez 11 des 15 patients du 1^{er} et 5 des 10 du 3^{ème} étage, ainsi que chez l'aide-soignante, soit au total chez 17 (65,4 %) des 26 personnes prélevées. Toutes les souches de NoV détectées appartenaient au génogroupe II.

La charge virale de NoV quantifiée chez les 16 patients hospitalisés par RT-qPCR variait entre 5,7 x10⁵ et 4,5 x10⁶ copies génomiques de NoV/ml. Chez l'aide-soignante, la charge virale de NoV était de 399 copies génomiques/ml (**Tableau II**). Un séquençage complet a été réalisé sur deux échantillons de patients en provenance des deux salles, sélectionnés sur base d'une charge virale élevée. Une même souche NoV, du génotype GII.4 variant 2010, a été mise en évidence dans ces deux échantillons portant les références CHU 4 et CHU 14, provenant de patients hospitalisés respectivement au troisième et au premier étage.

Figure 1. Chronologie de l'épidémie à norovirus

Il est intéressant de retracer la chronologie de l'épidémie de NoV. Celle-ci a débuté le 16 décembre 2011 au 3^{ème} étage, et s'est ensuite rapidement propagée aux patients du 1^{er} étage (Figure 1). Un comité exceptionnel d'hygiène s'est tenu le 20 décembre, et des mesures préventives basées sur les recommandations de l'HICPAC («Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee», Etats-Unis) publiées en été 2011 ont été mises en place afin de limiter l'extension de l'épidémie (Tableau III) (3). Des patients, mais également des membres du personnel de l'hôpital, ont été infectés. Une aide-soignante qui travaillait dans les 2 étages a présenté des signes de gastro-entérite aiguë le 19 décembre. L'épidémie s'est terminée le 28 décembre, pour recommencer le 14 janvier. Seuls les patients de la salle du 1^{er} étage ont été concernés lors de cette seconde vague épidémique, qui a duré 16 jours.

DISCUSSION

L'épidémie a eu lieu durant l'hiver 2011-2012. A ce moment, la détection des NoV n'était ni demandée, ni réalisée en routine, l'analyse se faisant principalement par RT-PCR à l'aide de méthodes coûteuses et chronophages, disponibles dans les gros laboratoires de type universitaire. Ces tests de biologie moléculaire étaient inadaptés à la réalisation au coup par coup d'analyses sur des échantillons isolés. Les souches de NoV caractérisées lors de cette épidémie appartiennent au génotype GII.4, ce qui n'est pas surprenant étant donné que ce génotype est responsable de la majorité des épidémies à NoV (1).

L'aide-soignante travaillait aux deux étages. Elle a présenté une gastro-entérite aiguë mi-décembre, et a fourni un échantillon le 19

Tableau III. Mesures de prévention des épidémies nosocomiales à NoV. Adapté de MacCannel et coll, 2011

Éléments clés pour limiter la transmission des NoV lors d'une épidémie nosocomiale

- **Identifier rapidement les cas suspects** de GE à NoV, informer l'Hygiène hospitalière et le laboratoire de Microbiologie
- **Prélever et envoyer rapidement** les échantillons au laboratoire pour confirmer la présence de NoV
- En l'indisponibilité d'un résultat de laboratoire rapide, utiliser les **critères de Kaplan**
- **Renforcer l'hygiène des mains**
- Appliquer les **mesures additionnelles d'hygiène** (précautions de contact, gouttelettes si nécessaire, isoler/cohorter les patients infectés)
- **Nettoyer et désinfecter** l'environnement à l'aide de produits actifs contre les NoV
- **Restreindre les déplacements** des patients, et limiter les visites
- **Personnel essentiellement dédié** à la salle où a lieu l'épidémie
- **Eviction du personnel infecté** durant 48h après la fin des symptômes

décembre, dans lequel une faible charge virale de NoV a été détectée. Cette faible quantité de virus peut être expliquée par le délai entre le début des symptômes et l'échantillonnage. Cette date correspond au moment auquel l'épidémie s'est propagée dans la salle du 1^{er} étage. Il est donc probable que cette personne soit à l'origine de la transmission du virus d'une salle à l'autre. Pour le confirmer, l'obtention de la séquence complète de la souche de NoV identifiée chez cette patiente aurait été nécessaire, ce qui n'a pas pu être réalisé en totalité.

L'origine de l'épidémie n'a pas été élucidée. Aucun des deux patients infectés en date du 16 décembre ne présentait de gastro-entérite lors de son admission à l'hôpital, et aucun cas de diarrhée n'a été relevé chez les malades ou chez le personnel dans les jours qui ont précédé l'épidémie. L'identification d'une même souche de NoV indique qu'il s'agit de la même épidémie qui s'est étendue du troisième au premier étage, vraisemblablement suite aux mouvements du personnel soignant commun y travaillant.

Deux vagues ont été observées lors de cette épidémie. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la reprise de l'épidémie. Comme l'excrétion des NoV par les personnes âgées peut perdurer durant plusieurs semaines après la rémission des symptômes, ces patients peuvent transmettre le virus à d'autres patients. Il est également envisageable, étant donné la surcharge de travail engendrée par l'épidémie pour le personnel d'entretien et la résistance des NoV dans l'environnement, que des virions aient persisté sur les surfaces contaminées, à l'origine d'une transmission indirecte des NoV. Une autre hypothèse est l'infection d'un patient par contact direct (ou indirect) avec un visiteur infecté. Cette deuxième hypothèse est d'autant plus soutenue que la prévalence de NoV dans la population générale était élevée à cette période de l'année.

Le nombre de patients atteints a diminué au fil du temps, il est intéressant d'observer une diminution du nombre de cas à partir du 21 décembre, date à laquelle le comité d'hygiène a mis en place les mesures visant à limiter la transmission virale, et de constater que l'épidémie fut relativement rapidement maîtrisée.

CONCLUSION

Les NoV sont reconnus comme le principal agent étiologique de gastro-entérites virales aiguës au niveau mondial. Les épidémies nosocomiales à NoV ont un réel impact en termes de santé publique, et peuvent engendrer des coûts considérables qui peuvent être limités par un diagnostic précoce et la mise en place rapide

des mesures préventives, essentielles pour limiter l'ampleur des épidémies.

Comme nous avons pu le constater lors de cette épidémie, la collaboration entre les différents intervenants, que ce soit au niveau médical et paramédical, l'équipe d'hygiène hospitalière et le laboratoire de microbiologie, sans oublier le personnel d'entretien, est essentielle afin de limiter la propagation de l'épidémie. L'excrétion parfois prolongée des NoV après un épisode infectieux est une notion importante dont il conviendrait de tenir compte, en raison de son impact sur la propagation des virus. Grâce à une meilleure connaissance des NoV et à une vigilance accrue du personnel, l'hôpital n'a, à ce jour, plus été confronté à une épidémie de ce type.

Il faut insister sur l'importance d'inclure la recherche de NoV dans le diagnostic différentiel d'une épidémie de gastro-entérites aiguës, mais également devant un tableau de diarrhée prolongée chez un patient fragilisé par un état d'immunosuppression ou un âge avancé. Bien que la méthode diagnostique de référence reste la détection génomique du virus par RT-PCR dans les matières fécales, une détection des antigènes viraux peut également être réalisée par une méthode immunologique rapide lorsque le prélèvement contient une charge élevée en virus, comme c'est le cas lors des gastro-entérites aiguës. Dans le contexte d'épidémies de gastro-entérites aiguës, les performances de ces tests en font une méthode de diagnostic rapide et efficace pour la mise en place précoce de mesures prophylactiques. Ce diagnostic étiologique devrait toutefois être complété, idéalement, par un génotypage des souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. Huynen P, Mauroy A, Melin P, Thiry E.— Les norovirus, ces entéropathogènes épidémiques mondiaux méconnus. *Rev Med Liege*, 2019, **74**, 41-46.
2. Stals A, Baert L, Botteldorn N, et al.— Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII Noroviruses and murine norovirus. *J Virol Methods*, 2009, **161**, 247-253.
3. MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, et al.— Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee-HICPAC. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011, **32**, 939-69.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr P. Huynen, Service de Microbiologie, CHU Liège, 4000 Liège, Belgique.

Email : p.huynen@chuliege.be

3. Étude de l'épidémiologie clinique et moléculaire des norovirus au Burkina Faso

HUYNEN Pascale, MAUROY Axel, MARTIN Caroline, SAVADOGO Léon Blaise, BOREUX Raphaël, THIRY Etienne, MELIN Pierrette, DE MOL Patrick. *Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso.*

Journal of Clinical Virology, 2013, 58(3) :515 – 521

Les patients gériatriques hospitalisés étudiés dans le cadre de ce premier volet ne sont évidemment pas représentatifs de la population en général, comprenant des sujets sains et de tous âges. De plus, les souches de NoV mises en évidence lors des épidémies sont loin d'être le reflet de l'ensemble des souches circulant dans la population.

L'opportunité d'étudier les NoV en Afrique a ouvert un volet supplémentaire au second objectif. Les caractéristiques des NoV indiquent qu'il est important d'étudier l'impact des NoV chez les patients symptomatiques mais également chez les sujets sains, qui plus est dans une partie du globe où peu de données sont disponibles quant à la prévalence des NoV et la caractérisation des souches circulantes.

RESUME

Introduction

Les norovirus (NoV) sont la cause majeure de gastro-entérite au niveau mondial. Peu de données épidémiologiques décrivant les souches de NoV circulantes sont actuellement disponibles dans les pays d'Afrique.

Objectifs

Déterminer la prévalence des NoV à Bobo Dioulasso (Burkina Faso) chez les patients asymptomatiques et chez ceux présentant les symptômes de gastro-entérite.

Matériel et méthodes

Des patients avec et sans troubles gastro-intestinaux ont été sélectionnés. Les données cliniques et épidémiologiques, de même que des échantillons de selles, ont été collectés de mars) avril 2011.

Une détection moléculaire (génogroupe et génotype) et une quantification virale ont été réalisées sur tous les échantillons.

Résultats

La présence de NoV a été détectée dans 22.2% des 418 échantillons collectés (21,2% et 24.8% des 293 patients symptomatiques et des 125 patients asymptomatiques respectivement).

La distribution des génogroupes était de 7.5%, 10.2% et 3.4% pour GI, GII et GI/GII respectivement parmi les patients symptomatiques, et de 12%, 11.2% et 1.6% for GI, GII et GI/GII, respectivement, parmi les patients asymptomatiques. Les valeurs moyennes de charge virales étaient plus élevées chez les patients symptomatiques que chez les patients asymptomatiques pour GI ($p = 0.03$) mais pas pour GII.

L'analyse phylogénique a montré un haut degré de diversité de génotypes, aussi bien chez les patients symptomatiques qu'asymptomatiques.

Une séquence recombinante GII.7/GII.6 a été détectée, à notre connaissance, pour la première fois.

Conclusions

Cette étude a permis de donner une image à un moment donné de l'épidémiologie moléculaire spécifique des souches de NoV circulant dans un pays représentatif d'Afrique de l'Ouest, et a de plus montré que les patients asymptomatiques pourraient jouer un rôle de 'réservoir' important.

Un haut degré de diversité génétique a été mis en évidence, avec une proportion étonnamment élevée de NoV GI en comparaison avec les génotypes habituellement rapportés dans des études épidémiologiques similaires.



Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso



Pascale Huynen^{a,*}, Axel Mauroy^{b,1}, Caroline Martin^c, Léon G. Blaise Savadogo^d, Raphael Boreux^a, Etienne Thiry^b, Pierrette Melin^a, Patrick De Mol^a

^a Medical Microbiology Department, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

^b Veterinary Virology and Animal Viral Disease, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

^c Pasteur Institute of Bangui, Bangui, Central African Republic

^d Polytechnic University of Bobo Dioulasso, Superior Institute of Health Sciences, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2013

Received in revised form 7 August 2013

Accepted 16 August 2013

Keywords:

Norovirus
Genotyping
Human
Africa
Epidemiology

ABSTRACT

Background: Noroviruses (NoV) are a leading cause of gastroenteritis worldwide. Few epidemiological data regarding the NoV strains circulating in African countries are available.

Objectives: To determine the prevalence of NoV in Bobo Dioulasso (Burkina Faso) in both symptomatic and asymptomatic gastroenteritis patients.

Study design: Patients both with and without gastro-intestinal disorders were selected. Clinical and epidemiological data, as well as stool samples, were collected through March to April 2011.

NoV molecular detection (genogrouping and genotyping) and viral load quantification were also performed for all samples.

Results: NoV were detected in 22.2% of the 418 collected stool samples (21.2% and 24.8% from the 293 symptomatic patients (SP) and the 125 asymptomatic patients (ASP) respectively).

Genogroup (G) distribution was 7.5%, 10.2% and 3.4% for GI, GII and both GI/GII respectively among SP and 12.0%, 11.2% and 1.6% for GI, GII and both GI/GII, respectively, among ASP.

Average viral load values were higher in SP than in ASP for GI ($p=0.03$) but not for GII.

Phylogenetic analysis showed a high degree of genotype diversity in SP and ASP. One recombinant GII.7/GII.6 sequence was, to the best of our knowledge, detected for the first time.

Conclusions: This study enabled identification of the specific molecular epidemiology of NoV strains circulating in a representative country in Eastern Africa, and additionally showed that ASP could play an important “reservoir” role. A high strain diversity was detected with a surprisingly high proportion of NoV GI compared to the common genotypes usually reported in comparable epidemiological studies.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

In developing countries, diarrheal diseases are a major cause of morbidity and mortality, causing more than 1 billion cases of diarrhoea and with 2.5 million deaths occurring in children under 5 years-old between 2000 and 2003 [1]. Epidemiological studies carried out in a range of (mostly industrialised) countries have highlighted Noroviruses (NoV) as the leading non-bacterial agent of gastroenteritis outbreaks in both children and adults, and as an

important cause of sporadic gastroenteritis [2]. NoV are single-stranded RNA, non-enveloped viruses belonging to the family *Caliciviridae*, genus *Norovirus*. The genus *Norovirus* has been separated into five genogroups (GI to GV) on the basis of genetic analysis. Genogroups I, II and IV include strains that infect humans [3]. Each genogroup is further divided into several genotypes that in turn comprise several variants, reflecting the high genetic diversity of NoV driven by quick viral evolution (mutations, recombination) typical of such RNA viruses.

NoV are transmitted through the faecal-oral route, either by direct person-to-person spread or indirect transmission routes. The clinical course is characterised by short incubation period (12–48 h), acute-onset vomiting, watery non-bloody diarrhoea with abdominal cramps, fever and nausea [4]. Recovery is usually complete after 2 or 3 days. However, more prolonged courses of illness and virus shedding can occur, particularly among young

* Corresponding author at: Medical Microbiology Department, University Hospital of Liège, Sart Tilman, B23, B-4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 24 39; fax: +32 4 366 24 40.

E-mail address: P.Huynen@chu.ulg.ac.be (P. Huynen).

¹ The two authors contributed equally to this work.

Table 1
Results for molecular detection of noroviruses in symptomatic/asymptomatic populations from different African countries.

| Country | Sampled population (number of included patients) | Enteric symptomatology (S ^a /AS ^b) | Percentage of positive samples | Note | Reference |
|--------------|--|---|--------------------------------|----------------------------|-----------|
| Cameroon | 5–15 y (54) | AS | 29.6 | GI.3, GII.4, 8, 17 | [23] |
| Libya | <5 y (239) | S | 15.5 | | [24] |
| Tanzania | <5 y (280) | S | 13.7 | | [25] |
| South Africa | <2 y (252) | S | 14.3 | | [26] |
| Botswana | Children (100) | S/AS | 24 | S:22%; AS:31% | [18] |
| Egypt | <18 y (169) | S | 26 | GII.4» | [12] |
| Tunisia | <12 y (788) | S | 16.2 | GII.4 » GI.2, 4, GII.1, 4, | [27] |
| | Children (632) | S | 17.4 | 14, b/2, b/3 | [28] |
| Ghana | <11 y (367) | S/AS | 7 | GII » GI | [29] |
| | Children (367) | S/AS | 10 | | [19] |
| | Children (82) | S | 15.9 | GII » GI | [30] |
| Madagascar | Children (237) | S | 6 | GII » GI(.1, 3, 4) | [31] |
| Malawi | <5 y (398) | S | 6.5 | | [32] |

G: genogroup.

^a Symptomatic.

^b Asymptomatic.

children, elderly and immunocompromised [5] patients. In these specific populations, increased morbidity and mortality has been demonstrated [6–8].

Currently, diagnosis of NoV infection mainly relies on the detection of viral RNA sequences in the stools of affected persons, by means of RT-PCR assays. Commercial ELISA detecting NoV antigens are very specific tests, but currently exhibit inadequate sensitivity [9,10] to be useful for the diagnosis of sporadic cases.

Many studies describe molecular NoV epidemiology worldwide. However, few data are available about the specific NoV strains circulating in African countries. Up until now, NoV have been molecularly detected in (usually children's) stool samples from both symptomatic and asymptomatic populations from some African countries, with detection rates ranging from 6% to 29.6%. Moreover, studies including non-diarrhoeic patients were very rare (Table 1). When genotyping was performed, the large majority of these studies identified a higher prevalence of GII NoV. However, NoV from both genogroups were also detected in urban and rural river waters as well as in sewage waters from some African countries (namely Ghana, Kenya, Tunisia and Egypt) [11–14]. No epidemiological study has previously been performed in the Sahelian region.

2. Objectives

The aims of this study were: (1) to clarify the molecular prevalence of NoV in both rural and urban areas of Bobo-Dioulasso (Burkina Faso's second city), in children both exhibiting and not exhibiting gastro-enteritis symptoms; (2) to quantify the viral load excreted; and (3) to perform genotyping of the circulating strains.

3. Study design

3.1. Sampled population

To be included in the study patients had to meet the following inclusion criteria: children, either (a) with diarrhoea or

Table 2
Primers and probes used for NoV detection by real time RT-PCR.

| Primers/probes | Sequence (5'–3') | Polarity | Final conc. | Fluorophore (5') |
|----------------|-----------------------------|----------|-------------|------------------|
| NoV GI/IV | | | | |
| QNIF4 | CGCTGGATGCGNTTCCAT | + | 500 nM | |
| NV1LCR | CCTTAGACGCCATCATCATTTAC | – | 900 nM | |
| NVGG1p | TGGACAGGAGAYCGCRATCT | + | 100 nM | 6-FAM |
| NoV GII | | | | |
| QNIF2 | ATGTTACAGRTGGATGAGRTTCTCWGA | + | 500 nM | |
| COG2R | TCGACGCCATCTTCATTACA | – | 900 nM | |
| QNIFS | AGCACGTGGGAGGGCGATCG | + | 100 nM | JOE |

liquid stool samples, or (b) without gastro-intestinal disorder for at least 15 days before the sampling. One stool per patient was collected.

Patients ($n=418$) were recruited from across Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, over an 8 week period (March–April 2011). Sampling was initially performed during medical consultations in one of the four health care centres (Accart-Ville, Colsama, Colma and Dô). However, footfall was low at the Care Centres, and as a result there were not enough samples collected ($n=4$). The remaining specimens were collected during a campaign against child malnutrition in two areas of Bobo-Dioulasso (Belleville and Colsama) ($n=231$), and during medical consultations in private homes organised for this survey ($n=183$).

3.2. Clinical and epidemiological data

A case report form gathering clinical and general information was filled in by each study participant or his/her parents before sampling. This case report form included personal data and usual gastro-intestinal and/or general symptoms observed during the previous 2 weeks, and aimed to differentiate symptomatic from asymptomatic patients.

3.3. Sample treatment and analysis

One gram of stool sample was 10-fold diluted in a PBS–azide 0.01% solution and centrifuged (3000 rpm – 5 min). The supernatant was transferred into new tubes for storage at 4 °C until their transport to Belgium. The specimens were transported to Belgium at room temperature.

Molecular detection of NoV in stool samples was performed in the Medical Microbiology Department of the University of Liège, Belgium. The RNA was automatically extracted on a Maxwell instrument (Promega, Leiden, The Netherlands) using the 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit (Promega, Leiden, The Netherlands), following manufacturer instructions. The extracted RNA was

Table 3
Epidemiological data for the 293 symptomatic and 125 asymptomatic patients.

| | Symptomatic | Asymptomatic | Proportion of symptomatic patients |
|----------------------------------|-------------|--------------|------------------------------------|
| Age | | | |
| 0–6 m | 24 | 3 | 0.89 |
| 7–12 m | 75 | 13 | 0.85 |
| 13–36 m | 116 | 45 | 0.72 |
| 3–5 y | 65 | 62 | 0.51 |
| 6–10 y | 13 | 2 | 0.87 |
| Sex | | | |
| Male | 137 | 53 | 0.72 |
| Female | 156 | 72 | 0.68 |
| Place | | | |
| Colsama | 86 | 44 | 0.66 |
| Belleville | 142 | 81 | 0.63 |
| Accart Ville | 28 | 0 | 1 |
| Colma | 33 | 0 | 1 |
| Dô | 4 | 0 | 1 |
| Source of water | | | |
| Tap water | 263 | 96 | 0.73 |
| Drilling | 10 | 5 | 0.67 |
| Well | 6 | 1 | 0.85 |
| Unknown | 14 | 23 | 0.38 |
| Number of habitants/house | | | |
| Mean (min–max) | 5.9 (2–20) | 6.3 (2–24) | |

diluted into 50 µl nuclease free water and stored at –80 °C until RT-PCR.

To detect NoV, RNA was submitted to real-Time RT-PCR according to the methodology outlined by Stals et al., 2009. Briefly, it was carried out in a 20 µl reaction mix containing 5 µl of template RNA, 6.25 µl of Taqman® Fast Virus 1-Step Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) containing a ROX fluorophore used as passive reference, 1 µl of each primer and probe (sequences and concentrations in Table 2), and 2.5 µl of CY5 Inhibition Control. The use of two different labelled probes, targeting conserved ORF1-ORF2 junction regions, allows discrimination of GI and GIV from GII in one single reaction. Positive internal controls were used in each reaction and consisted of plasmids containing a 100 bp amplicon for GI and a 110 bp amplicon for GII covering the primers-probe binding sites purchased by Genscript® (Piscataway, NJ 08854, USA). The multiplex real time RT-PCR was performed on a Lightcycler FAST7500® instrument (Applied BioSystem, Foster City, CA, USA) under the following cycle conditions: first (reverse transcription) at 50 °C for 5 min; then (initial denaturation and Taq activation) at 95 °C for 20 s; before 50 cycles of a denaturation step at 95 °C for 30 s and an extension step at 60 °C for 30 s.

Viral load was estimated by a quantification using recombinant GI and GII plasmids with known DNA concentrations, successively diluted 10-fold with the aim of obtaining a standard curve by single-plex real-time RT-PCR. The viral load was automatically calculated using the equation of linear regression.

Table 5
Results of norovirus detection and genogrouping by real time RT-PCR in stool samples from symptomatic and asymptomatic patients from Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

| Patients | NoV detection | | | | | Genogrouping | | | | | |
|--------------|---------------|----------|----|----------|----|--------------|----|-----|----|-------|---|
| | Total | Negative | | Positive | | GI/IV | | GII | | Mixed | |
| | | N | N | % | N | % | N | % | N | % | N |
| Symptomatic | 293 | 231 | 79 | 62 | 21 | 22 | 8 | 30 | 10 | 10 | 3 |
| Asymptomatic | 125 | 94 | 75 | 31 | 25 | 15 | 12 | 14 | 11 | 2 | 2 |
| Total | 418 | 325 | 78 | 93 | 22 | 37 | 9 | 44 | 11 | 12 | 3 |

Table 4
Frequency of reported symptoms in the 293 symptomatic patients.

| Symptoms | N | % |
|----------------|-----|-----|
| Diarrhoea | 293 | 100 |
| Abdominal pain | 126 | 43 |
| Fever | 87 | 30 |
| Vomits | 64 | 22 |
| Muscular pain | 49 | 17 |
| Shiver | 39 | 13 |

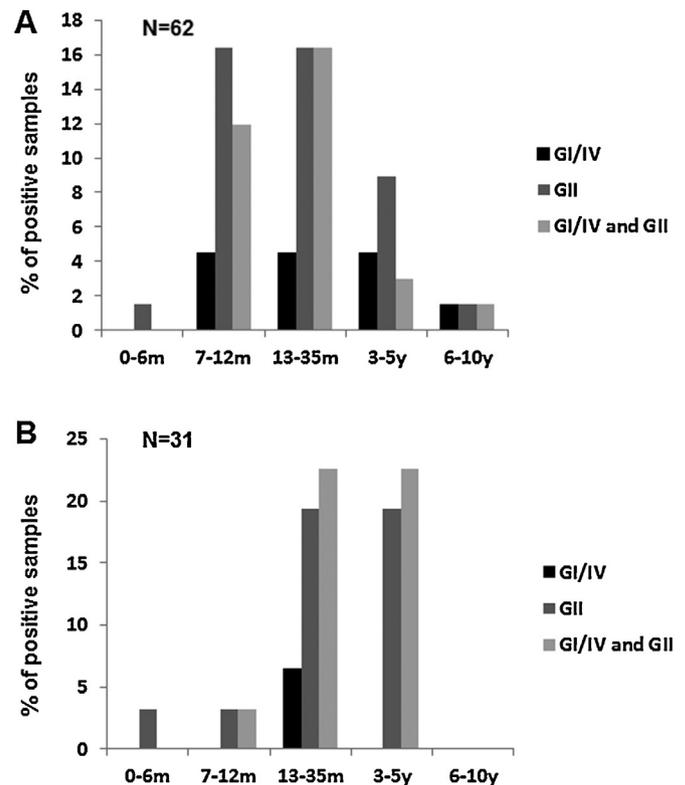


Fig. 1. Repartition of the NoV genogroups detected by real time RT-PCR among different age categories in symptomatic (A) and asymptomatic (B) patients from Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

3.4. Norovirus genotyping and bioinformatic analysis

Some NoV positive samples were molecularly characterised (samples giving a Ct value below an arbitrarily selected cut-off of 26). Briefly, RNA was first reverse transcribed with the iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Hercules, CA, USA) and submitted to different PCR reactions using Taq DNA polymerase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium), targeting both the polymerase (pol) region (ORF1) and the overlapping region between ORF1 and the start of the capsid (cap) region (ORF2). The pol region was amplified with primer pair JV12y-JV13i (ATACCACTATGATGCAGAYTA; TCATCAT-CACCATAGAAIGAG; [15]) and the overlapping region was amplified with the JV12y-GIISKR (CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT; [16]) using

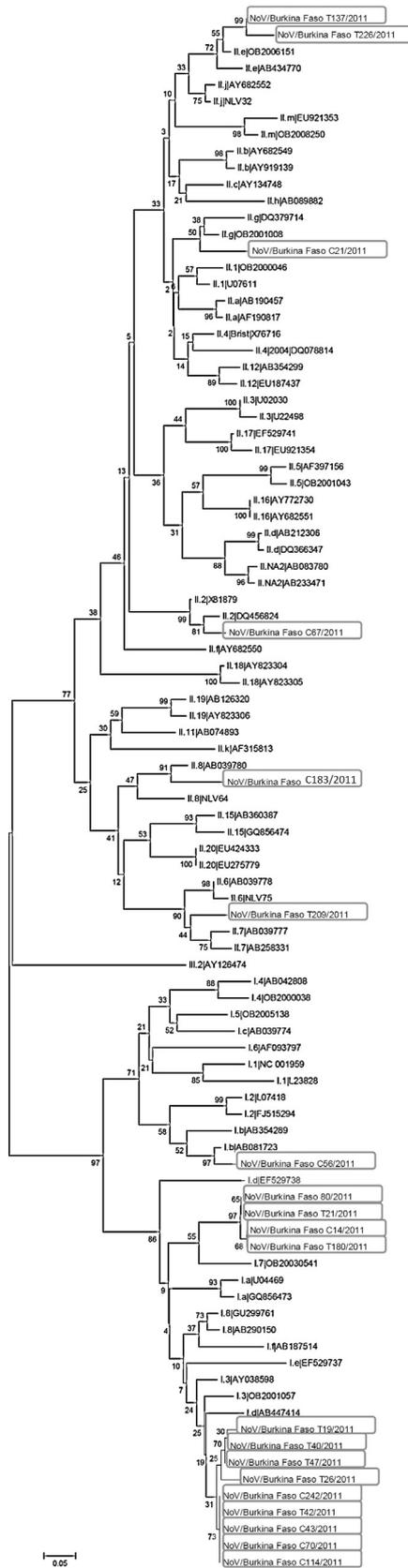


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on a partial RNA-dependent RNA polymerase coding region (178 nt) of 20 norovirus strains (framed) detected during the study in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, and human reference strains. The scale bar represents the phylogenetic distance expressed as expected nucleotide substitutions per site. Bootstrap values (1000 replicates) are shown. Accession numbers in GenBank: KF434302 (C21), KF434303 (C67), KF434304 (T137), KF434305 (T209),

a melting temperature of 48 °C and 46 °C, respectively, for the two pairs.

PCR were then submitted to gel electrophoresis. Putative positive amplicons were excised from the gel, purified with the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), then either first cloned into pTOPO-XL vector (Invitrogen, Paisley, UK) or directly sequenced with the BigDye terminator kit version 3.1 (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA) and resolved with an ABI 3730 automatic capillary sequencer (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analysed with the BioEdit Sequence Editor software (version 7.0). Nucleotide similarity with the NCBI genetic database was assessed using the BLAST tool (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Phylogenetic inference was performed with the MEGA version 4 software package [17]. Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method with the Kimura 2-parameter + γ distribution as substitution model, and including the reference sequences available on the Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/norovirus/typingtool>). The confidence values of the internal nodes were calculated by performing 1000 bootstrap replicates values. Genetic recombination was analysed using a sliding-window (200 bp) genetic diversity plot (Simplot software version 3.5.1 available at <http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRSoftware>).

3.5. Statistical analysis

A Student's *t*-test was applied to log viral loads to compare the results obtained in the two patient groups, using the Statistica software (version 9).

4. Results

4.1. Clinical and epidemiological data

Clinical and epidemiological data are given in Tables 3 and 4. The selected patients were children younger than 11 years in both symptomatic and asymptomatic categories.

4.2. Molecular diagnosis of norovirus infection and genogrouping

Results of NoV detection and genogrouping by real time RT-PCR are given in Table 5. Of the 418 samples, a similar NoV prevalence was found in both symptomatic and asymptomatic patients. Indeed, NoV were detected in 22.2% of all samples, with 21.2% and 24.8% of positive results in pathological and nonpathological samples respectively.

The apparent molecular prevalence of the different genogroups was 7.5% for GI/IV, 10.2% for GII and 3.4% for both GI/IV and GII among samples of symptomatic patients, and was 12.0% for GI/IV, 11.2% for GII and 1.6% for both GI/IV and GII among samples of asymptomatic patients. The average age of patients positive for NoV infection was 2.1 years old and 2.6 years old in symptomatic and asymptomatic patients respectively. No NoV were detected in any samples from asymptomatic patients older than 5 years, while NoV were detected in samples from symptomatic patients of all age groups. The distribution of genogroups depending of the age of symptomatic/asymptomatic patients is represented in Fig. 1.

Mean viral loads were estimated for viruses from each genogroup. In pathological samples, a mean viral loads value of

KF434306 (80), KF434307 (C14), KF434308 (C56), KF434309 (C70), KF434310 (C114), KF434311 (C242), KF434312 (T19), KF434313 (T21), KF434314 (T26), KF434315 (T40), KF434316 (T42), KF434317 (T180); accession numbers for reference strains available upon request.

3.15×10^6 and 1.53×10^5 genomic copies/ml were found for viruses from genogroups I/IV and II respectively. In nonpathological samples, a mean viral loads value of 1.91×10^5 and 8.91×10^5 genomic copies/ml were found for viruses from genogroups I/IV and II respectively.

Statistical analysis (Student's *t*-test) showed a significant difference between the average log of viral loads for NoV GI/IV between the groups of patients with and without diarrhoea, with a *p* value of 0.03. For GII excreted viral loads, no statistically significant difference was shown between symptomatic and asymptomatic patients.

4.3. Genotyping

Twenty-seven samples (16 from symptomatic and 11 from asymptomatic patients) showed a Ct value below 26, and these were subjected to conventional RT-PCR. Among them, 19 gave amplicon with the JV12y-JV13i primer pair and 3 gave amplicon with the JV12y-GIISKR primer pair. After purification, these fragments were cloned into pTOPO-XL. Sequencing reactions performed on pol amplicons allowed the identification of strains phylogenetically related to those belonging to GI.b (clustering closed from GI.2), GI.d (clustering closed from GI.3), GI.7, GII.g and GII.e (clustering closed from GII.4 and GII.12), GII.2, GII.7 and GII.8 (Fig. 2). Among the JV12y-GIISKR amplicons, two were phylogenetically related to GI.3 (Hu/T40/2011/BF) and GI.4 (Hu/T137/2011/BF) in their cap region. They were, respectively, phylogenetically related to GI.d and GII.e in their pol region (Fig. 3). The latter, Hu/T209/2011/BF, was phylogenetically related to GII.6 in its cap region. As its pol region was closed from GII.7, Hu/T209/2011/BF was identified as a recombinant strain and the recombination breakpoint was located within the ORF1-ORF2 overlapping region (Fig. 4). The entire sequence of Hu/T137/BF was determined to be more phylogenetically related to the Sydney 2012 variant than to other GII.4 variants (New Orleans 2009, 2006a, 2006b, Hunter, Sakai, Farmington Hill, Grimsby, Camberwell, Lordsdale) by different methods (blast, pairwise distance and phylogeny; data not shown).

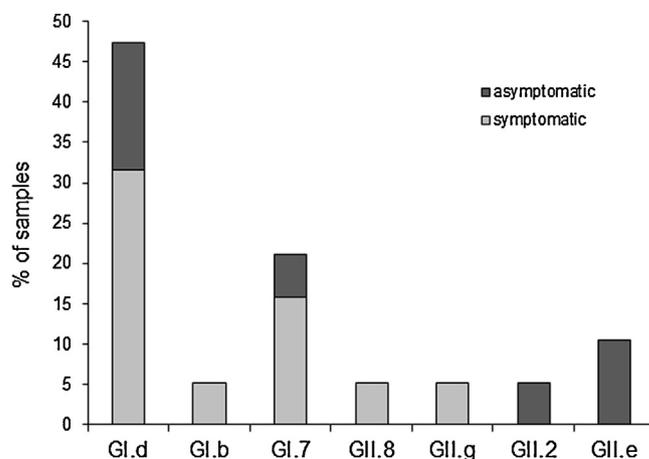


Fig. 3. Distribution of NoV genotypes in stool samples of 12 symptomatic and 7 asymptomatic patients from Bobo Dioulasso, Burkina Faso obtained from PCR performed on the polymerase region.

5. Discussion

Diarrhoeal diseases remain an important cause of morbidity and mortality in developing countries. In many African countries molecular diagnostic methods for viral gastro-enteritis are difficult to access, and consequently few epidemiological data are available on either viral gastro-enteritis in general, or those due to NoV in particular.

This study has highlighted a high molecular prevalence of NoV in collected samples. Indeed, NoV have been detected in 21% and 25% of pathologic and non-pathologic samples respectively.

The apparent molecular prevalence of NoV in Burkina Faso is close to the results obtained in other studies performed in Africa [18,19]. The low level of hygiene and sanitation in these regions, together with low access to potable water, should facilitate the spread of NoV strains.

From statistics performed on the Ct values and the inferred genomic copies, their correlation to symptoms of gastro-enteritis

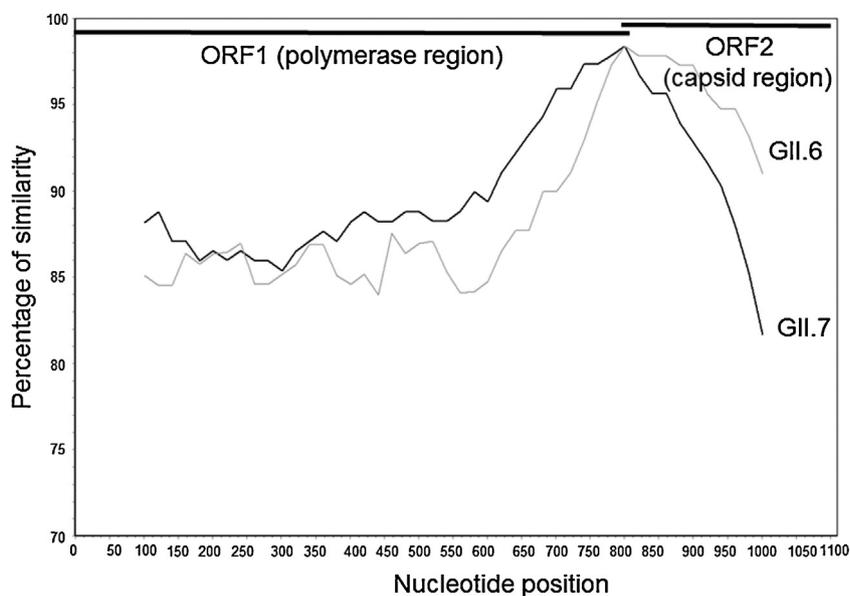


Fig. 4. Sliding window nucleotide identity plot of a partial coding region for the RNA-dependent RNA polymerase (3' end of open reading frame 1) and the 5' extremity of ORF2 coding the single capsid protein of the Hu/NV/T209/11/BF genome (GenBank accession number: KF434305), compared with GII.6 (Hu/NV/SU16/97/JIP, GenBank accession number: AB039778) and GII.7 (Hu/NV/SU4/96/JIP, GenBank accession number: AB020556) reference strains. Analysis performed with the Simplot software. Nucleotide positions are reported on the X-axis and percent similarity on Y-axis.

with GII with GII NoV appears to be poor at times while, as expected, higher Ct values were found in asymptomatic patients for GI NoV.

Considering the distribution of the detected NoV sequences across different age groups (Fig. 1), children under 5 years-old could represent a “reservoir” for continuing excretion of the different NoV strains, and in particular the asymptomatic ones. As no adult samples were analysed, in particular from elderly populations (known to excrete NoV during prolonged periods after infection [20]), the epidemiological role of this age class should be studied in the geographical study area, as well as in other African and developing countries.

For genotyping, only samples giving a Ct value higher than 26 were arbitrarily selected. Following sequencing and phylogenetic analysis, a high degree of genotypes diversity was found in both symptomatic and asymptomatic patients (Figs. 2 and 3). Surprisingly, very few GII.4-related strains were detected during this study. If a lack of sensitivity of the primer pairs used cannot be avoided regarding the currently circulating GII.4 strains, another explanation could also be proposed: either a consistent difference in NoV epidemiology might be found between developed and developing countries, or these strains could be more associated with outbreaks in closed communities and populations (as regularly reported in studies from Europe and North America). More epidemiological studies are needed to clarify or confirm this difference in African countries.

According to the Simplot analysis and to the current concepts of genetic classification in the genus *Norovirus*, the strain Hu/NV/T209/2011/BF was identified as a recombinant strain and, to the best of our knowledge, represents the first report of a GII.7/GII.6 recombinant strain. As expected in most recombinant NoV strains [21,22], the recombination breakpoint was located in the ORF1-ORF2 overlapping region. Interestingly, and despite the relatively high number of detected co-infections, no intergenogroup recombinant strain could be shown here.

6. Conclusion

This study has enabled clarification of the molecular epidemiology of NoV strains circulating among symptomatic and asymptomatic inhabitants from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. Asymptomatic children less than 5 years could play an important role as virus “reservoir” for NoV infections. It has also highlighted that even if GII strains – and more precisely those belonging to GII.4 – are at present typically detected in clinical symptomatology associated with NoV infections worldwide, GI strains are excreted in equal to higher proportion in the environment. The origin of this epidemiologic feature (i.e. higher rates of clinical disease caused by GII, but higher prevalence of asymptomatic carriers of GI), even if partially explained by differences in (a) genetic sensitivity of the population, and (b) at the levels of immunity and viral evolution, is still to be solved.

Funding

None.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

The Medical Ethics Committee of the Faculty of Medicine (University of Liège, Belgium) has accepted the performance of this study (B70720111959, 2011/179).

Acknowledgments

We thank the polytechnic University of Bobo-Dioulasso and Dr. Dindané (Head of Laboratory of Dô, Bobo Dioulasso, Burkina Faso) for their contribution to this study, and the PACODEL (University of Liège, Belgium) and the A. Seghers Foundation (University of Liège, Belgium) for their financial support.

References

- [1] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365:1147–52.
- [2] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1224–31.
- [3] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312–23.
- [4] Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *NEJM* 2009;361:1776–85.
- [5] Henke-Gendo C, Harste G, Juergens-Saathoff B, Mattner F, Deppe H, Heim A. New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children. *J Clin Microbiol* 2009;47:2855–62.
- [6] Bok K, Green KY. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *NEJM* 2012;367:2126–32.
- [7] Riddie C, Paul JP, Benjamin R, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis* 2009;49:1061–8.
- [8] Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, Schneider T, et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transpl* 2009;24:1051–3.
- [9] Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1349–55.
- [10] Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KM, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microb Infect Dis* 2013;75:110–1.
- [11] Gibson KE, Opryszko MC, Schissler JT, Guo Y, Schwab KJ. Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:20–9.
- [12] Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Aho S, Pothier P, Belliot G. Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *J Appl Microbiol* 2010;108:1620–9.
- [13] Kiulia NM, Netshikweta R, Page NA, Van Zyl WB, Kiraithe MM, Nyachio A, et al. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *J Appl Microbiol* 2010;109:818–28.
- [14] Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Chouchane S, Sakly N, et al. Detection and molecular characterization of enteric viruses in environmental samples in Monastir, Tunisia between January 2003 and April 2007. *J Appl Microbiol* 2010;109:1093–104.
- [15] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100:107–14.
- [16] Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002;25:233–5.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596–9.
- [18] Mattison K, Sebunya TK, Shukla A, Noliwe LN, Bidawid S. Molecular detection and characterization of noroviruses from children in Botswana. *J Med Virol* 2010;82:321–4.
- [19] Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis* 2007;7:104.
- [20] Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *J Hosp Infect* 2010;75:42–6.
- [21] Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1079–85.
- [22] Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007;88:3347–59.
- [23] Ayuokebong J, Lindh M, Nenonen N, Tah F, Nkuo-Akenji T, Bergstrom T. Enteric viruses in healthy children in Cameroon: viral load and genotyping of norovirus strains. *J Med Virol* 2011;83:2135–42.
- [24] Rahouma A, Klens JD, Krema Z, Abobker AA, Treesh K, Franka E, et al. Enteric pathogens associated with childhood diarrhea in Tripoli-Libya. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:886–91.
- [25] Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrnel H, Mylvaganam H, et al. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatr* 2011;11:19.

- [26] Mans J, de Villiers JC, du Plessis NM, Avenant T, Taylor MB. Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa. *J Clin Virol* 2010;49:258–64.
- [27] Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Hassine M, Chouchane S, et al. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis investigated using samples collected from children in Tunisia during a four-year period: detection of the norovirus variant GGII.4 Hunter as early as January 2003. *J Clin Microbiol* 2009;47:421–9.
- [28] Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol* 2008;46:1349–55.
- [29] Silva PA, Stark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignatius R, et al. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. *J Med Virol* 2008;80:1790–8.
- [30] Armah GE, Gallimore CI, Binka FN, Asmah RH, Green J, Ugoji U, et al. Characterisation of norovirus strains in rural Ghanaian children with acute diarrhoea. *J Med Virol* 2006;78:1480–5.
- [31] Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, et al. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004–2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13:908–11.
- [32] Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, et al. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 2005;77:522–7.

4. Etude des infections à norovirus chez les patients transplantés rénaux

HUYNEN Pascale, MAUROY Axel, WEEKERS Laurent, BONVOISIN Catherine, THIRY Etienne, DE MOL Patrick, MELIN Pierrette. *Prevalence of norovirus infection and prolonged shedding in symptomatic and asymptomatic kidney transplant patients in a Belgian Hospital: a prospective study.*

Article soumis pour publication

Après avoir défini ces deux collectivités choisies pour étudier les NoV lors d'une épidémie, et dans une population en général, il manquait cependant un troisième volet au second objectif. Volet sans aucun doute le plus important pour un hôpital universitaire où plus de 2000 patients ont bénéficié à ce jour d'une greffe d'organe : étudier les NoV chez cette catégorie particulière de patients immunocompromis et en particulier chez les patients greffés rénaux. En collaboration avec le Service de Néphrologie du CHU de Liège, la prévalence des NoV chez les patients greffés rénaux a été investiguée.

RESUME

Introduction

Les norovirus (NoV) représentent une cause majeure de gastro-entérites au niveau mondial. De plus, ils sont reconnus comme agent potentiellement causal de symptômes gastro-intestinaux prolongés chez les patients immunocompromis.

Objectifs

Nous avons mené une étude prospective afin de déterminer la prévalence des infections à NoV et la durée d'excrétion des NoV chez les patients transplantés rénaux du Centre Hospitalier Universitaire de Liège (Belgique) présentant ou non des symptômes gastro-intestinaux, et pour observer l'éventuel impact d'une réduction des traitements immunosuppresseurs sur les symptômes.

Matériel et méthodes

Au total, 117 patients transplantés rénaux ont été inclus dans cette étude d'avril 2010 à février 2014 : 79 patients présentant des symptômes gastro-intestinaux et 38 patients asymptomatiques. La détection moléculaire et la quantification de la charge virale de NoV ont été réalisées sur tous les échantillons. Tous les patients chez qui la présence de NoV a été mise en évidence ont été sollicités pour fournir de nouveaux échantillons de selles afin de suivre l'excrétion de NoV dans le temps.

Résultats

La présence de NoV a été détectée chez 16,2% des patients : 19% symptomatiques et 10,5% des patients asymptomatiques. Une durée d'excrétion variant entre 9 jours et au moins 8 mois a été documentée.

Lors de la réduction du traitement immunosuppresseur, une diminution des charges virales de NoV a été observée dans les deux groupes de patients, de même qu'une amélioration des symptômes chez les patients symptomatiques.

Conclusion

Les NoV représentent un entéropathogène viral important chez les patients transplantés, qu'ils présentent ou non une symptomatologie gastro-intestinale. Nous avons mis en évidence une excrétion prolongée de NoV chez les patients transplantés rénaux avec et sans symptômes gastro-intestinaux, et un impact positif de la réduction du traitement immunosuppresseur sur la symptomatologie.

Prevalence of norovirus infection and prolonged shedding in symptomatic and asymptomatic kidney transplant patients in a Belgian Hospital: a prospective study

HUYNEN Pascale^{a#}, MAUROY Axel^b, WEEKERS Laurent^c, BONVOISIN Catherine^c, THIRY Etienne^d, DE MOL Patrick^a, MELIN Pierrette^a

^a Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

^b Federal Agency for the safety of the food chain, Brussels, Belgium

^c Department of Nephrology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

^d Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Fundamental and Applied Research on Animal and Health Centre and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium.

Corresponding author:

Pascale Huynen, M.D.

Department of Clinical Microbiology

University Hospital of Liège

Domaine du Sart Tilman, B23/2

B- 4000 Liège (Belgium)

E-mail: p.huynen@chuliege.be

ABSTRACT

Background. Noroviruses (NoV) are a leading cause of gastroenteritis worldwide. Moreover, they are recognized as a putative causative agent of prolonged gastrointestinal symptoms (GIS) in immunosuppressed patients.

Objectives. We conducted a prospective study to determine the prevalence of NoV infection and the duration of NoV excretion in kidney transplants patients of a Belgian University Hospital presenting or not gastrointestinal disorders, and to observe the putative impact of a reduction in immunosuppressive therapeutics on GIS and on NoV shedding.

Material and methods. A total of 117 kidney transplant patients were enrolled in this study from April 2010 to February 2014: 79 and 38 patients with or without GIS, respectively. NoV molecular detection and viral load quantification were performed on all specimens. All the patients detected positive for NoV were proposed to provide new specimens with the aim of following the NoV excretion.

Results. NoV were detected in 16.2% of the patients (19.0% and 10.5% from the 79 symptomatic and the 38 asymptomatic patients respectively). A NoV excretion ranging from 9 days to more than 8 months was documented.

When reduction of immunosuppressive treatment was applied, a decrease in NoV viral loads was observed in both patient groups, as well as improvement of the symptoms in symptomatic patients.

Conclusions. NoV is an important viral enteric pathogen identified in transplant patients presenting or not GIS. We highlighted a prolonged NoV excretion in kidney transplants patients with and without GIS, and a positive impact of a reduction in immunosuppressive treatment on the symptoms.

INTRODUCTION

Norovirus (NoV) were first described in 1972 after a gastroenteritis outbreak in Norwalk, Ohio (16). They are non enveloped, single stranded viruses, belonging to *Caliciviridae* family (10). NoV genome is organized in three open reading frames (ORF) and subdivided into 7 genogroups (G), based on the sequence diversity of VP1 capsid protein. The genogroups I, II and IV contain NoV human strains. Moreover, each genogroup contains several genotypes, and each genotype can contain several variants (20).

The GII genotype 4 (GII.4) strains are associated with most of worldwide viral gastro-enteritis outbreaks. New GII.4 variants strains occur every two to four years (31).

Transmission occurs by fecal-oral route, mainly person to person but also by indirect contact through contaminated surfaces, water or food. They are highly contagious. NoV are characterized by a high stability in the environment, resist well to numerous inactivation methods (22) (18), and can be excreted during a long time after the acute phase of the infection (2, 23): a high risk for originating outbreaks.

After a short incubation period (12 to 72 hours), symptoms consist in acute gastro-enteritis (1). Dehydration is the most frequent complication. Most of persons recover quickly, within 2 or 3 days. But in immunocompromised patients, duration of the symptoms can be longer, with increased risk for developing severe NoV infections and prolonged or chronic diarrhoea (3, 4, 8, 10, 12, 26).

Despite recent improvements, human NoV are not yet routinely grown in cell culture (15). Field diagnosis of NoV infection consists in antigen detection or molecular diagnosis methods on stools (36). Molecular diagnosis methods are considered as the reference method (5, 27).

There is no curative treatment against NoV (5). Treatment is therefore only supportive (6, 25). In transplanted patients, a reduction in immunosuppressive treatment (IT) is often needed to control successfully NoV infection (4).

OBJECTIVES

The first study objective was to evaluate the role of NoV in digestive disorders occurring in kidney transplanted patients (KTP), by following prospectively by molecular detection assays the NoV excretion in symptomatic and asymptomatic KTP.

Our next aim was to study the impact of IT in NoV infection and on associated gastrointestinal symptoms, by recording the presence and types of symptoms in infected patients and any change in IT.

The last objective was to evaluate if some blood groups would be a risk factor correlated with a higher prevalence of NoV.

MATERIAL AND METHODS

Sampled population. The analysis spanned a 46-month period from April 29, 2010 until February 13, 2014. The patients enrolled in this study were selected according to the following criteria: adult KTP (≥ 18 years old) clinically followed in the Nephrology Department of the University Hospital of Liège, a Belgian 900-bed clinical hospital.

Patients were divided in two categories: patients with gastro-intestinal disorders (including diarrhoea, nausea, vomits or abdominal pains) (SP) and patients without gastro-intestinal disorders since at least 15 days before the sampling (AP).

All the patients presenting NoV positive detection on their first fecal specimen were proposed to provide new stool specimens in the following months with the aim of following the duration of NoV excretion and the evolution of the viral loads.

Specimen processing and analysis. Feces specimen was ten-fold diluted in a PBS–azide 0.01% solution and centrifuged. The supernatant was stored at 4°C.

Molecular detection and viral loads quantification of NoV GI/II/IV were performed using an in-house multiplex real-time reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) assay (14, 30). Briefly, the RNA was extracted on a Maxwell instrument (Promega, Leiden, The Netherlands) using the 16-Cell-LEV-Total-RNA Purification Kit (Promega) following manufacturer instructions, then diluted into 50 μ l nuclease-free water, and stored at -80°C. Quantitative RT-PCR was carried out in a reaction-mix containing template RNA, Taqman®Fast-Virus 1-Step-Master-Mix (Qiagen, Hilden, Germany) with a ROX fluorophore used as passive reference, primers, probes and CY5 Inhibition Control, and performed on a Light cycler FAST®7500 instrument (Applied BioSystem, Foster City, CA, USA). The use of two different labelled probes, targeting conserved ORF1-ORF2 junction regions, allows discrimination of GI/GIV from GII in one single reaction. Positive internal controls were used in each reaction and consisted of plasmids containing a 100bp amplicon for GI and a 110bp amplicon for GII covering the primers-probe binding sites purchased by Genscript® (Piscataway, USA).

Viral load was quantified using recombinant GI and GII plasmids with determined DNA concentrations, successively 10-fold diluted to obtain a standard curve by singleplex RT-PCR, and automatically calculated by linear regression.

Norovirus genotyping. RNA was reverse transcribed with the iScript-cDNA synthesis kit (Biorad, Hercules, USA) and submitted to different PCR reactions using *Taq*-DNA polymerase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium), targeting both polymerase region and the overlapping ORF1-ORF2 junction regions. The polymerase region and the overlapping

region were amplified respectively with primer pairs JV12y-JV13i (19) and JV12y-GIISKR (35), using a melting temperature of 48°C and 46°C respectively for the two primer pairs. PCR were submitted to gel electrophoresis. Putative positive amplicons were excised from the gel, purified with the Qiaquick-gel extraction kit (Qiagen), then either first cloned into pTOPO-XL-vector (Invitrogen, Paisley, UK) or directly sequenced with the BigDye-terminator kit version 3.1 (Applied Biosystem) and resolved with an ABI®3730 capillary sequencer (Applied Biosystem). Nucleotides sequences were analysed with the Bio Edit-Sequence-Editor software (version 7.0). Nucleotides similarity with the NCBI genetic database was assessed using the BLAST-tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Phylogenetic inference was performed with the MEGA-version6 software package (33). Phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood method with the General Time Reversible + γ -distribution + invariant sites as substitution model, and including the reference sequences available on the Norovirus-Genotyping-Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/norovirus/typingtool>).

Detection of bacteria and parasites. A culture for enteric pathogens was performed on diarrheic specimens following standard fecal bacterial culture methods if the referencing physician requested it. In addition, the detection of toxigenic *Clostridium difficile* was performed using the chemiluminescence immunoassay LIAISON®XL (DiaSorin, Saluggia, Italy) and the Xpert®*C.difficile* molecular test, with the GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, USA) automate.

For detection of *Giardia lamblia*, both microscopic examination and antigen detection using the RIDA®SCREEN enzyme immunoassay (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) were used.

Clinical and demographic data. A case report form gathering symptoms and general information was filled in by each patient participating in this study at time of inclusion, including personal data and gastro-intestinal and/or general symptoms observed during the previous 2 weeks, to differentiate SP from AP.

For each patient, epidemiological and medical data were collected, including results for other enteric pathogens during the 15 days preceding the specimen collection. The IT was recorded for each patient, including the modifications of doses.

Statistical analysis. Results are presented as means and standard deviation or as medians and quartiles (Q1 and Q3) for continuous variables and as frequency table for categorical variables. Comparisons between the symptomatic and asymptomatic groups were done by Student-t test or chi-square test. Some parameters were log transformed to normalize the distribution. The logistic regression was used to study the relation between the presence of NoV and respectively, age, gender, delay from transplant, blood group, adjusting for the

group. Results were considered significant at the 5% critical level ($p < 0.05$). Analyses were done in SAS version 9.1.

RESULTS

Molecular diagnosis of norovirus and genogrouping. A total of 117 KTP were enrolled in this study, 79 SP and 38 AP at the time of the first sampling, providing a total of 115 stool specimens from SP and 51 from AP respectively (1 to 5 specimens per patient). NoV were detected in 33 (19.9%) of the 166 collected stool specimens.

Detailed results of NoV detection, genogrouping and quantification in SP and AP are given in Table I. NoV were identified in 15 (19.0%) SP and 4 (10.5%) AP. NoV genogrouping highlighted a higher rate of NoV GII than NoV GI/IV, with 93% and 75% NoV GII in SP and AP respectively. The prevalence of NoV and the distribution of genogroups were similar in both groups ($p = 0.25$ and $p = 0.39$, respectively). The mean log of viral loads for NoV GII did not differ between the groups of SP and AP ($p = 0.67$).

| Patients | N | NoV detection | | p-value | Genogrouping | | p-value | Viral loads | | p-value |
|--------------|-----|---------------|------------|---------|--------------|-----------|---------|-----------------|---------------|---------|
| | | Negative % | Positive % | | GI/IV | GII | | GI/IV copies/ml | GII copies/ml | |
| SP | 79 | 64 (81.0) | 15 (19.0) | 0.25 | 1 (6.7) | 14 (93.3) | 0.39 | 2074±0 | 6507±5710 | 0.67 |
| AP | 38 | 34 (89.5) | 4 (10.5) | | 1 (25.0) | 3 (75.0) | | 439±0 | 77252±194530 | |
| Total | 117 | 98 (83.8) | 19 (16.2) | | 2 (10.5) | 17 (89.5) | | | | |

Table I. Results of NoV detection, genogrouping and quantification by real time RT-PCR in the first specimen collected in all the symptomatic (SP) and asymptomatic (AP) kidney transplant patients.

Among the 15 SP who were tested positive, 6 (40%) reported an acute onset of disease and an acute gastroenteritis among family members in the last 48 hours.

The presence of NoV was related to age when adjusting for SP and AP (Odds Ratio=0.95, $p = 0.013$), indicating that presence of NoV was lower in older patients. No relation of positivity for NoV was observed with gender or delay from transplant.

NoV were detected in all age groups except >70 years old patients, in both SP and AP. The distribution of positive for NoV according to age of SP and AP is represented in Figure 1.

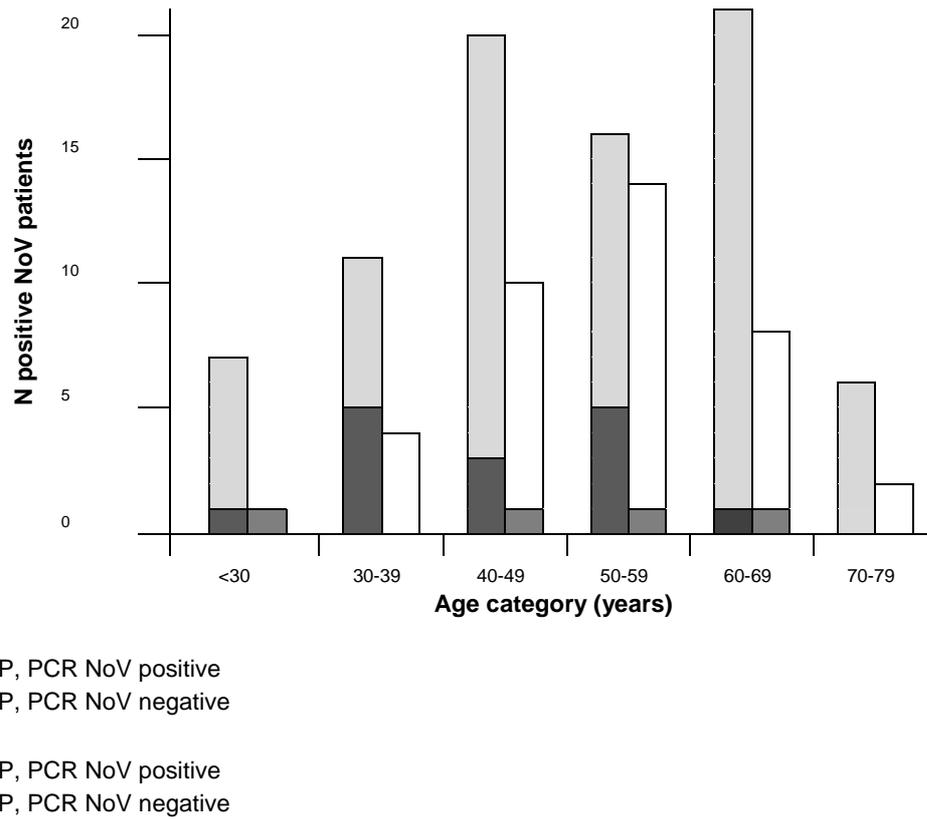


Figure 1. Proportion of detected NoV by real time RT-PCR by age category in symptomatic (SP) and asymptomatic (AP) kidney transplant patients.

Clinical and demographic data. Clinical and demographic data are given in Table II. Mean age of included patients is 52.3 ± 13.0 years old, and is identical in both patients' groups ($p=0.78$). Gender and delay from transplant are also similar between groups.

| | Symptomatic patients (n=79) | Asymptomatic patients (n=38) | |
|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| | Number (%) | Number (%) | p value |
| Age (years) | | | |
| Mean ± SD | 52.1 ± 14.2 | 52.8 ± 10.4 | 0.78 |
| <30 | 6 (7.6) | 1 (2.6) | |
| 30-39 | 11 (13.9) | 4 (10.5) | |
| 40-49 | 20 (25.3) | 10 (26.3) | |
| 50-59 | 15 (19.0) | 13 (34.2) | |
| 60-69 | 21 (26.6) | 8 (21.1) | |
| 70-79 | 6 (7.6) | 2 (5.3) | |
| Sex | | | |
| | | | 0.41 |
| Male | 50 (63.3) | 21 (55.3) | |
| Female | 29 (36.7) | 17 (44.7) | |
| Delay from transplant (months) | | | |
| Median (Q1-Q3) | 19.5 (5.4 – 60.9) | 38.2 (24.2 – 71.0) | 0.08 |
| < 6 months | 24 (30.4) | 5 (13.2) | |
| 6 months – 1 year | 7 (8.9) | 1 (2.6) | |
| 1-5 years | 27 (34.2) | 19 (50) | |
| > 5 years | 21 (26.6) | 13 (34.2) | |
| Symptoms | | | |
| Diarrhoea | 73 (92.4) | | |
| Vomits | 11 (13.9) | | |
| Abdominal pain | 33 (41.8) | | |
| Fever | 7 (8.9) | | |
| Number of stool specimens | | | |
| | 115 | 51 | |

Table II. Clinical and demographic data of symptomatic and asymptomatic renal transplant patients (NA: not applicable).

NoV characterization. Specimens from two KTP with prolonged NoV shedding, for whom we had several specimens collected at least one month apart, were selected for sequencing. Molecular NoV characterization confirmed the presence of a single genotype within each patient during periods of prolonged shedding (Table III, figure 2).

| Ref patient/ GI symptoms | Duration NoV shedding observed (days) | Stool collection date | Ct | Viral load (copie/ml) | Log copie | Genotype |
|---|--|--------------------------------------|-----------|--------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 36/ symptomatic | ≥153 | 6/2/13 | 24 | 229 469 | 5.36 | GII.4 |
| | | 5/3/13 | 25 | 92 136 | 4.96 | - |
| | | 29/4/13 | 22 | 849 979 | 5.93 | GII.4 |
| | | 9/7/13 | 39 | 7.2 | 0.85 | - |
| 88/ asymptomatic | ≥211 | 11/12/12 | 28 | 11 112 | 4.05 | GII.12 |
| | | 4/4/13 | 23 | 483 739 | 5.68 | GII.12 |
| | | 9/7/13 | 29 | 7402 | 3.87 | - |

Table III. Longitudinal follow-up of NoV shedding and characterization of their genotypes for two patients, one symptomatic and one asymptomatic at time of inclusion. (Abbreviations: GI: gastro-intestinal, Ref: reference number of the patient, Ct: cycle threshold).

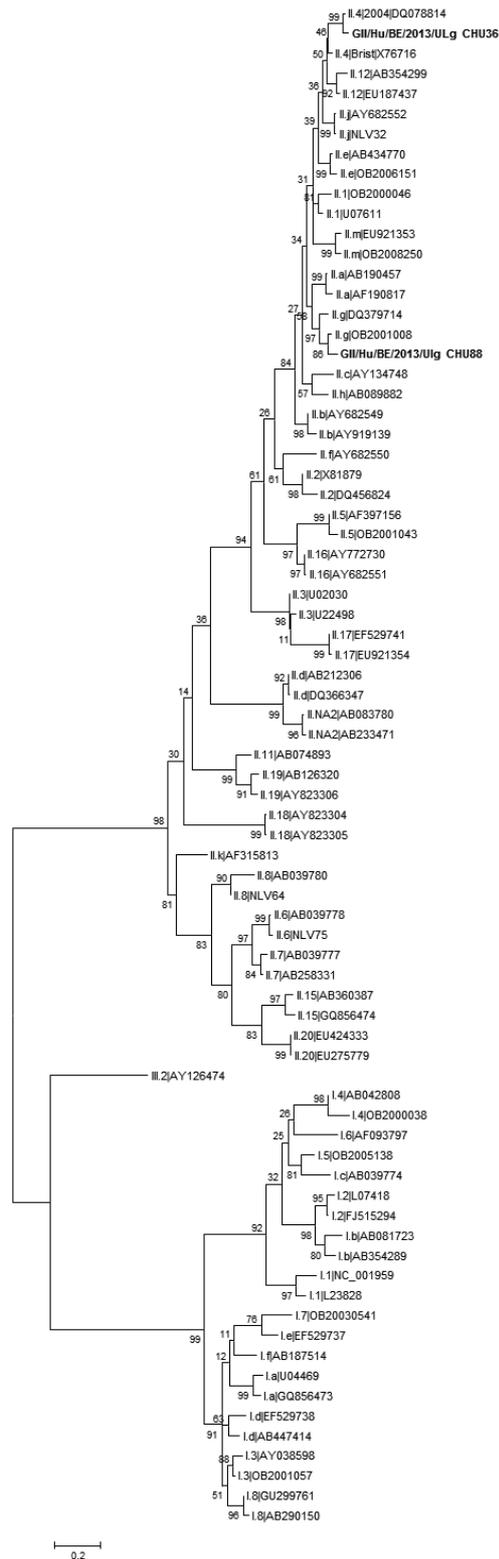


Figure 2. Molecular Phylogenetic analysis on two NoV fecal specimens by Maximum Likelihood method. Phylogenetic relationships with reference norovirus sequences of the different genotypes (on a 250 base pair-long sequence from the polymerase coding gene) were inferred by using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible substitution model+ Gamma distribution + invariant sites. The analysis involved 76 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 248 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (33).

Duration of NoV excretion. The longest NoV excretion duration was observed in a SP, who excreted NoV during at least 8 months and 8 days (>253 days). The excretion duration for the other patients varied from 3 days to 6 months in AP and SP (Table IV). We did not receive any follow-up specimen for four of the 19 patients with NoV.

The maximal NoV excretion duration did not differ between SP and AP ($p=0.72$).

| Ref. patient | Date 1 st NoV PCR positive specimen | Date late NoV PCR positive specimen | NoV excretion minimum duration (days) | Date 1 st NoV PCR negative specimen | NoV excretion duration (days) |
|------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| Symptomatic patients | | | | | |
| 3 | 11/5/2010 | 191/2011 | 253 | NA | >253 |
| 9 | 10/03/2011 | 2/8/2011 | 146 | NA | >146 |
| 20 | 5/10/2012 | NA | NA | 8/10/2012 | 3 |
| 26 | 28/1/2011 | NA | NA | 27/06/2012 | 516 |
| 36 | 6/2/2013 | 9/7/2013 | 156 | NA | >156 |
| 51 | 2/6/2010 | NA | NA | 17/11/2010 | 168 |
| 54 | 4/5/2010 | 11/8/2010 | 97 | 16/8/2011 | >97 to <469 |
| 60 | 17/4/2012 | NA | NA | 8/5/2013 | 386 |
| 63 | 28/7/2010 | 12/8/2010 | 15 | NA | >15 |
| 68 | 7/2/2012 | NA | NA | 14/2/2012 | <7 |
| 70 | 22/12/2010 | NA | NA | 8/7/2013 | >1 to <929 |
| Asymptomatic patients | | | | | |
| 88 | 11/12/2012 | 9/7/2013 | 211 | NA | >211 |
| 93 | 8/3/2013 | NA | NA | 29/8/2013 | 174 |
| 97 | 4/12/2012 | NA | NA | 27/5/2013 | 174 |
| 99 | 29/01/2013 | 20/3/2013 | 50 | NA | >50 |

Table IV. Duration of NoV excretion in kidney transplant patients who provided at least one follow-up fecal specimen (NA: not available).

Enteropathogens analysis in symptomatic kidney transplant patients. A coinfection with one of the following enteropathogens was detected in 6 (40%) out of 15 SP with NoV at the time of initial NoV testing: toxinogenic *C.difficile*, *Salmonella infantis*, *Salmonella Typhimurium*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* and *Aeromonas veronii*.

Among the 64 SP without NoV detection, we highlighted in 8 (12.5%) patients, one of the following enteropathogens: toxigenic *C.difficile*, *Salmonella species*, *Campylobacter species*, *Aeromonas species* and *Giardia lamblia*.

Treatment. All KTP receive an IT, aiming mainly at avoiding reject. The immunosuppressive drugs used in our hospital in KTP enrolled in this study are listed in table V.

Most of KTP enrolled in our study received a combination of 3 drugs: tacrolimus, mycophelic-acid (or azathioprine) and corticosteroids at high doses. Another tritherapy with cyclosporine,

mycophenolic-acid and methylprednisolone was also proposed to some patients. In every case, the dosage was adapted for each patient, depending notably on the patient's tolerance and the adverse effects.

| Drug | Action | Adverse effect : diarrhoea |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|
| Immunosuppressive treatment | | |
| <i>Cyclosporine</i> | Calcineurine inhibitor (suppress lymphocyte T activation) | No |
| <i>Tacrolimus</i> | Cyclosporine analogue | No |
| <i>Everolimus</i> | Protein kinase inhibitor | Yes |
| <i>Mycophenolic acid</i> | Antimetabolite (Guanosin synthesis inhibitor) | Yes |
| <i>Azathioprine</i> | Antimetabolite (Purines antagonist) | No |
| Corticosteroids | | |
| <i>Methylprednisolone</i> | Protein synthesis stimulation | No |

Table V. Immunosuppressive drug used in our hospital in kidney transplant patients.

Following the detection of NoV in patients, IT dosage was temporarily decreased in 9 of the 15 SP, leading to a positive impact on the symptoms in all the patients, and to a decrease of the NoV viral load in the 6 of the 9 patients who provided follow-up specimens. From the 6 SP who had no change in their IT dosage, we observed an improvement of the symptoms in 4 patients, combined with a reduction of viral loads in the 2 patients who gave follow-up specimens.

We have also observed a decrease of NoV viral loads in 1 of the 4 AP with NoV, without any change in the IT.

NoV and blood groups. The distribution of NoV positivity related to the blood group of SP and AP is represented in Table VI. The secretor status determining the phenotypic expression of histo-blood group antigen carbohydrates on the intestinal tract was not available (28). No significant relation was observed between blood group and infection with NoV.

| | Symptomatic patients | | | | Asymptomatic patients | | | |
|--------------------|----------------------|------------|-------------|-------------|-----------------------|------------|-------------|-------------|
| | N | Number (%) | NoV PCR POS | NoV PCR NEG | N | Number (%) | NoV PCR POS | NoV PCR NEG |
| Blood group | 7 9 | | | | 38 | | | |
| A- | | 10 (12.7) | 0 | 10 | | 7 (18.4) | 1 | 6 |
| A+ | | 32 (40.5) | 9 | 23 | | 11 (28.9) | 0 | 11 |
| AB+ | | 1 (1.3) | 0 | 1 | | 1 (2.6) | 0 | 1 |
| B- | | 0 (0.0) | 0 | 0 | | 1 (2.6) | 1 | 0 |
| B+ | | 4 (5.1) | 2 | 2 | | 2 (5.3) | 0 | 2 |
| O- | | 4 (5.1) | 0 | 4 | | 1 (2.6) | 0 | 1 |
| O+ | | 26 (32.9) | 4 | 22 | | 14 (36.8) | 2 | 12 |
| Unknown | | 2 (2.5) | 0 | 2 | | 1 (2.6) | 0 | 1 |

Table VI. NoV RT-PCR result and blood groups of symptomatic and asymptomatic kidney transplant patients.

DISCUSSION

Diarrhoea remains a frequent symptom in transplant patients. There are multiple possible causes, infectious or not as well as adverse effects associated to IT.

In our study, we described the clinical presentation and the prevalence of NoV among 117 adult KTP presenting or not gastro-intestinal disorders, with prevalence rate of 19% and 11% in each patient groups respectively. Our results are consistent with other studies conducted in immunosuppressed populations, in which NoV were reported in up to 25% of SP (9, 11, 37, 38).

The total number of patients enrolled in our study is quite high, regarding to the fact that KTP followed in our institute represent a restricted group. We enrolled twice more SP than AP. This could be mainly because SP have stool examination to search for an infectious origin of their gastro-intestinal troubles as part of routine testing, contrary to AP.

We have detected mainly NoV GII strains, with only 2 NoV GI/IV strains. It has been well described that GII is the most prevalent genogroup worldwide, in NoV outbreaks as well as in sporadic cases (13, 24, 29).

Furthermore, we have characterized for one SP and one AS with consecutive specimens the genotype within GII. We have highlighted NoV GII.4 in the SP and NoV GII.12 in the AP. The same GII.4 strain was observed in 2 specimens of this SP, 3 months between.

NoV GII.12, less frequent than GII.4, emerged in 2008 in Australia, and was associated with worldwide gastro-enteritis outbreaks. During winter 2009-2010, this strain was responsible for 16% of NoV gastro-enteritis outbreaks in the USA (17). The same GII.12 strain has been observed in 2 specimens of the AP, 4 months between.

NoV infection may become chronic and lead to prolonged NoV shedding in immunocompromised patients because of their inability to clear the infection (3, 7). In followed patients, we highlighted NoV excretion that varied from 9 days to >8 months. One patient seems to have a longer NoV excretion (18 months), but the delay between the two analyzed specimens is too long to exclude a re-infection.

In transplanted patients, the investigation of the gastro-intestinal troubles origins can be difficult as symptoms are usually associated to graft *versus* host disease and adverse effects of IT, which can mask NoV infections. As suggested by Bok in 2012, we also observed a positive impact of a reduction of IT on NoV viral loads in 9 of the 15 AP. However, IT was not changed among AP excreting NoV, and we also observed a decrease in NoV viral loads in 3 of the 4 AP.

Some studies suggest that patient of O phenotype would be more susceptible to NoV infections than patients of A and B blood groups (28). In our study, no significant relation was observed between blood group and NoV infection.

NoV are now recognized as an infectious agent responsible for persistent infections in immunosuppressed patients. We highlighted in our study prolonged NoV excretion in symptomatic, but also in asymptomatic KTP. Asymptomatic NoV excretion is well described. This is an important point as AP with NoV could play a role as virus 'reservoir' for NoV infections (17, 34) and could be involved in nosocomial transmissions (32). In this way, hand hygiene measures take an important part to prevent NoV transmission and outbreaks (21).

This study enabled an improvement in the knowledge of NoV shedding in Belgian KTP, and highlighted the positive impact of a reduction in IT on symptoms due to NoV infection and on the viral load.

NoV are a not enough known cause of prolonged diarrhoea in immunocompromised and solid transplant patients (11) (8, 26, 37), and screening for etiologic agents of diarrhoea in such patients should include NoV RT-PCR to improve diagnosis and treatment of persistent gastro-intestinal disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Boreux Raphaël and Toussaint Françoise from the Department of Clinical Microbiology, University of Liège, Belgium, as well as Lydie Magnée and Laura Bologne for their technical support, Arnaud Borsu from the Department of Nephrology, University of Liège, Belgium, for the logistical support, and the Nephrologists and Nephrologists in training from the Department of Nephrology, University of Liège, Belgium who contributed to this study.

We also thank Laurence Seidel from the University Hospital of Liège, Belgium, for her support in statistic analysis.

This study has been partly financially supported by the Investments Funds for the Scientifically Research provided in 2011 by the University Hospital of Liège, Liège, Belgium.

Conflict of interest declaration. Competing interest: None declared.

Agreement to be enrolled in the study. All the patients enrolled in this study received a detailed protocol of the study, marked their agreement and signed an agreement document.

Ethic committee agreement. Ethical approval: the Medical Ethics Committee of the Faculty of Medicine (University of Liège, Liège, Belgium) accepted the performance of this study (reference: B707201111431).

REFERENCES

1. **Ahmed, S. M., A. J. Hall, A. E. Robinson, L. Verhoef, P. Premkumar, U. D. Parashar, M. Koopmans, and B. A. Lopman.** 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **14**:725-730.
2. **Aoki, Y., A. Suto, K. Mizuta, T. Ahiko, K. Osaka, and Y. Matsuzaki.** 2010. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *The Journal of hospital infection* **75**:42-46.
3. **Bok, K., and K. Y. Green.** 2012. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *The New England journal of medicine* **367**:2126-2132.
4. **Brakemeier, S., S. I. Taxeidi, M. Durr, J. Hofmann, D. Schmidt, F. Bachmann, J. Gaedeke, and K. Budde.** 2016. Clinical outcome of norovirus infection in renal transplant patients. *Clinical transplantation* **30**:1283-1293.
5. **Chen, Z., S. V. Sosnovtsev, K. Bok, G. I. Parra, M. Makiya, L. Agulto, K. Y. Green, and R. H. Purcell.** 2013. Development of Norwalk virus-specific monoclonal antibodies with therapeutic potential for the treatment of Norwalk virus gastroenteritis. *Journal of virology* **87**:9547-9557.
6. **Debbink, K., L. C. Lindesmith, and R. S. Baric.** 2014. The state of norovirus vaccines. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **58**:1746-1752.
7. **Donaldson, E. F., L. C. Lindesmith, A. D. Lobue, and R. S. Baric.** 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature reviews. Microbiology* **8**:231-241.
8. **Echenique, I. A., S. Penugonda, V. Stosor, M. G. Ison, and M. P. Angarone.** 2015. Diagnostic yields in solid organ transplant recipients admitted with diarrhea. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **60**:729-737.
9. **Frange, P., F. Touzot, M. Debre, S. Heritier, M. Leruez-Ville, G. Cros, C. Rouzioux, S. Blanche, A. Fischer, and V. Avettand-Fenoel.** 2012. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *The Journal of infectious diseases* **206**:1269-1274.
10. **Green, K.** 2013. *Caliciviridae: the noroviruses*, p. 582-608, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, vol. 6th ed. Vol.
11. **Green, K. Y.** 2014. Norovirus infection in immunocompromised hosts. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **20**:717-723.

12. **Haessler, S., and E. V. Granowitz.** 2013. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *The New England journal of medicine* **368**:971.
13. **Hoa Tran, T. N., E. Trainor, T. Nakagomi, N. A. Cunliffe, and O. Nakagomi.** 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **56**:185-193.
14. **Huynen, P., A. Mauroy, C. Martin, L. G. Savadogo, R. Boreux, E. Thiry, P. Melin, and P. De Mol.** 2013. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **58**:515-521.
15. **Jones, M. K., K. R. Grau, V. Costantini, A. O. Kolawole, M. de Graaf, P. Freiden, C. L. Graves, M. Koopmans, S. M. Wallet, S. A. Tibbetts, S. Schultz-Cherry, C. E. Wobus, J. Vinje, and S. M. Karst.** 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols* **10**:1939-1947.
16. **Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, and R. M. Chanock.** 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology* **10**:1075-1081.
17. **Karst, S. M., and R. S. Baric.** 2015. What is the reservoir of emergent human norovirus strains? *Journal of virology* **89**:5756-5759.
18. **Knight, A., J. Haines, A. Stals, D. Li, M. Uyttendaele, and L. A. Jaykus.** 2016. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International journal of food microbiology* **216**:40-49.
19. **Kojima, S., T. Kageyama, S. Fukushi, F. B. Hoshino, M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, and K. Katayama.** 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of virological methods* **100**:107-114.
20. **Kroneman, A., E. Vega, H. Vennema, J. Vinje, P. A. White, G. Hansman, K. Green, V. Martella, K. Katayama, and M. Koopmans.** 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology* **158**:2059-2068.
21. **MacCannell, T., C. A. Umscheid, R. K. Agarwal, I. Lee, G. Kuntz, and K. B. Stevenson.** 2011. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infection control and hospital epidemiology* **32**:939-969.
22. **Mathijs, E., A. Stals, L. Baert, N. Botteldoorn, S. Denayer, A. Mauroy, A. Scipioni, G. Daube, K. Dierick, L. Herman, E. Van Coillie, M. Uyttendaele, and E. Thiry.** 2012. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food and environmental virology* **4**:131-152.
23. **Partridge, D. G., C. M. Evans, M. Raza, G. Kudesia, and H. K. Parsons.** 2012. Lessons from a large norovirus outbreak: impact of viral load, patient age and ward design on duration of symptoms and shedding and likelihood of transmission. *The Journal of hospital infection* **81**:25-30.
24. **Patel, M. M., M. A. Widdowson, R. I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje, and U. D. Parashar.** 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging infectious diseases* **14**:1224-1231.
25. **Riddle, M. S., and R. I. Walker.** 2016. Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine* **34**:2895-2899.
26. **Roddie, C., J. P. Paul, R. Benjamin, C. I. Gallimore, J. Xerry, J. J. Gray, K. S. Peggs, E. C. Morris, K. J. Thomson, and K. N. Ward.** 2009. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49**:1061-1068.
27. **Rovida, F., G. Campanini, A. Sarasini, K. M. Adzasehoun, A. Piralla, and F. Baldanti.** 2013. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **75**:110-111.

28. **Ruvoen-Clouet, N., G. Belliot, and J. Le Pendu.** 2013. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Reviews in medical virology* **23**:355-366.
29. **Siebenga, J. J., H. Vennema, D. P. Zheng, J. Vinje, B. E. Lee, X. L. Pang, E. C. Ho, W. Lim, A. Choudekar, S. Broor, T. Halperin, N. B. Rasool, J. Hewitt, G. E. Greening, M. Jin, Z. J. Duan, Y. Lucero, M. O'Ryan, M. Hoehne, E. Schreier, R. M. Ratcliff, P. A. White, N. Iritani, G. Reuter, and M. Koopmans.** 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *The Journal of infectious diseases* **200**:802-812.
30. **Stals, A., L. Baert, N. Botteldoorn, H. Werbrouck, L. Herman, M. Uyttendaele, and E. Van Coillie.** 2009. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *Journal of virological methods* **161**:247-253.
31. **Stals, A., E. Mathijs, L. Baert, N. Botteldoorn, S. Denayer, A. Mauroy, A. Scipioni, G. Daube, K. Dierick, L. Herman, E. Van Coillie, E. Thiry, and M. Uyttendaele.** 2012. Molecular detection and genotyping of noroviruses. *Food and environmental virology* **4**:153-167.
32. **Sukhrie, F. H., J. J. Siebenga, M. F. Beersma, and M. Koopmans.** 2010. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *Journal of clinical microbiology* **48**:4303-4305.
33. **Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipowski, and S. Kumar.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* **30**:2725-2729.
34. **Vega, E., E. Donaldson, J. Huynh, L. Barclay, B. Lopman, R. Baric, L. F. Chen, and J. Vinje.** 2014. RNA populations in immunocompromised patients as reservoirs for novel norovirus variants. *Journal of virology* **88**:14184-14196.
35. **Vennema, H., E. de Bruin, and M. Koopmans.** 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **25**:233-235.
36. **Vinje, J.** 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology* **53**:373-381.
37. **Westhoff, T. H., M. Vergoulidou, C. Loddenkemper, S. Schwartz, J. Hofmann, T. Schneider, W. Zidek, and M. van der Giet.** 2009. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **24**:1051-1053.
38. **Ye, X., J. N. Van, F. M. Munoz, P. A. Revell, C. A. Kozinetz, R. A. Krance, R. L. Atmar, M. K. Estes, and H. L. Koo.** 2015. Noroviruses as a Cause of Diarrhea in Immunocompromised Pediatric Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **15**:1874-1881.

III. Discussion

Les gastro-entérites virales demeurent une préoccupation majeure en termes de Santé Publique en raison de leur impact socio-économique. Les NoV sont à l'heure actuelle reconnus mondialement comme le premier agent causal des gastro-entérites virales aiguës et le principal pathogène responsable des gastro-entérites d'origine alimentaire (Banyai *et al* 2018). Les NoV sont responsables de 12 à 24% des gastro-entérites communautaires aiguës (Ahmed *et al* 2014, Patel *et al* 2009).

Au niveau européen, parmi les virus responsables d'infections alimentaires identifiés comme étant à l'origine des cas de gastro-entérite aiguë rapportés à l'EFSA en 2015 (adénovirus, norovirus, entérovirus, virus de l'Hépatite A et rotavirus), les NoV ont été identifiés comme agent causal dans 84,4% des cas (EFSA 2015).

1- Diagnostic microbiologique des norovirus

1.1. Mise au point d'une RT-PCR quantitative en temps réel

Il y a une dizaine d'années, contrairement aux entéro-pathogènes usuellement recherchés chez les patients, les NoV étaient peu connus en Belgique et n'étaient pas détectés en routine. En particulier, le CHU de Liège ne disposait pas de méthode de détection des NoV chez les patients.

Préalablement à l'étude des NoV à proprement parler, il fut dès lors nécessaire de mettre au point et d'implémenter une méthode de détection de ceux-ci.

En l'absence d'un système de culture cellulaire aisé et efficace pour les NoV (Duizer *et al* 2004), des méthodes de biologie moléculaire par RT-PCR ont été développées de longue date pour détecter ceux-ci dans les échantillons cliniques et de l'environnement (Jiang *et al* 1992, Le Guyader *et al* 1996, Vinjé *et al* 1996, Moe *et al* 1994, Kojima *et al* 2002, Vennema *et al* 2002).

Le choix s'est porté sur une RT-PCR quantitative en temps réel permettant de mettre en évidence la présence des NoV GI, GII et GIV chez les patients. La RT-PCR développée selon le protocole de Stals *et al* présentait deux avantages majeurs par rapport aux méthodes commerciales disponibles au moment de l'évaluation. Ceux-ci s'avèrent toujours d'actualité et sont la détection et la différenciation des génogroupes GI/IV du génogroupe GII en une seule et même réaction d'une part, et la possibilité de quantifier la charge virale des NoV GI d'une part et des NoV GII d'autre part (Stals *et al* 2009).

Les méthodes de biologie moléculaire permettant la détection des NoV ont progressivement évolué au fil du temps. Alors que la plupart des méthodes ciblaient le gène de la polymérase virale, Kageyama *et al* ont révélé que la région conservée située à la jonction entre ORF1 et

ORF2 pouvait également être utilisée comme cible efficace pour la détection des NoV, en utilisant deux réactions différentes : une pour NoV GI et une autre pour NoV GII (Kageyama *et al* 2003). Hohne *et al* ont mis au point une méthode similaire en temps réel, ayant l'avantage de ne plus nécessiter de réaction de transcription inverse séparée (Hohne *et al* 2004, Pang *et al* 2015, Kittigul *et al* 2016, Rolfe *et al* 2007, Medici *et al* 2005, Vinjé *et al* 2003).

Dans le but de réduire le temps d'analyse et de minimiser le risque potentiel de réactions croisées, les amorces ont par la suite été optimisées, et les sondes ont été marquées à l'aide d'un d'un fluorochrome différent pour NoV GI et NoV GII afin de détecter et de génogrouper les NoV en une seule et même réaction (Hoehne *et al* 2006, Ishida *et al* 2008, Stals *et al* 2009).

Les méthodes commerciales ont rapidement fait leur apparition sur le marché, non automatisées dans un premier temps et par la suite de plus en plus automatisées (Bon *et al* 2004, Kele *et al* 2011, Baert *et al* 2007, Yan *et al* 2013, Farkas *et al* 2015). Bien que hautement sensibles et spécifiques, les performances de ces méthodes varient cependant quelque peu en raison de la très grande diversité des génomes de NoV, mais également en fonction du type de protocole utilisant des amorces, des sondes, des réactifs et des conditions de réalisation pas toujours identiques (Neesanant *et al* 2013, Kageyama *et al* 2003, Mattison *et al* 2011, Van Stelten *et al* 2011, Schultz *et al* 2011, Dreier *et al* 2006). Un grand nombre de RT-PCR en temps réel commerciales sont actuellement disponibles (Butot *et al* 2010, Dunbar *et al* 2014, Hyun *et al* 2014).

Avec des limites de détection <10 copies génomiques/ml pour NoV GI et NoV GII (cf chapitre III), la RT-PCR développée s'est avérée plus performante que les RT-PCR commerciales disponibles au moment de l'évaluation, ces dernières détectant des copies génomiques minimales de 1000 à 10 000/ml (Pang *et al* 2015, Rupprom *et al* 2017, Schultz *et al* 2011).

La sensibilité de cette méthode développée s'est révélée excellente pour la détection des génogroupes de NoV, contrairement à certaines RT-PCR alors disponibles qui présentaient une sensibilité moindre pour la détection des NoV GI (Butot *et al* 2010). Actuellement, la sensibilité des RT-PCR en temps réel commercialisées permet de détecter efficacement tant les NoV GI que GII, avec des sensibilités avoisinant 83% (63,5-93,5) pour NoV GI et 95% (90,8-97,2) pour NoV GII (Kanwar *et al* 2018, Rupprom *et al* 2017, Yan *et al* 2013).

En termes de spécificité, les résultats de la RT-PCR développée (cf chapitre III) rejoignent les performances de la majorité des RT-PCR en temps réel basées sur les données d'études qui rapportent une spécificité de plus de 95% tant pour NoV GI (98,0-99,6) que pour NoV GII (96,9-99,4) (Kanwar 2018, Pang 2015, Dunbar 2014, Epsy 2006, Farkas 2015, Kageyama 2013). L'absence de réactions croisées n'est pas toujours facile à obtenir, comme l'a montré

l'évaluation d'une RT-PCR NoV par une équipe canadienne démontrant l'existence de réactions croisées avec les rotavirus dans les valeurs de détection basses (Mattison *et al* 2011).

L'intérêt de la quantification de la charge virale de NoV dans les échantillons humains a été abordée. Une quantification peut également s'avérer utile dans les aliments et notamment chez les mollusques bivalves, la présence de NoV dans ces derniers n'impliquant pas nécessairement un risque sanitaire pour l'Homme. En effet, si une haute quantité de NoV dans les huîtres est en relation étroite avec la maladie chez l'Homme, il est moins probable que de faibles quantités virales (<150 copies génomiques/g) soient associées à des épidémies toxi-alimentaires à NoV (Lowther *et al* 2012). La répétabilité et la reproductibilité des méthodes de quantification des NoV sont dès lors importantes dans le cadre de l'investigation des épidémies dues à l'ingestion d'huîtres et de l'évaluation des risques. A cet égard, par rapport à la RT-PCR en temps réel, l'utilisation d'une nouvelle méthode de RT-PCR appelée *RT droplet digital PCR* permet d'obtenir une quantification virale plus précise des NoV dans les huîtres. De plus, la quantification à l'aide de cette méthode est réalisée directement à partir de chaque échantillon d'huître, sans avoir recours à une courbe de calibration externe (Persson *et al* 2018).

Il existe actuellement des techniques de biologie moléculaire commerciales automatisées permettant d'obtenir un résultat plus rapide et de simplifier les méthodes tout en conservant leur haute performance (Pang et Lee 2015, Reddington *et al* 2014, Vinjé *et al* 2015).

Des RT-PCR commerciales simples et rapides pour la détection combinée des NoV GI et GII ont été développées, affichant une sensibilité pouvant atteindre 100% et une spécificité de plus de 95% (De Grazia *et al* 2018). Ces tests individuels permettent de réaliser les analyses au coup par coup avec un résultat disponible dans l'heure, à l'aide de méthodes complètement automatisées faciles à utiliser et ne nécessitant dès lors pas un personnel dédié à leur réalisation.

A côté de ces techniques de détection moléculaire des NoV, de nouvelles méthodes permettant la détection génomique d'un éventail plus ou moins large d'entéropathogènes (virus, bactéries, parasites) en une seule et même réaction ont été développées (Deng *et al* 2015, Buss *et al* 2015, Rohayem *et al* 2004). Le premier test commercialisé fut le 'xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel' (Luminex, Austin, TX). Ce test détecte efficacement les NoV GI et GII, avec une sensibilité de 94,4% et une spécificité de 100% par rapport aux RT-PCR commerciales classiques. En plus des NoV, cette méthode en panel permet de détecter les entéropathogènes suivants : rotavirus A, adenovirus 40/41, *Giardia*, *Cryptosporidium*,

Entamoeba histolytica, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* toxigène, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7 et producteurs de toxines (Wessels *et al* 2014).

Plus récemment, la société bioMérieux (Marcy l'Etoile, France) a développé une méthode rapide permettant de détecter 22 entéro-pathogènes en moins d'une heure, avec une sensibilité de 96,2% et une spécificité de 99,8% pour la détection combinée des NoV GII/II dans l'étude d'évaluation publiée par Khare *et al* en 2014.

Toutes ces techniques remarquablement performantes nécessitent des automates à la pointe de la technologie (Hyun *et al* 2014, Kageyama *et al* 2003). Bien que les méthodes de biologie moléculaire aient considérablement progressé en termes de facilité d'utilisation et de délai de réponse du résultat, elles restent encore inaccessibles à certains laboratoires, même hospitaliers, en raison de la nécessité d'un matériel sophistiqué et onéreux auquel seuls les gros laboratoires, principalement universitaires, ont accès.

Le système de Soins de Santé Belge se heurte à un frein considérable, engendrant un décalage entre les techniques disponibles et la possibilité de les proposer aux patients : c'est le coût des tests de biologie moléculaire. Les réactifs et les automates nécessaires à la réalisation de ces analyses sont fort onéreux. Il n'y a, à l'heure actuelle aucun remboursement octroyé en Belgique pour les analyses de laboratoire concernant la détection des entéro-pathogènes par des méthodes moléculaires.

Malgré le caractère attrayant de ces nouvelles méthodes, il faut souligner l'importance de bien connaître la performance des techniques utilisées afin d'éviter un surdiagnostic (Mattison *et al* 2011). La détection de la présence de génome viral de NoV dans un échantillon ne présument en rien du caractère infectieux ou non du pathogène détecté, il convient de s'interroger sur la signification d'un résultat positif obtenu par RT-PCR, et de l'intégrer dans le contexte clinique (Knight *et al* 2016).

La connaissance des limites des méthodes utilisées permet également de pallier au sous-diagnostic ; prenons pour exemple le test de biologie moléculaire évalué par Zhuo en 2017 (Luminex xTAG[®] Gastrointestinal Pathogen Panel) : la sensibilité de ce test est trop faible pour détecter le génotype GII.2 dans les prélèvements cliniques (Zhuo *et al* 2017).

Les nouvelles technologies permettront sans doute de disposer un jour de la possibilité de ne détecter que les particules de NoV infectieuses dans les échantillons de patients, et de savoir s'il existe un rapport entre la charge virale détectée et l'infectiosité. Il serait dès lors intéressant de disposer de RT-PCR non plus qualitatives mais quantitatives.

1.2. Evaluation d'un test antigénique immunochromatographique

Face à une épidémie de gastro-entérites aiguës, l'identification rapide des NoV est l'élément-clé pour contrôler efficacement l'infection. L'idéal dans ce cas est de disposer d'une méthode de détection simple, rapide, efficace et sans équipement particulier, éventuellement 7 jours sur 7 pour un laboratoire hospitalier. Alors que les méthodes de biologie moléculaire sont un moyen d'établir le diagnostic étiologique de certitude, toutes les RT-PCR ne sont pas adaptés à la réalisation d'analyses au coup par coup en urgence, et la plupart de ces méthodes requièrent du personnel habilité et rendent un résultat après un long délai (Robilotti *et al* 2015).

Une nouvelle méthode de détection antigénique des NoV a été développée et commercialisée ; basée sur le principe immunologique d'immunochromatographie, elle détecte de manière combinée les antigènes des NoV GI et II à l'aide de plaquettes test individuelles, ce qui présente comme avantage d'analyser chaque échantillon au coup par coup, facilement, en moins d'une demi-heure et sans aucun équipement (Geginat *et al* 2012, Kirby *et al* 2010, Bruggink *et al* 2011).

Le choix du laboratoire s'est porté sur l'évaluation d'un test rapide immunochromatographique nouvellement commercialisé, l'ImmunoCard STAT® NoV (Meridian BioSciences, France). Les performances du test en termes de spécificité, supérieures à 95% (*cf* chapitre III), ont rejoint ceux d'autres évaluations similaires disponibles au moment de l'étude. De nouveaux tests rapides mis sur le marché récemment affichent eux aussi des valeurs de spécificité élevées, dépassant les 90% pour la plupart (Rovida *et al* 2013, Kumphip *et al* 2018, Bruggink *et al* 2015).

Par contre, les valeurs de sensibilité de la méthode évaluée (*cf* chapitre III), tout comme les valeurs de sensibilité des tests rapides immunochromatographiques commercialisés plus récemment qui varient entre 52 et 78%, sont trop faibles pour que les tests de détection antigéniques rapides soient contributifs dans le diagnostic étiologique des cas de gastro-entérites aiguës sporadiques ou en dehors de la phase aiguë (Banyai *et al* 2018). La sensibilité des tests immunochromatographiques est liée à la charge virale de NoV présente dans l'échantillon et à la variabilité antigénique des souches circulantes.

Cependant, dans le cadre d'épidémies de gastro-entérites, ce test a démontré son efficacité pour un diagnostic étiologique précoce permettant la mise en place rapide des méthodes de prévention visant à limiter la propagation de l'épidémie.

Afin de pallier au manque de sensibilité des tests rapides antigéniques, des études réalisées par différentes équipes s'accordent à montrer que la sensibilité de ces méthodes est améliorée par une augmentation du nombre d'échantillons de patients symptomatiques prélevés en phase aiguë dès le début de l'épidémie (Costantini *et al* 2010, Gray *et al* 2007, Duizer *et al* 2003). Afin d'obtenir une sensibilité de >90%, le nombre de 6 échantillons minimum prélevés lors d'une épidémie est indiqué, nombre minimum qui a été adopté par le CDC et fait partie des recommandations pour la prise en charge d'une épidémie. Ce critère est appliqué depuis lors au CHU de Liège lors des épidémies de gastro-entérites aiguës, qu'elles soient communautaires ou nosocomiales.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode commerciale, qu'elle soit génomique ou antigénique, permettant de détecter la présence de NoV du génogroupe IV. Les sociétés s'attellent à proposer des trousse commerciales efficaces permettant de détecter conjointement les deux génogroupes les plus fréquents et susceptibles d'être à l'origine d'épidémies. Le génogroupe IV, et en particulier le génotype 1 chez l'Homme n'a encore jamais été décrit comme étant à l'origine d'épidémies. Les NoV GIV sont principalement retrouvés dans les eaux de surface (rivières par exemple) et les eaux non traitées. Ces souches circulent en proportion moindre que les NoV GI et GII, ainsi au Brésil par exemple, elles ne représentent que 9,4% des souches de NoV (Texeira *et al* 2016, Han *et al* 2014).

Dans tous les cas, il est utile de s'assurer, au fil du temps, que les trousse utilisées détectent les nouveaux génotypes de NoV circulants, telle la souche GII.7, qui est à l'origine d'épidémies depuis quelques années seulement (de Graaf 2015 *et al*, Lu *et al* 2016).

Il est par ailleurs opportun de compléter la détection des NoV par un génotypage des souches cliniques, comme réalisé dans notre pays par le Centre National de Référence des NoV (Sciensano, Bruxelles).

2- Investigation d'une épidémie de gastro-entérites en milieu hospitalier

Les NoV représentent le premier agent responsable d'épidémies de gastro-entérites au niveau mondial et touchent toutes les tranches d'âge (Kotloff *et al* 2013, Chikhi-Brachet *et al* 2002, Tam *et al* 2012, Payne *et al* 2013, Glass *et al* 2009).

Les études réalisées dans le cadre de l'investigation d'épidémies à NoV, qu'elles soient communautaires ou nosocomiales, indiquent que ces épidémies sont difficiles à maîtriser, principalement en raison de la haute contagiosité des NoV et leur résistance dans

l'environnement rendant complexe la désinfection complète et menant à des épidémies récurrentes (Desai *et al* 2012, CDC MMWR 2002, Arness *et al* 2000, Hall *et al* 2013, Lopman *et al* 2012, Heine *et al* 2009).

En milieu hospitalier, il est primordial de diagnostiquer au plus tôt un début d'épidémie à NoV, afin d'instaurer rapidement des mesures d'hygiène hospitalière efficaces (Russo *et al* 1997, Georgiadou *et al* 2011, Robilotti *et al* 2015). On ne saurait trop insister sur ce point : il faut penser aux NoV devant une épidémie de gastro-entérite aiguë (Lopman *et al* 2004). Le tribut socio-économique de ces épidémies à NoV est lourd pour la société, en raison des surcoûts engendrés par la prolongation des séjours hospitaliers et la surcharge de travail pour les équipes de soins, accentuée par un absentéisme du personnel soignant infecté (Lopman *et al* 2004, Zingg *et al* 2005). L'ampleur de ces épidémies mène parfois à une fermeture complète de salles d'hospitalisation (Sukhie *et al* 2010, Glass *et al* 2009, Harris *et al* 2014, Chadwick *et al* 2000, Hansen *et al* 2007). Dans les années 2007-2008, des études ont cependant montré qu'il était plus efficace de fermer les salles d'hospitalisation en partie et non plus dans leur totalité ; cela permet de réduire la durée de fermeture de la salle et d'améliorer la prise en charge de l'épidémie (Hillingworth *et al* 2011, Haill *et al* 2012).

Une épidémie à NoV est survenue dans une clinique de la région liégeoise à une période où les tests de détection des NoV n'étaient pas encore disponibles en routine dans tous les laboratoires de la région, que ce soit par RT-PCR ou par détection antigénique. Le diagnostic étiologique de l'épidémie a pu être évoqué et précisé grâce à la collaboration étroite entre les salles d'hospitalisation, l'équipe d'hygiène hospitalière et les laboratoires de Biologie Clinique de la clinique et du CHU.

Lors de la première épidémie survenue dans cette clinique, la souche NoV GII.4 Sidney a été identifiée chez les 17 patients infectés, souche responsable de la majorité des épidémies de gastro-entérites aiguës au niveau mondial à cette période (Bok *et al* 2009, CDC MMWR 2013). L'émergence d'une nouvelle souche distincte tous les 2 à 4 ans coïncide avec un accroissement du taux d'épidémies durant l'hiver suivant (Zheng *et al* 2010).

Une seconde épidémie à NoV a débuté 18 jours après la fin de la première épidémie et est restée confinée au 1^{er} étage de l'hôpital. L'origine de cette seconde épidémie n'a pas été identifiée. La persistance des NoV dans l'environnement complique la désinfection complète des locaux et peut être à l'origine d'épidémies récurrentes (Lopman *et al* 2012, Heijne *et al* 2009).

Les infections à NoV GII.4 acquises durant les épidémies sont associées à des atteintes plus sévères qu'avec les autres souches de NoV (Desai *et al* 2012). L'âge avancé est un facteur de risque aggravant. Au Pays-Bas, les épidémies à NoV ont été significativement associées avec une augmentation de la mortalité chez les personnes de plus de 85 ans lors de l'émergence de nouveaux variants (Kittigul *et al* 2010). Il en est de même pour les infections contractées par les très jeunes enfants (Turcios *et al* 2008, Murata *et al* 2007, Stuart *et al* 2010, Bagci *et al* 2010, Pelizzo *et al* 2013, Zenda *et al* 2010).

En reprenant les données disponibles aux Etats-Unis de 2009 à 2013, Vega *et al* ont montré que la transmission du NoV GII.4 est plus communément associée à une transmission de personne à personne, particulièrement dans les hôpitaux et dans les maisons de soins (Vega *et al* 2014).

Plusieurs études ont été menées afin d'évaluer les mesures de prévention et de contrôle efficaces destinées à enrayer la transmission des NoV dans les hôpitaux (Cheng *et al* 2006, Greig *et al* 2012, Mc Call *et al* 2002, Cooper and Blamey 2005). Les résultats de ces études ont été synthétisés dans les recommandations de l'HICPAC (Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, Etats-Unis) publiées en 2011 (Mac Cannell *et al* 2011, Barclay *et al* 2014, Boyce *et al* 2002). En Belgique, des informations et des recommandations concernant la prévention et la transmission des NoV relatives à l'hygiène des denrées alimentaires ont été rédigées par le Conseil Supérieur de la Santé (CSS 8386 2010, CSS 8207 2012).

Les trois piliers des stratégies anti-NoV incluent l'hygiène des mains, la désinfection de l'environnement et l'information du personnel et des patients '*staff and patient policy*'.

Concernant la clinique de notre région, l'étude prospective de l'épidémie a mis en exergue plusieurs mesures particulièrement efficaces dans la pratique courante pour éviter ou limiter la transmission des NoV (Hall *et al* 2011, Mac Cannell *et al* 2011) :

- Renforcer l'hygiène des mains (lavage au savon, désinfection à l'aide d'une solution hydro-alcoolique) et limiter les contacts avec les personnes infectées (Banayi *et al* 2018, Boyce *et al* 2002, Park *et al* 2010),
- Exclure le personnel soignant infecté et ce jusqu'à 48 à 72 heures après la fin des symptômes (Lynn *et al* 2004),
- Limiter le déplacement des patients tant que faire se peut (Johnston *et al* 2007),

- En début d'épidémie, isoler le patient en chambre seul en attendant le diagnostic étiologique (Weber *et al* 2005). Par la suite, cohorter les patients et le personnel soignant (Greig *et al* 2012). Dans cet établissement, la répartition des lits de gériatrie sur deux étages différents, avec un même personnel soignant affecté aux salles, a sans doute favorisé la propagation de l'épidémie d'un étage à l'autre.
- Désinfecter l'environnement : l'efficacité de l'eau de javel diluée est bien documentée (Duizer *et al* 2007). D'autres solutions, notamment à base de phénols et de peroxyde d'hydrogène à 0,5% sont également efficaces contre les NoV (Zonta *et al* 2016b).

Ainsi, l'étude réalisée a objectivé la difficulté d'enrayer ce type d'épidémie, d'autant plus dans les salles de gériatrie, notamment en raison d'une excrétion virale prolongée chez les patients âgés (Banyai *et al* 2018, Glass *et al* 2009, Aoki *et al* 2010).

Alors que les patients hospitalisés représentent un réservoir pour les potentielles transmissions virales nosocomiales, les patients sont eux-mêmes soumis aux mêmes facteurs de risques traditionnels d'infection à NoV que la population en général. Pether et Caul ont décrit une épidémie nosocomiale ayant eu pour point de départ des petits pains au poulet servis par un membre du personnel de soins de santé dans 2 hôpitaux. Un mode de transmission similaire a été décrit ultérieurement par Verbelen dans un hôpital belge (Pether *et al* 1983, Verbelen *et al* 2004). Ce risque de transmission est plus élevé en période hivernale en raison de la prévalence accrue des infections à NoV dans la population durant les mois les plus froids de l'année, ce qui expose d'autant plus les patients à une possible transmission virale par des personnes extérieures à l'hôpital comme les visiteurs. La saisonnalité des infections à NoV est un facteur dont il faudrait tenir compte, afin d'agir préventivement par des mesures d'hygiène renforcées, comme c'est d'ailleurs le cas pour d'autres virus tel influenza.

Quoi qu'il en soit, les hôpitaux ayant été confrontés ne fut-ce qu'une fois à ce type d'épidémie sont plus attentifs à poser le diagnostic plus précocement afin de mettre en place efficacement les mesures de prévention nécessaires (Lynn *et al* 2004). C'est le cas de la clinique investiguée, qui depuis lors n'a plus été confrontée à une épidémie à NoV.

3- Etude de l'épidémiologie clinique et moléculaire des norovirus au Burkina Faso

Bien que les NoV soient responsables d'un cinquième des gastro-entérites aiguës au niveau mondial, force est de constater que peu d'attention leur est consacrée par rapport à d'autres pathogènes. Les efforts coordonnés des études épidémiologiques et des centres de surveillance ont établi l'impact significatif des infections à NoV, touchant les différentes populations et tranches d'âge en termes de Santé Publique. Mais si beaucoup d'études ont été réalisées dans les pays industrialisés, peu de données sont à l'heure actuelle disponibles pour les pays à moyen et faible revenus.

Dans l'étude réalisée au Burkina Faso, la prévalence de NoV était similaire chez les enfants symptomatiques et asymptomatiques. En Afrique, les données de la littérature rapportent des prévalences de NoV, semblables à celles obtenues au Burkina Faso, de 13,5% (0,8 à 25,5%) et de 9,7% (7,0 à 31,0%) chez les patients symptomatiques et asymptomatiques respectivement, ces chiffres variant quelque peu en fonction du pays (Mans *et al* 2016, Mattison *et al* 2010, Reither *et al* 2007). Contrairement à l'étude menée au Burkina Faso, très peu d'études incluent les patients non diarrhéiques. Dans leur revue de la littérature parue en 2016 portant sur les NoV en Afrique, Mans et al incluent les résultats de cette étude réalisée à Bobo Dioulasso.

La présence de NoV chez les individus asymptomatiques est également décrite dans des pays d'autres continents que l'Afrique. Ainsi, une excrétion asymptomatique de NoV a été détectée chez 11,7% des enfants au Nicaragua et au Leone (Bucardo *et al* 2010), chez 49,2% des enfants en périphérie de Mexico City (Garcia *et al* 2006), et chez 37,5% des enfants au Brésil (Marques *et al* 2014). Dans les pays à faible ou moyen revenus, la majorité des études ont été réalisées chez des enfants.

L'excrétion asymptomatique de NoV n'est pas limitée aux habitants des pays en voie de développement. En France, l'ARN de NoV a été mis en évidence chez 11,6% de 43 enfants admis dans un hôpital parisien en l'absence de symptômes gastro-intestinaux (Frange *et al* 2012). Sur un échantillonnage plus large de 2205 individus asymptomatiques en Angleterre, les NoV ont été détectés dans 361 des 2205 échantillons, avec une prévalence dépassant les 25% chez les enfants de moins de 3 ans, et tout de même de 5% chez les adultes de plus de 35 ans. Après ajustement à l'âge, la prévalence globale était de 12% (11-14%) (Phillips 2010b).

Alors que NoV GII.4 est le génotype prédominant, suivi des génotypes GII.3 et GII.6 dans la majorité des études réalisées en Afrique (Mans *et al* 2016), une remarquable diversité des

souches circulantes a été observée lors de l'étude menée au Burkina Faso, avec une proportion étonnamment élevée de NoV GI en comparaison avec les génogroupes habituellement rapportés dans cette région du globe.

En effet, alors que la littérature rapporte la présence de GI/GII en proportion 1/4 environ en Afrique, au Burkina Faso la prévalence de NoV GI est non négligeable chez les patients symptomatiques (7,5% GI versus 10,2% GII) et supérieure à NoV GII chez les patients asymptomatiques (12% GI versus 11,2% GII) (cf Chapitre III). Il est à noter que les deux génogroupes sont retrouvés dans les eaux des rivières rurales et urbaines et dans les eaux usées de certains pays africains (Ghan, Kenya, Tunisie et Egypte) (Gibson *et al* 2011, Kamel *et al* 2010, Kiula *et al* 2010, Sdiri-Loulizi *et al* 2010).

Outre la grande diversité de génotypes circulants mise en évidence tant chez les enfants symptomatiques qu'asymptomatiques, une séquence recombinante GII.7/GII.6 a été détectée pour la première fois.

Une explication quant à cette variété de souches de NoV observée lors de l'étude au Burkina Faso pourrait résider dans le fait que cette étude est la seule à avoir été menée chez des enfants s'étant présentés dans des centres de santé, et serait dès lors plus en mesure de refléter les souches circulant dans la population, contrairement aux autres études rapportées dans la littérature qui ont quant à elles ont été menées chez des enfants hospitalisés pour la prise en charge d'une gastro-entérite aiguë.

Le taux de portage est considérable chez les jeunes enfants asymptomatiques, qui pourraient dès lors jouer un rôle de 'réservoir' pour les infections à NoV.

Les rencontres fréquentes avec les NoV et l'exposition à de nombreuses souches différentes sont vraisemblablement favorisées par un accès limité à l'eau potable et un niveau d'hygiène moindre dans ces régions. Ceci pourrait expliquer une certaine protection de l'hôte et le portage asymptomatique élevé qui en résulterait.

En précisant l'épidémiologie moléculaire des souches de NoV circulant dans un pays représentatif de l'Afrique de l'Est, il est intéressant de souligner que, malgré le fait que les souches GII et en particulier celles de génotype GII.4 soient à l'heure actuelle rapportées majoritairement au niveau mondial, les souches GI sont probablement excrétées en égale proportion dans l'environnement. L'origine épidémiologique de la différence entre les prévalences apparentes des infections par les souches de GI et de GII, bien que partiellement expliquée par les différences de sensibilité génétique et d'immunité de population, reste toutefois à élucider.

L'étude des NoV dans le cadre d'une épidémie hospitalière et dans la population du Burkina Faso a permis d'obtenir des données sur les infections à NoV chez des individus considérés

comme immunocompétents, en postulant que le système immunitaire soit apte à faire face à l'infection, avec une résolution spontanée des symptômes en quelques jours.

4- Etude des infections à norovirus chez les patients transplantés rénaux

Il n'en est pas de même quant à l'évolution clinique chez les patients immunocompromis. Les NoV représentent une cause de diarrhées persistantes et chroniques encore trop souvent méconnue et sous-diagnostiquée chez ces patients (Brakemeier *et al* 2016, Green *et al* 2014, Haessler *et al* 2013, Roddie 2009, Echenique *et al* 2012, Bok *et al* 2002).

Ces infections persistantes sont décrites depuis de nombreuses années chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, et ont été décrites par la suite chez les patients ayant bénéficié d'une greffe d'organe solide (Wayman *et al* 2018, Westhoff *et al* 2009, Schorn *et al* 2010, Ye *et al* 2015). Chez les patients présentant une immunosuppression profonde due à une infection par le VIH, des cas de diarrhées chroniques dans le décours d'une infection à NoV ont également été rapportés (Wingfield *et al* 2010).

Dans un hôpital universitaire où plus de 2000 patients ont bénéficié à ce jour d'une greffe d'organe, il semblait opportun d'étudier les NoV chez ces patients. Grâce à des collaborations efficaces avec l'équipe du Service de Néphrologie et une aide financière FIRS obtenue auprès du CHU de Liège, une étude prospective a été réalisée durant près de quatre ans, d'avril 2010 à février 2014, chez des patients transplantés rénaux, présentant ou non des symptômes gastro-intestinaux. Avec un total de 117 patients, cette étude a inclus un nombre conséquent de patients transplantés par rapport aux autres études rapportées dans la littérature, totalisant 15 à 78 patients selon les études.

La prévalence des NoV chez les patients transplantés est décrite dans la littérature, et a principalement été étudiée chez les patients symptomatiques. La prévalence de NoV retrouvée lors de l'étude réalisée chez les patients transplantés rejoint les données observées en France par Coste *et al*, dans laquelle la présence de NoV a été détectée chez 14 des 49 patients transplantés rénaux présentant un tableau de diarrhée sévère (36%), avec une prédominance nette de souches du génogroupe II (Coste *et al* 2013).

Lors de cette étude, une excrétion virale prolongée a été mise en évidence chez les patients présentant une symptomatologie gastro-intestinale mais également chez les patients asymptomatiques, avec des durées d'excrétions maximales d'au moins 8 et 6 mois respectivement. Cette excrétion prolongée était assortie de charges virales qui restaient élevées chez certains patients, constituant dès lors une source potentielle de transmission virale. Dès lors, comme dans l'étude menée au Burkina Faso, les patients asymptomatiques pourraient jouer un rôle de 'réservoir' pour les infections à NoV (Everardo *et al* 2014).

Chez un de ces patients symptomatiques, la période d'excrétion d'une même souche de NoV GII.4 a dépassé 153 jours ; de même, chez un patient asymptomatique, l'excrétion d'une même souche de NoV GII.12 a dépassé 211 jours. La souche GII.12 est plus fréquemment associée que d'autres génotypes de GII aux infections d'origine alimentaires (Vega *et al* 2014).

Contrairement à la majorité des études reprises dans la littérature, le suivi de l'excrétion de NoV lors de l'étude menée au CHU de Liège a été réalisé chez les patients symptomatiques, mais également chez les patients asymptomatiques (Roos-Weil *et al* 2011, Schorn *et al* 2010, Westhoff *et al* 2009).

Cette notion d'excrétion prolongée chez les adultes et enfants immunocompromis présentant des troubles gastro-intestinaux est bien documentée. C'est le cas des patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, avec une durée d'excrétion maximale de plus de 8 mois dans une étude, et de plus de 14 mois dans une autre (Doshi *et al* 2013, Schwartz *et al* 2011, Roddie *et al* 2009, Robles *et al* 2012, Saif *et al* 2011). De même chez les patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale, avec une excrétion prolongée de NoV durant 7 mois au moins rapportée chez un patient symptomatique.

Les troubles digestifs, et plus particulièrement les diarrhées sont des symptômes fréquemment rencontrés chez les patients transplantés et résultent de multiples causes, infectieuses et non infectieuses, notamment suite à la prise d'immunosuppresseurs ou lors d'une réaction du greffon contre l'hôte. Les infections à NoV font partie des étiologies à évoquer devant une diarrhée persistante et peuvent conduire à des infections persistantes voire chroniques. L'examen microscopique de biopsies intestinales effectuées chez des enfants ayant bénéficié d'une greffe de l'intestin grêle et présentant une infection chronique à NoV met en évidence une apoptose intestinale accrue et une inflammation qu'il est difficile à différencier d'un rejet d'allogreffe (Kaufman *et al* 2005). La détection des NoV par méthode de biologie moléculaire devrait dès lors faire partie de l'exploration des troubles digestifs persistants chez les patients immunocompromis. Cela permettrait de faire le diagnostic différentiel avec d'autres étiologies et d'améliorer leur prise en charge clinique.

Une fois le diagnostic d'infection à NoV posé et quand cela s'avère possible, une réduction temporaire du traitement immunosuppresseur permet au système immunitaire de reprendre le dessus et d'enrayer l'infection. Ainsi que suggéré par Bok *et al* en 2012, cette étude a montré l'impact d'une réduction du traitement immunosuppresseur sur la charge virale et sur la symptomatologie (cf chapitre III). En effet, la résolution des infections chroniques à NoV chez les patients immunocompromis à la suite d'une greffe est liée à la reconstitution du système immunitaire et la production d'anticorps aptes à bloquer la liaison des NoV aux HBGA (Banyai *et al* 2018, Knoll *et al* 2016, Saif *et al* 2011).

Dans un cas rapporté dans la littérature, la réduction des doses d'immunosuppresseur a été suivie de la résolution d'une diarrhée chronique chez un patient ayant bénéficié d'une double greffe (cellules souches hématopoïétiques et foie) (Boillat *et al* 2011). De même, Engelen *et al* ont diminué le traitement suppresseur en substituant une molécule par une autre chez un patient transplanté cardiaque présentant une diarrhée chronique associée à une infection à NoV, avec pour effet bénéfique une prompte résolution de la diarrhée (Engelen *et al* 2011).

IV. Conclusion

L'étude des NoV a indéniablement contribué à développer et à acquérir des compétences particulières en la matière, concernant un entéropathogène encore insuffisamment recherché chez les patients à l'heure actuelle. Elle a permis d'informer les cliniciens de l'existence des NoV et de leur pouvoir pathogène, notamment chez les patients immunodéprimés.

Principalement en milieu hospitalier, la connaissance des NoV a aidé à conscientiser les services concernés en première ligne sur l'importance de diagnostiquer rapidement un début d'épidémie, et a contribué à établir des stratégies de prévention et de prise en charge des épidémies hospitalières, entre autres grâce à une collaboration étroite entre les différents intervenants.

L'évaluation et l'implémentation de méthodes de biologie moléculaire et antigéniques pour la détection des NoV a permis de maîtriser l'indication, l'interprétation des résultats obtenus et la place de chaque méthode. En particulier, l'indication des tests rapides antigéniques devrait être réservée au diagnostic étiologique des épidémies de gastro-entérites aiguës, ces tests affichant une sensibilité trop faible que pour être contributifs dans les cas isolés et en dehors de la phase aiguë de l'infection. Seule la détection des NoV par RT-PCR est contributive pour les cas sporadiques et l'exploration étiologique des troubles digestifs prolongés et en dehors d'un contexte aigu.

Par ailleurs, l'interprétation du résultat d'un test diagnostique des NoV repose sur la qualité des échantillons analysés et requiert donc de prélever chez le patient au moment opportun. Les échantillons de selles doivent idéalement être collectés dans les 48 à 72 heures suivant le début des symptômes, bien que les NoV puissent encore être détectés par RT-PCR dans les échantillons durant 7 à 10 jours (Robiloti *et al* 2015).

Etant donné la constante évolution des NoV, il est primordial de contrôler l'efficacité des techniques au fil du temps, qu'elles soient moléculaires ou immunologiques, afin de s'assurer qu'elles détectent les nouvelles souches de NoV (de Graaf *et al* 2015).

La collaboration des laboratoires de diagnostic avec le Centre National de Référence (CNR) des NoV (Sciensano, Bruxelles, Belgique) est primordiale en termes de diagnostic des souches de NoV circulantes. Les hôpitaux contribuent à la connaissance de l'épidémiologie moléculaire des NoV en déclarant les épidémies à NoV et en envoyant les échantillons au CNR, ce qui permet d'alimenter les bases de données du CNR relatives à l'épidémiologie moléculaire des souches circulantes.

Les CNR peuvent à leur tour enrichir la base de données européenne NoroNet, qui elle-même partage ses données au niveau mondial. NoroNet est un réseau d'informations approvisionné par des instituts de santé publique, des CNR ou des universités qui y apportent leurs données moléculaires et épidémiologiques sur les NoV, et comprend des membres à travers l'Europe, l'Asie et l'Australie. Ces données sont est très utiles à la surveillance des souches circulantes et à l'identification de l'émergence de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies (Van Beek *et al* 2012). Les NoV font également partie des entéropathogènes rapportés auprès d'un système européen centralisé pour la surveillance des épidémies d'origine alimentaire, le FBVE (Food-Borne Viruses in Europe Network) (Koopmans *et al* 2003).

Lors des études réalisées chez les enfants au Burkina Faso et chez patients greffés rénaux au CHU de Liège, une excrétion virale prolongée a été mise en évidence chez les patients symptomatiques, mais également chez les patients asymptomatiques. Dès lors, les patients asymptomatiques pourraient jouer un rôle de 'réservoir' pour les infections à NoV.

Une conséquence secondaire du portage asymptomatique résulte de la possible transmission de NoV par l'intermédiaire des transplantations du microbiote fécal, par le biais d'échantillons de selles obtenus à partir de donneurs asymptomatiques, chez qui la détection préalable de NoV n'aurait pas été réalisée (Schwartz *et al* 2013).

Les différentes études réalisées au cours de ces années ont permis de renforcer et de développer les collaborations au sein de l'hôpital et avec d'autres hôpitaux et laboratoires de Biologie Clinique, mais également en dehors du secteur de soins de santé humains. Les collaborations se sont élargies vers d'autres services de l'ULiège autour d'un agent infectieux commun concernant un grand nombre d'individus, permettant de s'investir dans des projets à plus grandes échelles, nationaux (SPF - Santé Publique Fédérale) et internationaux (Afrique).

V. Perspectives

Une étude plus approfondie de l'impact économique global des NoV permettrait d'aider les chercheurs et devrait attirer l'attention des décideurs politiques, de la Santé Publique et de l'industrie, pour déterminer les ressources financières nécessaires afin de faire avancer la recherche en matière de détection, de prévention et de contrôle efficace des infections à NoV.

L'amélioration de la surveillance épidémiologique et de l'investigation des infections à NoV, couplée à un accès plus large aux méthodes de diagnostic moléculaire, conduirait à une estimation plus réaliste de l'ampleur des infections à NoV.

C'est particulièrement le cas pour les infections à NoV d'origine alimentaire. Notamment, des épidémies à NoV ont été rapportées en lien avec l'ingestion de fruits rouges et de feuilles de salade verte. La Belgique, la France et le Canada ont d'ailleurs été les premiers pays à fournir des données sur la prévalence des NoV dans les produits frais (Baert *et al* 2011).

Après la mise au point de RT-PCR permettant d'y détecter les NoV (Baert *et al* 2007, Loisy *et al* 2005), les mollusques bivalves, principalement les huîtres et les moules, se sont rapidement avérés être une source importante d'infections toxico-alimentaires à NoV (Westrell *et al* 2010). Ces infections engendrent des épidémies de grande ampleur dans la population, accompagnées de conséquences socio-économiques néfastes (Hall *et al* 2012, Karim *et al* 2015).

La possibilité de détecter uniquement les particules virales infectieuses dans les mollusques permettrait d'agir à la source de la transmission virale, et de réduire considérablement le risque de contamination. Des travaux de recherches sur ces mollusques sont en cours. En Belgique, le CHU de Liège collabore actuellement avec le Service de Virologie Vétérinaire de l'ULiège et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER, Nantes, France) à la réalisation d'un projet de recherche ayant pour objectif la mise au point d'une nouvelle méthode permettant de détecter les NoV infectieux dans les matrices alimentaires. Ce projet, intitulé 'Identification et quantification de norovirus infectieux pathogènes pour l'homme dans les denrées alimentaires - Développement d'une méthode alternative à la « binding long-range RT-PCR » pour la confirmation comme norovirus infectieux des signaux émis par RT-PCR (IQUINOR)', est financé par le SPF (Service Public Fédéral) - Santé Publique. Actuellement, en l'absence de méthodes de culture *in vitro* robustes et aisément accessibles aux laboratoires, les techniques utilisées pour vérifier l'infectiosité des NoV sont basées sur la détection de l'intégrité de la capsid virale à l'aide de différentes techniques utilisant notamment le propidium azide (PMA). Le développement et l'accès à l'utilisation de

cultures cellulaires organoïdes *in vitro* dans les laboratoires permettrait de vérifier directement et efficacement l'infectiosité des NoV.

La Belgique a l'opportunité de bénéficier d'un Centre National de Référence (CNR) des NoV (Sciensano, Bruxelles). On ne saurait dès lors trop encourager les cliniciens concernés, que ce soit au chevet du patient ou au laboratoire, à déclarer toutes les épidémies à NoV, aussi bien communautaires que nosocomiales, et à envoyer des échantillons au CNR afin de leur permettre de caractériser les NoV en cause et d'améliorer les connaissances épidémiologiques des souches de NoV circulantes.

Dans cet ordre d'idées, la littérature nous indique la nécessité de réaliser des études dans certains pays pour lesquels les données épidémiologiques font cruellement défaut. La majorité des études portant sur les NoV en Afrique ont été réalisées chez les enfants, et l'étude épidémiologique des NoV mériterait dès lors d'être approfondie chez les grands enfants et les adultes, et d'être élargie à d'autres pays du continent africain afin de comparer leurs données à celles des autres continents.

Des vaccins contre les NoV ont été mis au point et en sont au stade d'étude clinique (Riddle et Walker 2016). Quant à savoir à quelle population cible il serait opportun de destiner ces vaccins afin de donner une plus-value substantielle en termes de Santé Publique, cette question est actuellement sans réponse, en partie en raison d'un manque de données épidémiologiques sur les NoV dans une partie du globe.

L'incidence des gastro-entérites à NoV est la plus élevée chez les enfants, en particulier les jeunes enfants de moins de 5 ans, et ce depuis l'introduction de la vaccination contre le rotavirus dans les pays industrialisés (Hemmings *et al* 2013, Payne *et al* 2013, Phillips *et al* 2010a). C'est une donnée dont il conviendrait de tenir compte pour le choix des populations à vacciner, dans le but de diminuer la transmission virale mais également au regard de l'atteinte possiblement plus sévère chez les enfants. Une récente étude systématique portant sur la mortalité dans le décours d'une diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans a mis en évidence que les infections à NoV et à rotavirus conduisent à une hospitalisation dans 14 et 38% des cas respectivement (Lanata *et al* 2013).

Dans les pays industrialisés, d'autres populations cibles pourraient également être prises en compte, comme les voyageurs vers des pays en voie de développement, le personnel de soins de santé et le personnel de cuisine qui sont plus à risque d'impacter la fréquence et l'ampleur des épidémies à NoV, et les personnes âgées en raison du taux de morbidité plus élevé lors d'une infection à NoV. Dans les pays à faibles et moyens revenus, en l'absence de

données épidémiologiques pour toutes les tranches d'âge et pour les différentes régions géographiques, les conséquences des infections à NoV sont difficiles à évaluer et sont probablement sous-estimées. La connaissance de l'épidémiologie mondiale des NoV est un facteur déterminant pour le choix de la population à vacciner, d'où l'importance de disposer des données pour tous les pays.

Un autre point d'intérêt réside dans la diversité génétique des souches de NoV circulant chez les patients VIH, qui est à ce jour largement méconnue et nécessiterait d'être investiguée. En particulier, il serait intéressant d'étudier l'éventuel impact d'une réponse immunitaire amoindrie par une infection à VIH non traitée, sur l'évolution des NoV et la diversité des souches.

Dans nos pays industrialisés, la majorité des patients infectés par le VIH bénéficient d'une thérapeutique antivirale, ce qui n'est pas le cas des pays à faibles revenus. Dans un pays d'Afrique où le VIH est endémique et où la majorité de la population n'a pas accès au traitement anti-VIH, Il serait dès lors intéressant d'envisager une étude des NoV chez des adultes infectés *versus* non infectés par le VIH, et présentant ou non une symptomatologie digestive.

Une toute autre perspective concerne l'étude du potentiel virémique des NoV. Chez les patients immunocompétents, une virémie et une atteinte systémique peuvent survenir chez une majorité d'enfants atteints d'une gastroentérite sévère à rotavirus, et ces virus peuvent être détectés dans des tissus non-intestinaux chez ces enfants par ailleurs immunocompétents (Blutt *et al* 2003, Blutt *et al* 2007). Les symptômes extra-intestinaux tels qu'une symptomatologie respiratoire ou les manifestations d'une atteinte du système nerveux central ne sont pas inhabituels (Banyai *et al* 2018). Tout comme les rotavirus, il est envisageable que les infections à NoV puissent dépasser le cadre strict de l'atteinte gastro-intestinale. Peu d'études portant sur les virémies à NoV ont jusqu'à présent été rapportées, et la présence d'ARN de NoV dans la circulation sanguine n'a pas été souvent mise en évidence chez les patients (Huhti *et al* 2016, Takanashi *et al* 2009). Quelques cas des manifestations extra-digestives ont été décrits dans le décours d'une infection à NoV chez les enfants et chez les adultes, notamment des encéphalites accompagnées d'une virémie chez quelques patients (Ito *et al* 2006, Chan *et al* 2011, Kimura *et al* 2010, Obinata *et al* 2010).

En dehors des études réalisées chez les patients immunocompétents, la littérature rapporte très peu d'études sur les virémies à NoV chez les patients immunocompromis. Lemes *et al* ont décrit une virémie prolongée avec une moyenne de 36 jours suite à une gastro-entérite, chez des patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Lemes

et al 2014). Dans la continuité des études réalisées, il serait intéressant d'investiguer la présence éventuelle d'ARN de NoV dans le sang et d'organes autres que la sphère gastro-intestinale chez les patients transplantés rénaux.

VI. Références bibliographiques

Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS One*, 2013, 8: e75922.

Ahmed SM, Hall Aron J, Robinson AE, Verhoef Linda, Premkumar Prasanna, Parashar UD, Koopmans M, Lopman B Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14:725–730.

Albers MK. An unwanted visitor. Aggressive infection control strategies are needed to shorten the hospital visit of the easily spread norovirus. *Can Nurse*, 2004, 100: 21–26.

Aliabadi N, Lopman BA, Parashar UD, Hall AJ. Progress toward norovirus vaccines: considerations for further development and implementation in potential target populations. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(9):1241–53.

Allen DJ, Harris JP. Methods for ascertaining norovirus disease burdens. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13:2630–2636.

Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol*, 2013, 56:194–198.

Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *J Hosp Infect*, 2010, 75: 42–46.

Armah GE, Gallimore CI, Binka FN, Asmah RH, Green J, Ugoji U, et al. Characterisation of norovirus strains in rural Ghanaian children with acute diarrhoea. *J Med Virol*, 2006, 78:1480–5.

Arness MK, Feighner BH, Canham ML, Taylor DN, Monroe SS, Cieslak TJ, Hoedebecke EL, Polyak CS, Cuthie JC, Fankhauser RL, Humphrey CD, Barker TL, Jenkins CD, Skillman DR. Norwalk-like viral gastroenteritis outbreak in U.S. Army trainees. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6:204–207.

Atmar RL, Baehner F, Cramer JP, Song E, Borkowski A, Mendelman PM. Rapid Responses to 2 Virus-Like Particle Norovirus Vaccine Candidate Formulations in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Infect Dis*, 2016, 214(6):845–53.

Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. *N Engl J Med*, 2011, 365: 2178–2187.

Atmar RL, Bernstein DI, Lyon GM, Treanor JJ Al-Ibrahim MS, Graham DY, Vinjé J, Jiang X, Gregoricus N, Frenck RW, Moe CL, Chen WH, Ferreira J, Barrett J, Opekun AR, Estes MK, Borkowski A, Baehner F, Goodwin R, Edmonds A, Mendelman PM. Serological correlates of protection against a GII.4 norovirus. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22: 923–929.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: 1553–1557.

Avery RK, Lonze BE, Kraus ES, Marr KA, Montgomery RA. Severe chronic norovirus diarrheal disease in transplant recipients: Clinical features of an under-recognized syndrome. *Transpl Infect Dis*, 2017, 19(2).

Ayukekbong J, Lindh M, Nenonen N, Tah F, Nkuo-Akenji T, Bergstrom T. Enteric viruses in healthy children in Cameroon: viral load and genotyping of norovirus strains. *J Med Virol*, 2011, 83:2135–42.

Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, Lebeau B, Stals A, Van Coillie E, Herman L, Uyttendaele M. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol*, 2011, 151:261–269.

Baert L, Uyttendaele M, Debevere J. Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44:106–111.

Bagci S, Eis-Hubinger AM, Yassin AF, Simon A, Bartmann P, Franz AR, Mueller A. Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29:1079–1084.

Banerjee A, McKinley ET, von Moltke J, Coffey RJ, Lau KS. Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. *J Clin Invest*, 2018, 128(5):1711–1719.

Bányai B, Estes MK, Martella, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*, 2018, 392: 175–86.

Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinje J, Lopman B. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20:731–740.

Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One*, 2016, 11: e0151219.

Battaglioli G, Nazarian EJ, Lamson D, Musser KA, St George K. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *J Clin Virol*, 2012, 53:262–264.

Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, Treanor JJ, Chen WH, Jiang X, Vinje J, Gregoricus N, Frenck RW Jr, Moe CL, Al-Ibrahim MS, Barrett J, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Goodwin R, Borkowski A, Clemens R, Mendelman PM. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis*, 2015, 211(6):870–8.

Blutt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(1):39–43. Review.

Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet*, 2003, 362(9394):1445–9.

- Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, Green KY. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol*, 2009, 83: 11890–11901.
- Bok K, Green KY. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med*, 2013, 367:2126–2132.
- Bon F, Giraudon H, Sancey C, Barranger C, Joannes M, Pothier P, Kohli E. Development and evaluation of a new commercial test allowing the simultaneous detection of noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR and microplate hybridization. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:2218–2220.
- Boyce JM, Pittet D, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, Society for Healthcare Epidemiology of America, Association for Professionals in Infection Control, Infectious Diseases Society of America Hand Hygiene Task Force. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002, 23: S3–S40.
- Brakemeier S, Taxeidi SI, Durr M, Hofmann J, Schmidt D, Bachmann F, Gaedeke J, Budde K. Clinical outcome of norovirus infection in renal transplant patients. *Clinical transplantation*, 2016, 30:1283–1293.
- Bruggink LD, Dunbar NL, Marshall JA. Evaluation of the updated RIDA®QUICK (Version N1402) immunochromatographic assay for the detection of norovirus in clinical specimens. *J Virol Methods*, 2015, 223:82–7.
- Bruggink LD, Witlox KJ, Sameer R, Catton MG, Marshall JA. Evaluation of the RIDA®QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *J Virol Methods*, 2011, 173(1):121–6.
- Bruins MJ, Wolfhagen MJ, Schirm J, Ruijs GJ. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29:741–743.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 2005, 365:1147–52.
- Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Kindberg E, Paniagua M, Mollby R, Svensson L. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29:934–939.
- Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11:1079–1085.
- Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol*. 2007,88:3347-59.

Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, Rogatcheva M, Kanack KJ, Bourzac KM. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 2015, 53: 915–925

Butot S, Le Guyader FS, Krol J, Putallaz T, Amoroso R, Sanchez G. Evaluation of various real-time RT-PCR assays for the detection and quantitation of human norovirus. *J Virol Methods*, 2010, 167: 90–94.

Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel—Afghanistan, May 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly*, 2002, Rep 51:477–479.

Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney—United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly*, 2012, Rep 62: 55, 1136–1142.

Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, Curry A, O'Brien S, Quigley K, Sellwood J, Westmoreland D. Management of hospital outbreaks of gastroenteritis due to small roundstructured viruses. *J Hosp Infect*, 2000, 45 (1):1–10.

Chan CM, Chan CW, Ma CK, Chan HB. Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. *J Paediatr Child Health*, 2011,47:373–377.

Cheesebrough JS, Barkess-Jones L, Brown DW. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect*, 1997,35:325-6.

Cheng FW, Leung TF, Lai RW, Chan PK, Hon EK, Ng PC. Rapid control of norovirus gastroenteritis outbreak in an acute paediatric ward. *Acta Paediatr*, 2006, 95:581–586.

Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, Kohli E. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4266–4272.

Cooper E, Blamey S. A norovirus gastroenteritis epidemic in a long-term-care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005, 26:256–258.

Cortes-Penfield NW, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther*, 2017, 39(8):1537-1549.

Costantini V, Grenz L, Fritzingler A, Lewis D, Biggs C, Hale A, Vinje J. Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus. *J Clin Microbiol*, 2010, 48:2770–2778.

Coste JF, Vuiblet V, Moustapha B, Bouin A, Lavaud S, Toupance O, de Rougemont A, Benejat L, Megraud F, Wolak-Thierry A, Villena I, Chemla C, Le Magrex E, de Champs C, Andreoletti L, Rieu P, Leveque N. Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays. *J Clin Microbiol*, 2013, 51:1841–1849.

Currier RI, Payne DC, Staat MA, Selvaragan R, Shirley SH, Halasa N, Boom JA, Englund JA, Szilagyi PG, Harrison CJ, Klein EJ, Weinberg GA, Wikswo ME, Parashar U, Vinjé J, Morrow AL. Innate susceptibility to Norovirus infections influenced by FUT2 genotype in a United States pediatric population. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2015, 60(11):1631–8.

Da Silva Poló T, Peiró JR, Mendes LC, Ludwig LF, de Oliveira-Filho EF, Bucardo F, Huynen P, Melin P, Thiry E, Mauroy A. Human norovirus infection in Latin America. *J Clin Virol*, 2016, 78:111–9.

Daniel-Wayman S, Fahle G, Palmore T, Green KY, Prevots DR. Norovirus, astrovirus, and sapovirus among immunocompromised patients at a tertiary care research hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 92(2):143–146.

De Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*, 2015, 20(26).

De Graaf M, van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 2016,14:421–433.

De Grazia S, Bonura F, Cappa V, Li Muli S, Pepe A, Urone N, Giammanco GM. Performance evaluation of a newly developed molecular assay for the accurate diagnosis of gastroenteritis associated with norovirus of genogroup II. *Arch Virol*, 2018,163(12):3377–3381.

Debbink K, Lindesmith LC, Baric RS. The state of norovirus vaccines. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2014, 58:1746–1752.

Deng J, Luo X, Wang R et al. A comparison of Luminex xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG GPP) and routine tests for the detection of enteropathogens circulating in Southern China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015, 83: 325–330.

Desai R, Hembree CD, Handel A, Matthews JE, Dickey BW, McDonald S, Hall AJ, Parashar UD, Leon JS, Lopman B. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clin Infect Dis*, 2012, 55:189–193.

Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ*, 2018, 67(10):1–11.

Dimitriadis A, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks. *Pathology*, 2006, 38(2):157–65.

Donaldson EF, Lisa C. Lindesmith, Anna D. LoBue, Ralph S. Baric. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8:231–241.

Doshi M, Woodwell S, Kelleher K, Mangan K, Axelrod P. An outbreak of norovirus infection in a bone marrow transplant unit. *Am J Infect Control*, 2013, 41:820–823.

Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect*, 1999, 41:51–7.

Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol*, 2005, 77:522–7.

Dreier J, Stormer M, Made D, Burkhardt S, Kleesiek K. Enhanced reverse transcription-PCR assay for detection of norovirus genogroup I. *J Clin Microbiol*, 2006, 44:2714–2720.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol*, 2004, 85:79–87.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, de Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:4538–43.

Dunbar NL, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the RIDAGENE real-time PCR assay for the detection of GI and GII norovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 79: 317–321.

Dutta D, Clevers H. Organoid culture systems to study host-pathogen interactions. *Curr Opin Immunol*, 2017, 48:15–22.

Echenique IA, Penugonda S, Stosor V, Ison MG, Angarone MP. Diagnostic yields in solid organ transplant recipients admitted with diarrhea. *Clin Infect Dis*, 2015, 60:729–37.

Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 2016, 353:1387–1393.

Everardo Vega et al. RNA Populations in Immunocompromised Patients as Reservoirs for Novel Norovirus Variants. *Journal of Virology*, 2014, 88(24):14184–14196.

Fang H, Tan M, Xia M, Wang L, Jiang X. Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. *PLoS One*, 2013, 8(4): e63269.

Farkas T, Singh A, Le Guyader FS, La Rosa G, Saif L, McNeal M. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of GI, GII and GIV noroviruses. *J Virol Methods*, 2015, 223: 109–114.

Forbes P. Here Are Noma's Statements on the Norovirus Outbreak. *Eater*, 2018 March 11.

Frange P, Touzot F, Debre M, Heritier S, Leruez-Ville M, Cros G, Rouzioux C, Blanche S, Fischer A, Avettand-Fenoel V. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis*, 2012, 206(8):1269– 1274.

Fritzlar S, Jegaskanda S, Aktepe TE, Prier JE, Holz LE, White PA, Mackenzie JM. Mouse Norovirus infection reduces the surface expression of MHC class I proteins and inhibits CD8+ T cell recognition and activation. *J Virol*, 2018, 92 (18) e0028618.

Fu JG, Shi C, Xu C, Lin Q, Zhang J, Bao CJ, Huo X, Zhu YF, Ai J, Xing Z. Outbreaks of acute gastroenteritis associated with a re-emerging GII.P16-GII.2 norovirus in the spring of 2017 in Jiangsu, China. *PLoS One*, 2017, 12: e0186090.

Fu JG, Shi C, Xu C, Lin Q, Zhang J, Yi QH, Zhang J, Bao CJ, Huo X, Zhu YF, Ai J, Xing Z. Outbreaks of acute gastroenteritis associated with a re-emerging GII.P16-GII.2 norovirus in the spring of 2017 in Jiangsu, China. *PLoS One*, 2017, 12(12):e0186090.

Garcia C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol*, 2006, 44:2997–3000.

Gaythorpe KAM, Trotter CL, Conlan AJK. Modelling norovirus transmission and vaccination. *Vaccine*, 2018, 36(37):5565-5571.

Geginat G, Kaiser D, Schrempf S. Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31:733–737.

Georgiadou SP, Loukeris D, Smilakou S, Daikos GL, Sipsas NV. Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Euro Surveill*, 2011, 16(28):19915.

Gerbe G, Jay P. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*, 2016, 9(6):1353–1359.

Gibson KE, Opryszko MC, Schissler JT, Guo Y, Schwab KJ. Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84:20-9.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, 2009, 361(18): 1776–1785.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis*, 1994, 170(1):34–43.

Grau KR, Roth AN, Zhu S, Hernandez A, Colliou N, DiVita BB, Philip DT, Riffe C, Giasson B, Wallet SM, Mohamadzadeh M, Karst SM. The targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nat Microbiol*, 2017, 2(12):1586–1591.

Grau KR, Roth AN, Zhu S, Hernandez A, Colliou N, DiVita BB, Philip DT, Riffe C, Giasson B, Wallet SM, Mohamadzadeh M, Karst SM. The major targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nat Microbiol*, 2017,2(12):1586–1591.

Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Giraudon H, Pothier P, Di Bartolo I, Inglese N, de Bruin E, van der Veer B, Moreno S, Montero V, de Llano MC, Hohne M, Diedrich SM. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14:1349–1355.

Green KY. Summary of the first international workshop on human caliciviruses. *J Infect Dis*, 2000, 181 (S2):S252–3.

Green KY. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 6th ed. Vol. I. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp 582–608.

Green KY. Norovirus infection in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20:717–23.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, 2000, 181(S 2): S322-S330.

Greig JD, Lee MB. A review of nosocomial norovirus outbreaks: infection control interventions found effective. *Epidemiol Infect*, 2012, 140:1151–1160.

Haessler S, Granowitz EV. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med*, 2013, 368:971.

Hall CF, Newell P, Ford C, Whitley M, Cox J, Wallis M, Best R, Jenks PJ. Compartmentalization of wards to cohort symptomatic patients at the beginning and end of norovirus outbreaks. *J Hosp Infect*, 2012, 82:30–35.

Hansen S, Stamm-Balderjahn S, Zuschneid I, Behnke M, Ruden H, Vonberg RP, Gastmeier P. Closure of medical departments during nosocomial outbreaks: data from a systematic analysis of the literature. *J Hosp Infect*, 2007, 65:348–353.

Hall AJ, Eisenbart VG, Etingue AL, Gould LH, Lopman BA, Parashar UD. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(10):1566–73.

Hall AJ, Vinje J, Lopman B, et al. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep*, 2011, 60:1–20.

Hall AJ, Wikswa ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH. Acute gastroenteritis surveillance through the national outbreak reporting system, United States. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19: 1305–1309.

Hall AJ, Wikswa ME, Pringle K, Gould LH, Parashar UD; Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2014, 63(22):491–5.

Hallowell BD, Parashar UD, Hall AJ. Epidemiologic challenges in norovirus vaccine development. *Hum Vaccin Immunother.* 2018 Nov 27. doi: 10.1080/21645515.2018.1553594. [Epub ahead of print]

Han TH, Kim SC, Kim ST, Chung CH, Chung JY. Detection of norovirus genogroup IV, klassevirus, and pepper mild mottle virus in sewage samples in South Korea. *Arch Virol,* 2014, 159(3):457–63.

Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis,* 2008, 14(10):1546–52.

Hauri AM, Westbrock HJ, Claus H, Geis S, Giernat S, Forssbohm M, Uphoff H. Electronic outbreak surveillance in Germany: a first evaluation for nosocomial norovirus outbreaks. *PLoS One,* 2011, 6:e17341.

Heijne JC, Teunis P, Morroy G, Wijkmans C, Oostveen S, Duizer E, Kretzschmar M, Wallinga J. Enhanced hygiene measures and norovirus transmission during an outbreak. *Emerg Infect Dis,* 2009, 15:24–30.

Hemming M, Räsänen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTaq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr,* 2013, 172(6):739-46.

Henke-Gendo C, Harste G, Juergens-Saathoff B, Mattner F, Deppe H, Heim A. New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children. *J Clin Microbiol,* 2009, 47(9):2855–62.

Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol,* 2013, 56:185–193.

Hohne M, Schreier E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol,* 2004, 72: 312–319.

Hoehne M, Schreier E. Detection of norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3 -minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect Dis,* 2006, 6:69.

Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, Jiang X. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol,* 2005, 79(11):6714–22.

Huhti L, Hemming-Harlo M, Vesikari T. Norovirus detection from sera of young children with acute norovirus gastroenteritis. *J Clin Virol,* 2016, 79:6–9.

Hutson AM, Airaud F, LePendu J, Estes MK, Atmar RL. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J Med Virol*, 2005, 77(1):116–20.

Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LG, Boreux R, Thiry E, Melin P, De Mol P. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol*, 2013, 58:515–521.

Hyun J, Kim, HS, Kim HS, Lee KM. Evaluation of a new real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of norovirus in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014, 78:40–44.

Illingworth E, Taborn E, Fielding D, Cheesbrough J, Diggle PJ, Orr D. Is closure of entire wards necessary to control norovirus outbreaks in hospital? Comparing the effectiveness of two infection control strategies. *J Hosp Infect*, 2011, 79:32–37.

Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, Miyoshi M, Okano M, Okui T. Sensitive and rapid detection of norovirus using duplex TaqMan reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 2008, 80:913–920.

Ito S, Takeshita S, Nezu A, Aihara Y, Usuku S, Noguchi Y, Yokota S. Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25:651– 652.

Jeong AY, Jeong HS, Lee JS, Park YC, Lee SH, Hwang IG, Kim YJ, Kim YJ, Jo MY, Jung S, Kim K, Cheon DS. Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *J Clin Microbiol*, 2013, 51:598–600.

Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:2529–2534.

John T. Norovirus Is Spreading Like Crazy at the 2018 Winter Olympics. *Time*, 2018, February 9.

Johnston CP, Qiu H, Ticehurst JR, Dickson C, Rosenbaum P, Lawson P, Stokes AB, Lowenstein CJ, Kaminsky M, Cosgrove SE, Green KY, Perl TM. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis*, 2007, 45:534–540.

Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinjé J, Tibbetts SA, Wallet SM, Karst SM. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*, 2014, 346:755–759.

Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, Graves CL, Koopmans M, Wallet SM, Tibbetts SA, Schultz-Cherry S, Wobus CE, Vinjé J, Karst SM. Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc*, 2015, 10:1939–1947.

Jones MK, Karst SM. Enteric Viruses Hitch a Ride on the Evolutionary Highway. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(1):5–6.

Kabue JP, Meader E, Hunter PR, Potgieter N. Norovirus prevalence and estimated viral load in symptomatic and asymptomatic children from rural communities of Vhembe district, South Africa. *J Clin Virol*, 2016, 84:12–18.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1548–1557.

Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Aho S, Pothier P, Belliot G. Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *J Appl Microbiol*, 2010, 108:1620–9.

Kanwar N, Hassan F, Barclay L, Langley C, Vinjé J, Bryant PW, George KS, Mosher L, Matthews-Greer JM, Rocha MA, Beenhouwer DO, Harrison CJ, Moffatt M, Shastri N, Selvarangan R. Evaluation of RIDA[®]GENE norovirus GI/GII real time RT-PCR using stool specimens collected from children and adults with acute gastroenteritis. *J Clin Virol*, 2018, 104:1-4.

Kapikian AZ. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, 1972, 10(5):1075–81.

Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health*, 1982, 72:1329–1332.

Karim MR, Fout GS, Johnson CH, White KM, Parshionikar SU. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J Virol Methods*, 2015, 219:51–61.

Karst SM, Wobus CE. A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): e1004626.

Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Morse DL, Morotti RA, Magid MS, Gondolesi GE, Florman SS, Fishbein TM. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005, 40(3):328–33.

Kele B, Lengyel G, Deak J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70:475–478.

Khamrin Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of a new immunochromatographic assay kit for the rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods*, 2008, 147(2):360–363.

Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods*, 2009, 157(2):219-22.

Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, Pritt BS, Patel R, Binnicker MJ. Multiplex detection of gastrointestinal pathogens: a comparative evaluation of two commercial panels using clinical stool specimens. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(10):3667–73.

Kim HS, Kim JS. Discrepancies between Antigen and Polymerase Chain Reaction Tests for the Detection of Rotavirus and Norovirus. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(3):282–5.

Kim HS, Hyun J, Kim JS, Song W, Kang HJ, Lee KM. Evaluation of the SD Bioline norovirus rapid immunochromatography test using fecal specimens from Korean gastroenteritis patients. *J Virol Methods*, 2012, 186: 94–98.

Kim L, Liebowitz D, Lin K, Kasperek K, Pasetti MF, Garg SJ, Gottlieb K, Trager G, Tucker SN. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial. *JCI Insight*, 2018, 12:3(13).

Kimura E, Goto H, Migita A, Harada S, Yamashita S, Hirano T, Uchino M. An adult norovirus-related encephalitis/encephalopathy with mild clinical manifestation. *BMJ Case Rep*, 2010, bcr0320102784.

Kirby A, Gurgel RQ, Dove W, Vieira SC, Cunliffe NA, Cuevas LE. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immune assays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J Clin Virol*, 2010, 49:254–257.

Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Diraphat P, Sujirarat D, Khamrin P, Ushijima H. Norovirus GII-4 2006b variant circulating in patients with acute gastroenteritis in Thailand during a 2006–2007 study. *J Med Virol*, 2010, 82: 854–860.

Kiulia NM, Netshikweta R, Page NA, Van Zyl WB, Kiraithe MM, Nyachio A, et al. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *J Appl Microbiol*, 2010, 109:818–28.

Knight A, Haines J, Stals A, Li D, Uyttendaele M, Jaykus LA. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International journal of food microbiology*, 2016, 216:40–49.

Knoll BM, Lindesmith LC, Yount BL, Baric RS, Marty FM. Resolution of diarrhea in an immunocompromised patient with chronic norovirus gastroenteritis correlates with constitution of specific antibody blockade titer. *Infection*, 2016, 44(4):551–4.

Kohli E, Bon F, Balay K, Pothier P. Human caliciviruses, a major cause of acute gastroenteritis. *Virologie*, 2005, 9:93–106.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*, 2002, 100:107–14.

Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*, 2004, 90(1): 23–41.

Koopmans M, Vennema H, Heersma H, van Strien E, van Duynhoven Y, Brown D, Reacher M, Lopman B, European Consortium on Foodborne Viruses. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9:1136–1142.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acacio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 2013, 382:209–222.

Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*, 2013, 158(10):2059–68.

Kumthip K, Khamrin P, Saikruang W, Supadej K, Ushijima H, Maneekarn N. Comparative Evaluation of Norovirus Infection in Children with Acute Gastroenteritis by Rapid Immunochromatographic Test, RT-PCR and Real-time RT-PCR. *J Trop Pediatr*, 2017, 63(6):468–475.

Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrhoeal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS one*. 2013, 8(9):e72788.

Le Guyader FS, Bon F, De Medici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol*, 2006, 44:3878–3882.

Le Guyader FS, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, Atmar RL. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol*, 1996, 141(11):2225–35.

Le Guyader FS, Le Saux J-C, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, Giraudon H, Delmas G, Pommepuy M, Pothier P, Atmar RL. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:4011–4017.

Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 2018, 46:708–717.

Lemes LG, Corrêa TS, Fiaccadori FS, Cardoso Dd, Arantes Ade M, Souza KM, Souza M. Prospective study on Norovirus infection among allogeneic stem cell transplant recipients: prolonged viral excretion and viral RNA in the blood. *J Clin Virol*, 2014, 61(3):329–33.

Lindersmith LC, Ferris MT, Mullan CW, Ferreira J, Debbink K, Swanstrom J, Richardson C, Goodwin RR, Baehner F, Mendelman PM, Bargatze RF, Baric RS. Broad blockade antibody responses in human volunteers after immunization with a multivalent norovirus VLP candidate vaccine: immunological analyses from a phase I clinical trial. *PLoS Med*, 2015, 12(3): e1001807.

Lindsmith LC, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendou J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*, 2003, 9(5):548–53.

Liu P Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76:394–9.

Liu W, Chen Y, Jiang X, Xia M, Yang Y, Tan M, Li X, Rao Z. A Unique Human Norovirus Lineage with a Distinct HBGA Binding Interface. *PLoS Pathog*, 2015, 11(7): e1005025.

Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods*, 2005, 123: 1–7.

Lopman BA, Gastanaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinje J. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol*, 2012, 2:96–102.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10:1827–1834.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis*, 2004, 39:318–324.

Lu J, Fang L, Zheng H, Lao J, Yang F, Sun L, Xiao J, Lin J, Song T, Ni T, Raghwani J, Ke C, Faria NR, Bowden TA, Pybus OG, Li H. The evolution and transmission of epidemic GII.17 noroviruses. *J Infect Dis*, 2016, 214: 556–64.

Lucero Y, Vidal R, O’Ryan G M. Norovirus vaccines under development. *Vaccine*, 2018, 36(36):5435-5441.

Ludwig-Begall L, Mauroy A, Thiry E. Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab – a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Vir*, 2018, 99(8):970–988.

MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, Lee I, Kuntz G, Stevenson KB. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee-HICPAC. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011, 32(10):939–69.

Malek M, Barzilay E, Kramer A, Camp B, Jaykus LA, Escudero-Abarca B, Derrick G, White P, Gerba C, Higgins C, Vinje J, Glass R, Lynch M, Widdowson MA. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(1):31–7.

Malm M, Uusi-Kerttula H, Vesikari T, Blazevic V. High serum levels of norovirus genotype-specific blocking antibodies correlate with protection from infection in children. *J Infect Dis*, 2014, 210: 1755–1762.

Mans J, de Villiers JC, du Plessis NM, Avenant T, Taylor MB. Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa. *J Clin Virol*, 2010, 49:258–64.

Mans GJ, Armah A., Steele D, Taylor MB. Norovirus Epidemiology in Africa: A Review. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0146280. Review.

Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, 2002, 122(7):1967–77.

Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, Cesar Pereira Santos H, das Dores de Paula Cardoso D. Monitoring of calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 norovirus and GI.3 sapovirus in Brazil. *J Med Virol*, 2014, 86:1569–1575.

Marshall J, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8(4):1141–9.

Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, Thiry E, Dierick K. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virol J*, 2011, 8:310.

Mathijs E, Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A, Scipioni A, Daube G, Dierick K, Herman L, Van Coillie E, Uyttendaele M, Thiry E. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food Environ Virol*, 2012, 4(4):131–52. Review.

Matthews RE. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 1979, 12(3-5):129-296.

Mattison K, Sebunya TK, Shukla A, Noliwe LN, Bidawid S. Molecular detection and characterization of noroviruses from children in Botswana. *J Med Virol*, 2010, 82:321–4.

Mattison K, Grudeski E, Auk B, Brassard J, Charest H, Dust K, Gubbay J, Hatchette TF, Houde A, Jean J, Jones T, Lee BE, Mamiya H, McDonald R, Mykytczuk O, Pang X, Petrich A, Plante D, Ritchie G, Wong J, Booth TF. Analytical performance of norovirus real-time RT-PCR detection protocols in Canadian laboratories. *J Clin Virol* 2011, 50: 109–113.

Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol*, 2002, 147(8): 1655–63.

McCall J, Smithson R. Rapid response and strict control measures can contain a hospital outbreak of Norwalk-like virus. *Commun Dis Public Health*, 2002, 5:243–246.

McFadden N, Bailey D, Carrara G, Benson A, Chaudhry Y, Shortland A, Heeney J, Yarovinsky F, Simmonds P, Macdonald A, Goodfellow I. Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. *PLoS Pathog*, 2011, 7(12): e1002413.

McHugh MP, Guerendiain D, Hardie A, Kenicer J, MacKenzie L, Templeton KE. Detection of Norovirus by BD MAX™, Xpert® Norovirus, and xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel in stool and vomit samples. *J Clin Virol*, 2018, 105:72–76.

Medici MC, Martinelli M, Ruggeri FM, Abelli LA, Bosco S, Arcangeletti MC, Pinardi F, De Conto F, Calderaro A, Chezzi C, Dettori G. Broadly reactive nested reverse transcription-PCR using an internal RNA standard control for detection of noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:3772–3778.

Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med*, 1980, 92(3):370–3.

Minton K. Viral tropism for tuft cells. *Nature Reviews Immunology* 2018,18 :360–361.

Moe CL, Gentsch J, Ando T, Grohmann G, Monroe SS, Jiang X, Wang J, Estes MK, Seto Y, Humphrey C, Stine S, Glass RI. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:642–648.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Norovirus 3rd generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods*, 2011, 173:13–16.

Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, et al. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatr*, 2011, 11:19.

Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26(1):46–9.

Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharya R, Vinje J, Kobayashi N, Sarkar MC, Bhattacharya MK, Krishnan T. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology*, 2008, 377(1):117–23.

Neesanant P, Sirinarumit T, Chantakru S, Boonyaprakob U, Chuwongkamon K, Bodhidatta L, Sethabutr O, Abente EJ, Supawat K, Mason CJ. Optimization of one-step real-time

reverse transcription-polymerase chain reaction assays for norovirus detection and molecular epidemiology of noroviruses in Thailand. *J Virol Methods*, 2013, 194: 317–325.

Newman KL, Moe CL, Kirby AE, Flanders WD, Parkos CA, Leon JS. Norovirus in symptomatic and asymptomatic individuals: cytokines and viral shedding. *Clin Exp Immunol*, 2016, 184:347–57.

Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Le Hoang P, Pham le D, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr*, 2007, 53(4):264–9.

Nicollier-Jamot B, Pico V, Pothier P, Kohli E. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(8):3901–4.

Obinata K, Okumura A, Nakazawa T, Kamata A, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T. Norovirus encephalopathy in a previously healthy child. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29:1057–1059.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol*, 2005, 33(2):168–71.

Pang X, Lee BE. Laboratory diagnosis of noroviruses: present and future. *Clin Lab*, 2015, 35: 345–362.

Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, et al. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13:908–11.

Park GW, Barclay L, Macinga D, Charbonneau D, Pettigrew CA, Vinje J. Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Prot*, 2010, 73:2232–2238

Park KS, Baek KA, Kim DU, Kwon KS, Bing SH, Park JS, Nam HS, Lee SH, Choi YJ. Evaluation of a new immunochromatographic assay kit for the rapid detection of norovirus in fecal specimens. *Ann Lab Med*, 2012, 32:79–81.

Parker SP, Cubitt WD, Jiang X. Enzyme immunoassay using baculovirus-expressed human calicivirus (Mexico) for the measurement of IgG responses and determining its seroprevalence in London, UK. *J Med Virol*, 1995, 46(3):194–200.

Partridge, D. G., C. M. Evans, M. Raza, G. Kudesia, and H. K. Parsons. Lessons from a large norovirus outbreak: impact of viral load, patient age and ward design on duration of symptoms and shedding and likelihood of transmission. *Journal Hosp Inf*, 2012, 81:25–30.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*, 2009, 44(1):1-8.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14:1224–1231.

Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, Hall CB, Chappell J, Bernstein DI, Curns AT, Wikswo M, Shirley SH, Hall AJ, Lopman B, Parashar UD. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N Engl J Med*, 2013, 368(12):1121–30.

Pelizzo G, Nakib G, Goruppi I, Fusillo M, Scorletti F, Mencherini S, Parigi GB, Stronati M, Calcaterra V. Isolated colon ischemia with norovirus infection in preterm babies: a case series. *J Med Case Rep*, 2013, 7:108.

Pether JV, Caul EO. An outbreak of food-borne gastroenteritis in two hospitals associated with a Norwalk-like virus. *J Hyg (Lond)*, 1993, 91: 343–350.

Petrignani M, Verhoef L, de Graaf M, Richardus JH, Koopmans M. Chronic sequelae and severe complications of norovirus infection: A systematic review of literature. *J Clin Virol*, 2018, 05:1–10.

Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, Iturriza-Gomara M, Gray J, Lopman B. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am J Epidemiol*, 2010a, 171(9):1014–22.

Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol Infect*, 2010b, 138:1454–1458.

Rahouma A, Klena JD, Krema Z, Abobker AA, Treesh K, Franka E, et al. Enteric pathogens associated with childhood diarrhea in Tripoli-Libya. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84:886–91.

Ramani S, Crawford SE, Blutt SE, Estes MK. Human organoid cultures: transformative new tools for human virus studies. *Curr Opin Virol*, 2018, 29:79–86.

Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Correlates of Protection against Norovirus Infection and Disease—Where Are We Now, Where Do We Go? *PLoS Pathog*, 2016, 12(4): e1005334.

Ramirez K, Wahid R, Richardson C, Bargatze RF, El-Kamary SS, Sztein MB, Pasetti MF. Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers. *Clin Immunol*, 2012, 144(2):98–108.

Reddington K, Tuite N, Minogue E, Barry T. A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens. *Biomol Detect Quantif*, 2014, 1: 3–7.

Reeck A, Kavanagh O, Estes MK et al. Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis*, 2010; 202: 1212–1218.

Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, Djie-Maletz A, Ziniel P, Amoo-Sakyi F, Danikuu F, Danour S, Otchwemah RN, Schreier E, Bienzle U, Stark K, Mockenhaupt FP. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis*, 2007, 7:104.

Reymão TKA, Fumian TM, Justino MCA, Hernandez JM, Bandeira RS, Lucena MSS, Teixeira DM, Farias FP, Silva LD, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus RNA in serum associated with increased fecal viral load in children: Detection, quantification and molecular analysis. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0199763.

Riddle MS, Walker RI. Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine*, 2016, 34:2895–2899.

Rimoldi SG, Stefani F, Pagani C, Chenal LL, Zanchetta N, Di Bartolo I, Lombardi A, Ruggeri FM, Di Lillo D, Zuccotti GV, Gismondo MR. Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol*, 2011, 156(9):1583–9.

Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(1):134–64.

Robles JD, Cheuk DK, Ha SY, Chiang AK, Chan GC. Norovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipients: incidence, risk factors, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18: 1883–1889.

Roddie C, Paul JP, Benjamin R, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Peggs KS, Morris EC, Thomson KJ, Ward KN. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis*, 2009, 49:1061–1068.

Rodríguez-Guillén L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol*, 2005, 33(2):104–9.

Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15(6):524–7.

Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenröder O, Mogel M, Poppe M, Henker J, Rethwilm A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods*, 2004, 118(1):49–59.

Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, Wreghitt TG, Jalal H, Zhang H, Curran MD. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. *J Clin Virol*, 2007, 39: 318–321.

Roos-Weil D, Ambert-Balay K, Lanternier F, Mamzer-Bruneel MF, Nochy D, Pothier P, Avettand-Fenoel V, Anglicheau D, Snanoudj R, Bererhi L, Thervet E, Lecuit M, Legendre C, Lortholary O, Zuber J. Impact of norovirus/sapovirus-related diarrheal renal transplant recipients hospitalized for diarrhea. *Transplantation*, 2011, 92:61–69.

Rouhani S, Peñataro Yori P, Paredes Olortegui M, Siguas Salas M, Rengifo Trigoso D, Mondal D, Bodhidatta L, Platts-Mills J, Samie A, Kabir F, Lima A, Babji S, Mason CJ, Kalam A, Bessong P, Ahmed T, Mduma E, Bhutta ZA, Lima I, Ramdass R, Lang D, George A, Zaidi AK, Kang G, Houpt E, Kosek MN. Norovirus Infection and Acquired Immunity in 8 Countries: Results From the MAL-ED Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*, 2016, 62(10):1210-7.

Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KM, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 75:110–111.

Rovida F, Premoli M, Campanini G, Sarasini A, Baldanti F. Evaluation of Xpert® Norovirus Assay performance in comparison with real-time RT-PCR in hospitalized adult patients with acute gastroenteritis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(4):426–7.

Ruppom K, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Diraphat P, Kittigul L. Evaluation of real-time RT-PCR assays for detection and quantification of norovirus genogroups I and II. *Virol Sin*, 2017, 32(2):139–146.

Russo PL, Spelman DW, Harrington GA, Jenney AW, Gunsekere IC, Wright PJ, Doultree JC, Marshall JA. Hospital outbreak of Norwalk-like virus. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997, 18:576–579.

Ruvoen-Clouet N, Belliot G, Le Pendu J. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Reviews in medical virology*, 2013, 23:355–366.

Saif MA, Bonney DK, Bigger B, Forsythe L, Williams N, Page J, Babiker ZO, Guiver M, Turner AJ, Hughes S, Wynn RF. Chronic norovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients: a cause of prolonged intestinal failure requiring intensive nutritional support. *Pediatr Transplant*, 2011, 15(5):505–9.

Schaeffer J, Treguier C, Piquet JC, Gachelin S, Cochennec-Laureau N, Le Saux JC, Garry P, Le Guyader FS. Improving the efficacy of sewage treatment decreases norovirus contamination in oysters. *Int J Food Microbiol*, 2018, 17, 286:1–5.

Schorn R, Höhne M, Meerbach A, Bossart W, Wüthrich RP, Schreier E, Müller NJ, Fehr T. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(3):307–14.

Schroten H, Hanisch FG, and Hansman G. S. Human norovirus interactions with histo- blood group antigens and human milk oligosaccharides. *J. Virol*, 2016, 90:5855–5859

Schorn R, Hohne M, Meerbach A, Bossart W, Wuthrich RP, Schreier E, Muller NJ, Fehr T. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis*, 2010, 51:307–314.

Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Norrung B, Hoorfar J, Vinje J. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Clin Virol*, 2011, 50: 230–234.

Schwartz M, Gluck M, Koon S. Norovirus gastroenteritis after fecal microbiota transplantation for treatment of *Clostridium difficile* infection despite asymptomatic donors and lack of sick contacts. *Am J Gastroenterol*, 2013, 11(8)

Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, Flegel WA, Thiel E, Schneider T. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2011, 117:5850–5856.

Scipioni A, Bourgot I, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Daube G, Thiry E. Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. *Mol Cell Probe*, 2008,22(4):215–22.

Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J*, 2008, 178(1):32–45.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:1349–55.

Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Hassine M, Chouchane S, et al. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis investigated using samples collected from children in Tunisia during a four-year period: detection of the norovirus variant GGII.4 Hunter as early as January 2003. *J Clin Microbiol*, 2009, 47:421–9.

Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Chouchane S, Sakly N, et al. Detection and molecular characterization of enteric viruses in environmental samples in Monastir, Tunisia between January 2003 and April 2007. *J Appl Microbiol*, 2010, 109:1093–104.

Seid L, Stokes W, Bayih AG, Getie S, Abere A, Tesfa H, Pillai DR. Molecular detection of Enteropathogens from diarrhetic stool of HIV positive patients in Gondar, Ethiopia. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1):354.

Shao L, Chen H, Hicks D, Wu C. Thermal inactivation of human norovirus surrogates in oyster homogenate. *Int J Food Microbiol*, 2018, 281:47–53.

Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis*, 2008, 198(7):994-1001.

Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, 2009, 200(5):802-12

Silva RC, Benati FJ, Pena GP, Santos N. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV-positive patients. *Braz J Infect Dis*, 2010, 14(6):549-52.

Siqueira JAM, Linhares AC, Oliveira DS, Soares LS, Lucena MS, Wanzeller AL, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Evaluation of third generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belem, Para, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71:391-395.

Silva PA, Stark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignatius R, et al. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. *J Med Virol*, 2008, 80:1790-8.

Son H, Jeong HS, Cho M, Lee J, Lee H, Yoon K, Jeong AY, Jung S, Kim K, Cheon DS. Seroepidemiology of predominant norovirus strains circulating in Korea by using recombinant virus-like particle antigens. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(5):461-6.

Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Werbrouck H, Herman L, Uyttendaele M, Van Coillie E. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *Journal of Virological Methods*, 2009, 161:247-253.

Stals A, Mathijs E, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A, Scipioni A, Daube G, Dierick K, Herman L, Van Coillie E, Thiry E, Uyttendaele M. Molecular detection and genotyping of noroviruses. *Food Environ Virol*, 2012, 4(4):153-67. Review.

Stelzner M, Helmrath M, Dunn JC, Henning SJ, Houchen CW, Kuo C, Lynch J, Li L, Magness ST, Martin MG, Wong MH, Yu J. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(12):1359-63.

Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Andrew Ramsden C, Andrianopoulos N, Jolley D, Bawden K, Doherty R, Kotsanas D, Bradford J, Buttery JP. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29:644-647.

Sukhrie FH, Siebenga JJ, Beersma MF, Koopmans M. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11):4303-5.

Sundararajan A, Sangster MY, Frey S, Atmar RL, Chen WH, Ferreira J, Bargatze R, Mendelman PM, Treanor JJ, Topham DJ. Robust mucosal-homing antibody-secreting B

cell responses induced by intramuscular administration of adjuvanted bivalent human norovirus-like particle vaccine. *Vaccine*, 2015, 33(4):568-76.

Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Tung PG, Nishimura S, Katsumata N, Igarashi T, Okitsu S, Ushijima H. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *J Virol Methods*, 2008, 148(1-2):1-8.

Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, Evans MR, Hunter PR, Gray JJ, Letley LH, Rait G, Tompkins DS, O'Brien SJ, IID2 Study Executive Committee. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*, 2012, 61:69-77.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24:1596-9.

Tan M, Jiang X. Norovirus Gastroenteritis, Carbohydrate Receptors, and Animal Models. *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1000983.

Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde RS, et al. (2009) Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces — Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5058.

Teixeira DM, Hernandez JM, Silva LD, Oliveira D de S, Spada PK, Gurjão TC, Mascarenhas JD, Linhares AC, Morais LL, Gabbay YB. Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol*, 2016, 8(1):10-4.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*, 2008, 80(8):1468-76.

Thongprachum A, Khamrin P, Tran DN, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *J Med Virol*, 2010, 82:2106-2109.

Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol*, 2014, 95:278-291.

Thorne L, Nalwoga A, Mentzer AJ, de Rougemont A, Hosmillo M, Webb E, Nampiija M, Muhwezi A, Carstensen T, Gurdasani D, Hill AV, Sandhu MS, Elliott A, Goodfellow I. The First Norovirus Longitudinal Seroepidemiological Study From Sub-Saharan Africa Reveals High Seroprevalence of Diverse Genotypes Associated With Host Susceptibility Factors. *J Infect Dis*, 2018, 218(5):716-725.

Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, Gormley R, Chen WH, Ferreira J, Goodwin R, Borkowski A, Clemens R, Mendelman PM. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate--reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *J Infect Dis*, 2014, 210(11):1763-71.

Trivedi TK, DeSalvo T, Lee L, Palumbo A, Moll M, Curns A, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Hospitalizations and mortality associated with norovirus outbreaks in nursing homes, 2009-2010. *JAMA*, 2012,308(16):1668–75.

Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut*, 2009, 58:1070–1071.

Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis*, 2006, 42:964–969.

Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, Friss HE. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr*, 2008, 153:339–344.

Van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinje J, White PA, Koopmans M. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*, 2013, 18(1):8–9.

Van Beek J, de Graaf M, Xia M, Jiang X, Vinjé J, Beersma M, de Bruin E, van de Vijver D, Holwerda M, van Houten M, Buisman AM, van Binnendijk R, Osterhaus AD, van der Klis F, Vennema H, Koopmans MP. Comparison of norovirus genogroup I, II and IV seroprevalence among children in the Netherlands, 1963, 1983 and 2006. *J Gen Virol*, 2016,97(9):2255–64.

Van Stelten A, Kreman TM, Hall N, Desjardin LE. Optimization of a real-time RT-PCR assay reveals an increase of genogroup I norovirus in the clinical setting. *J Virol Methods*, 2011, 175(1):80–4.

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinje J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol*, 2014,52: 147–155.

Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*, 2002, 25: 233–235.

Verbelen V, Bodéus M, Garrino MG, Scipioni A, Kabamba B, Daube G, Thiry E, Goubau P. Hospital outbreak of gastroenteritis due to Norovirus in Belgium. *Acta Clinica Belgica*, 2004, 59(1):30–3.

Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, Johnsen C, Kroneman A, Le Guyader S, Lim W, Maunula L, Meldal H, Ratcliff R, Reuter G, Schreier E, Siebenga J, Vainio K, Varela C, Vennema H, Koopmans M; Food Borne Viruses in Europe Network. Emergence of New Norovirus Variants on Spring Cruise Ships and Prediction of Winter Epidemics. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(2):238–243.

- Vinje J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2):373–381.
- Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis*, 1996, 174:610–615.
- Wang P, Goggins WB, Chan EYY. A time-series study of the association of rainfall, relative humidity and ambient temperature with hospitalizations for rotavirus and norovirus infection among children in Hong Kong. *Sci Total Environ*, 2018, 643:414–422.
- Waters A, Coughlan S, Hall WW. Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology*, 2007, 363:11–14.
- Weber DJ, Sickbert-Bennett EE, Vinje J, Brown VM, MacFarquhar JK, Engel JP, Rutala WA. Lessons learned from a norovirus outbreak in a locked pediatric inpatient psychiatric unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005, 26:841–843.
- Wessels E, Rusman LG, van Bussel MJ, Claas EC. Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20: O182–O187.
- Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, Schneider T, Zidek W, van der Giet M. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24:1051–1053.
- Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, Harris J, Hjertqvist M, Jourdan-da Silva N, Koller A, Lenglet A, Lisby M, Vold L. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill*, 2010,15(12).
- Wilen CB, Lee S, Hsieh LL, Orchard RC, Desai C, Hykes BL Jr, McAllaster MR, Balce DR, Feehley T, Brestoff JR, Hickey CA, Yokoyama CC, Wang YT, MacDuff DA, Kreamalmayer D, Howitt MR, Neil JA, Cadwell K, Allen PM, Handley SA, van Lookeren Campagne M, Baldrige MT, Virgin HW. Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science*, 2018, 360(6385):204–208.
- Wilhelmi de Cal I, Revilla A, del Alamo JM, Roman E, Moreno S, Sanchez-Fauquier A. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays for the detection of norovirus in faecal samples from hospitalised children with sporadic acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13:341–343.
- Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, Blanchard TJ. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: A novel cause. *J Clin Virology*, 2010, 49(3):219–22.
- Wobus CE. The Dual Tropism of Noroviruses. *J Virol*, 2018, 92(16).

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*, 2004, 2: e432.

Wollants E, De Coster S, Van Ranst M, Maes P. A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. *Infect Genet Evol*, 2015, 30:37–44.

Xia M, Wei C, Wang L, Cao D, Meng XJ, Jiang X, Tan M. A trivalent vaccine candidate against hepatitis E virus, norovirus, and astrovirus. *Vaccine*, 2016, 34(7):905-13.

Yan Y, Wang HH, Gao L, Ji JM, Ge ZJ, Zhu XQ, He PY, Chen ZW. A one-step multiplex real-time RT-PCR assay for rapid and simultaneous detection of human norovirus genogroup I, II and IV. *J Virol Methods*, 2013, 189(2):277–82.

Yang W, Steele M, Lopman B, Leon JS, Hall AJ. The population-level impacts of excluding norovirus-infected food workers from the workplace: a mathematical modeling study. *American Journal of Epidemiology*, 2018, 7.

Ye X, Van JN, Munoz FM, Revell PA, Kozinetz CA, Krance RA, Atmar RL, Estes MK, Koo HL. Noroviruses as a Cause of Diarrhea in Immunocompromised Pediatric Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 2015, 15(7):1874–81.

Yu JH, Kim NY, Lee EJ, Jeon IS. Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea. *J Korean Med Sci*, 2011, 26:734–739.

Zenda T, Kaneko S, Noriki S. Norovirus gastroenteritis accompanied by ischemic colitis: a case report. *Hiroshima J Med Sci*, 2010, 59:83–85.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346:312–23.

Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1):168–77.

Zhu S, Jones MK, Hickman D, Han S, Reeves W, Karst SM. Norovirus antagonism of B-cell antigen presentation results in impaired control of acute infection. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(6):1559–1570.

Zhuo R, Cho J, Qiu Y, Parsons BD, Lee BE, Chui L, Freedman SB, Pang X. High genetic variability of norovirus leads to diagnostic test challenges. *J Clin Virol*, 2017, 96:94–98.

Zonta W, Mauroy A, Farnir F, Thiry E. Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. *Food Environ Virol*, 2016a, 8(1):1–12.

Zonta W, Mauroy A, Farnir F, Thiry E. Virucidal Efficacy of a Hydrogen Peroxide Nebulization Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Two Surrogates of Human Norovirus. *Food Environ Virol*, 2016b, 8(4):275–282.