

**Centre National de Référence  
des HANTAVIRUS**

**Laboratoire Coordonnateur**

**Institut Pasteur  
Unité de Biologie des Infections  
Virales Emergentes  
21 avenue Tony Garnier  
69 365 LYON Cedex 7**

**Responsable :  
Jean-Marc REYNES**

**Laboratoire Associé  
Région Antilles-Guyane**

**Institut Pasteur de la Guyane  
Laboratoire de virologie  
23 avenue Pasteur  
BP 6010  
97306 Cayenne**

**Responsable :  
Séverine MATHEUS**

**Année d'exercice**

**2015**

# Remerciements

**Nous remercions pour leur précieuse collaboration permettant en particulier l'activité d'expertise et de surveillance tout au long de l'année:**

- l'unité des Maladies entériques, alimentaires, zoonotiques et à transmission vectorielle du département des maladies infectieuses de l'InVS,
- nos correspondants du réseau de laboratoires effectuant en première intention le diagnostic sérologique d'une infection par un hantavirus,
- la Special Pathogens Branch du CDC Atlanta (USA),

# Résumé analytique

Le CNR des Hantavirus, nouvelle entité, a été attribué pour la période allant du 1<sup>er</sup> janvier 2012 au 31 décembre 2016 à l'unité de Biologie des Infections Virales Emergentes (UBIVE) de l'Institut Pasteur à Lyon (laboratoire coordonnateur) et au laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (laboratoire associé). Le quart Nord-Est du territoire métropolitain est zone d'endémie de l'hantavirus Puumala responsable d'une fièvre hémorragique à syndrome rénal tandis que l'hantavirus Maripa, nouvellement décrit en Guyane, est responsable lui d'un syndrome cardio-pulmonaire. Le CNR a pour missions de développer une expertise sur les Hantavirus du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde, de contribuer à la surveillance des maladies provoquées par ces virus et d'émettre des alertes en cas de phénomènes anormaux.

Les résultats marquants de l'année sont les suivants :

- un niveau de détection de cas humains d'infection récente par un hantavirus en France métropolitaine en 2015 bien au-dessus de la moyenne annuelle de cas détectés sur la période 2003-2014. Cependant, la distribution géographique (quart nord-est de la France), la saisonnalité (pic en fin de printemps), le sex-ratio (2,8) et la médiane d'âge (39 ans) des cas sont sans grand changement par rapport à ce qui a été observé ces dix dernières années
- la détection d'un cas d'infection récente par le virus Seoul (confirmé virologiquement) à Paris *intra-muros*. La détection de cas au niveau européen est peu fréquente et les seuls cas confirmés virologiquement l'ont été en France.
- la détection d'un cas d'infection récente par le virus Tula (confirmé virologiquement), à 60 km à l'Est de Paris. La détection de cas pour ce virus européen est plus que rare. Le pouvoir pathogène de ce virus chez l'homme était discuté. Ce virus avait été détecté chez une seule personne, en République Tchèque, et qui était non immunocompétente. Notre détection est la première chez une personne immunocompétente. Le patient présentait un syndrome fébrile algique avec atteinte de la fonction hépatique. L'infection s'est faite probablement suite à la manipulation de campagnols infectés rapportés au domicile du patient par son chat.
- aucun cas humain d'infection récente par un hantavirus Maripa diagnostiqué par le laboratoire associé (Institut Pasteur de Guyane). Quatre cas ont été détectés depuis 2008 en Guyane: trois ont été mortels. Le virus Maripa est un variant de l'hantavirus Rio Mamoré décrit en Amérique du Sud.
- le renouvellement par le COFRAC de l'accréditation selon la norme ISO 15189 pour la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous-domaine Microbiologie Famille Sérologie Infectieuse (ISEROBM) IB1 (3 techniques de diagnostic sérologique : ELISA IgG Hantavirus, ELISA IgM Hantavirus et IF Hantavirus).
- l'accréditation selon la norme ISO 15189 par le COFRAC pour la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie Famille Virologie (VIROH) VB1 (1 technique de RT-PCR temps réel permettant la détection du virus Puumala).

# SOMMAIRE

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1   | Mission & organisation du CNR.....  | 5  |
| 2   | Activités d'expertise .....   | 5  |
| 2.1 | Evolution des techniques au cours de l'année .....  | 5  |
| 2.2 | Activités d'expertise proprement dites: .....   | 5  |
| 3   | Activités de surveillance .....   | 10 |
| 3.1 | Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....   | 10 |
| 3.2 | Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....                                   | 17 |
| 3.3 | Participation aux réseaux de surveillance.....  | 17 |
| 3.4 | Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....   | 18 |
| 4   | Alertes .....   | 20 |
| 4.1 | Cas d'infection récente par le virus Puumala groupés géographiquement.....                                      | 20 |
| 4.2 | Cas d'infection récente par le virus Seoul .....  | 20 |
| 4.3 | Cas d'infection récente par le virus Tula.....  | 20 |
| 5   | Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....                                 | 21 |
| 5.1 | Recherche d'hantavirus en France métropolitaine chez le hérisson commun<br>( <i>Erinaceus europaeus</i> ) ..... | 21 |
| 5.2 | Développements d'outils de diagnostic d'une infection par l'hantavirus Thailand ..                              | 21 |
| 5.3 | PHRC-N HANTADIAG.....   | 23 |
| 5.4 | Publications et communications réalisées en lien avec les activités de recherche ....                           | 23 |

## **1 Mission & organisation du CNR**

Par arrêté du 26 décembre 2011, le CNR des Hantavirus a été attribué pour la période allant du 1<sup>er</sup> janvier 2012 au 31 décembre 2016 à l'unité de Biologie des Infections Virales Emergentes (UBIVE) de l'Institut Pasteur à Lyon (laboratoire coordonnateur) et au laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (laboratoire associé). Les missions du CNR telles que définies dans l'appel à candidature de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) en février 2011 sont :

a). Apporter une expertise :

- participer au développement et à l'évaluation des techniques diagnostiques sérologiques et moléculaires des hantavirus, incluant les virus du Nouveau Monde en liaison avec les laboratoires des départements français d'outre-mer (DFA),
- apporter son expertise aux laboratoires de biologie de ville et hospitaliers pour le diagnostic des infections par les hantavirus (confirmation de diagnostic, identification de virus, séquençage),
- développer des collaborations avec des laboratoires étrangers, notamment au niveau européen.

b). Contribuer en lien avec l'Institut de veille sanitaire, à la surveillance épidémiologique :

- en s'appuyant sur un réseau de laboratoires,
- en participant à l'investigation de cas groupés,
- en collaborant avec les structures en charge de la surveillance chez l'animal.

c) Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout évènement inhabituel : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de l'expression clinique, formes inhabituelles), introduction d'un nouveau sérotype sur le territoire, etc.

Suite à l'émergence de l'hantavirus Maripa en Guyane, les missions du laboratoire associé sont en particulier de contribuer à la surveillance épidémiologique pour la région Antilles-Guyane, de développer et d'apporter une expertise microbiologique et de contribuer à l'alerte sanitaire en signalant à l'InVS, à la Cellule de l'InVS en région Antilles-Guyane (Cire) et aux Agences Régionales de Santé (ARS) concernées, l'identification de tout nouveau cas humain ou phénomène anormal.

## **2 Activités d'expertise**

Les techniques de référence, la liste des marqueurs épidémiologiques, les collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles ainsi que les conditions de stockage, et de mise à disposition de ces collections sont décrites dans l'annexe (§ 9.3).

### **2.1 Evolution des techniques au cours de l'année**

Le laboratoire coordonnateur a reconduit les techniques mises au point en 2013 et 2014 (constitution des dossiers de validation de méthode SH Form 44) et qui ont fait l'objet de l'accréditation en 2015.

### **2.2 Activités d'expertise proprement dites:**

#### **2.2.1 Confirmation de diagnostic (laboratoire coordonnateur)**

Depuis octobre 2004, du fait de la commercialisation de trousse de diagnostic sérologique des hantavirus, le laboratoire coordonnateur n'est plus le seul laboratoire

métropolitain à effectuer ce diagnostic. Des laboratoires de biologie médicale spécialisée ou non et des laboratoires hospitaliers proposent ce service (pour un coût d'environ 100 euros pour les laboratoires spécialisés, ce coût n'étant pas remboursé par la Sécurité Sociale). Dès fin 2004, il a été convenu entre le CNR et ces laboratoires que ces derniers adressent au CNR, à des fins de confirmation et de surveillance (centralisation des cas positifs), les prélèvements avec résultat positif mais également ceux avec un résultat limite ou négatif peu compatible avec la présentation clinique. Cette collaboration est effective et le laboratoire coordonnateur du CNR profite de cette occasion pour les en remercier. En plus du compte-rendu d'examen transmis au laboratoire, les discordances de résultats sont mentionnées par email au laboratoire concerné, dès qu'elles sont observées. Les résultats obtenus par le laboratoire coordonnateur font l'objet d'une vérification par un deuxième essai lorsqu'une discordance est observée. Il est important de procéder à cette confirmation des résultats des diagnostics sérologiques effectués avec des tests commerciaux relativement peu utilisés (en particulier en France).

Ces laboratoires sont au nombre de 15, fin 2015. Douze utilisent un test de diagnostic rapide permettant de détecter des IgM dirigées contre le virus Puumala (et contre les virus Dobrava-Hantaan pour l'un d'entre eux). Quatre utilisent un test ELISA, deux permettant de détecter les anticorps dirigés contre les hantavirus zoonotiques de l'Ancien-Monde et les deux autres, les anticorps dirigés contre les hantavirus zoonotiques de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde (un de ces laboratoires utilise également le test rapide). Ces laboratoires se trouvent pour la plupart dans la zone d'endémie des cas humains d'infection par le virus Puumala (*Tableau 1*). Un total de 279 prélèvements a été reçu de ces laboratoires.

#### ELISA IgG anti-hantavirus

La concordance de résultats était de 73% pour les 168 prélèvements testés par les laboratoires avec les trousse commerciale, avec un accord fort entre les techniques commerciales et celles du CNR (coefficient de Kappa pondéré 0,60 ; IC 95% : [0,48-0,73]). 10% des prélèvements seulement avaient une discordance complète (Positif – Négatif) (*Tableau 2*).

#### ELISA IgM anti-hantavirus

La concordance de résultats était de 65% pour les 168 prélèvements testés par les laboratoires avec les trousse commerciale, avec un accord modéré entre les techniques commerciales et celles du CNR (coefficient de Kappa pondéré 0,40 ; IC 95% : [0,23-0,56]). 11% des prélèvements seulement avaient une discordance complète (Positif – Négatif) (*Tableau 3*).

#### Test rapide PUUV IgM

La concordance de résultats était de 72% pour les 138 prélèvements testés par les laboratoires avec la trousse commerciale, avec un accord modéré entre la technique commerciale et celles du CNR (coefficient de Kappa pondéré 0,57 ; IC 95% : [0,41-0,72]). 10% des prélèvements seulement avaient une discordance complète (Positif – Négatif) (*Tableau 4*).

Les résultats de détection virale sur le prélèvement ou l'examen sérologique d'un 2<sup>ème</sup> prélèvement ont montré que les techniques commerciales mais aussi celles du CNR pouvaient être mises en défaut mais aucune tendance ne s'est dégagée. Il n'y avait pas un laboratoire ou une trousse de réactifs plus particulièrement concerné par ces discordances de résultats. A noter la proportion importante du nombre de prélèvements envoyés avec résultats positifs : la spécificité de ces tests est mieux étudiée que leur sensibilité.

Tableau 1 : Laboratoires effectuant en première intention un diagnostic sérologique des hantavirus en France métropolitaine et participant à la surveillance.

| Laboratoires                 | Trousses de diagnostic sérologique Hantavirus                                      |
|------------------------------|--|
| Amiens CHU (80)              | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Besançon CHRU (25)           | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Biomnis (69)                 | Focus Hantavirus IgG et IgM  |
| Bordeaux CHU (33)            | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Cerba (95)                   | Focus Hantavirus IgG et IgM<br>puis (01/10/12) Euroimmun Pool 1 Eurasia IgG et IgM |
| Charleville-Mézières CH (08) | Reagentia POC Puumala IgM<br>et Focus Hantavirus IgG et IgM                        |
| Compiègne-Noyon CH (60)      | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Dijon CHU (21)               | Reagentia POC Puumala et Dobrava-Hantaan IgM<br>depuis mi 2014                     |
| Dole CH (39)                 | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Laon CH (02)                 | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Lille CHRU (59)              | Euroimmun Pool 1 Eurasia IgG et IgM  |
| Nancy CHRU (54)              | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Reims CHU (51)               | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Saint-Quentin CH (02)        | Reagentia POC Puumala IgM  |
| Strasbourg CHRU (67)         | Reagentia POC Puumala IgM  |

Tableau 2 : Résultats obtenus pour la détection des IgG anti-hantavirus (technique ELISA).

| Autres Laboratoires | CNR      |         |         |       |
|---------------------|----------|---------|---------|-------|
|                     | Négatif  | Limite  | Positif | Total |
| Négatif             | 39 (1)   | 5 (0,5) | 8 (0)   | 52    |
| Limite              | 10 (0,5) | 3 (1)   | 4 (0,5) | 17    |
| Positif             | 9 (0)    | 9 (0,5) | 81 (1)  | 99    |
| Total               | 58       | 17      | 93      | 168   |

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

Tableau 3 : Résultats obtenus pour la détection des IgM anti-hantavirus (technique ELISA).

| Autres Laboratoires | CNR      |         |          |       |
|---------------------|----------|---------|----------|-------|
|                     | Négatif  | Limite  | Positif  | Total |
| Négatif             | 14 (1)   | 8 (0,5) | 13 (0)   | 35    |
| Limite              | 11 (0,5) | 5 (1)   | 14 (0,5) | 30    |
| Positif             | 6 (0)    | 7 (0,5) | 90 (1)   | 103   |
| Total               | 31       | 20      | 117      | 168   |

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

Tableau 4 : Résultats obtenus pour la détection des IgM anti-hantavirus (Test rapide versus ELISA).

| Autres Laboratoires | CNR     |          |         | Total |
|---------------------|---------|----------|---------|-------|
|                     | Négatif | Limite   | Positif |       |
| Négatif             | 22 (1)  | 15 (0,5) | 8 (0)   | 45    |
| Limite              | 3 (0,5) | 0 (1)    | 4 (0,5) | 7     |
| Positif             | 6 (0)   | 2 (0,5)  | 78 (1)  | 86    |
| Total               | 31      | 17       | 90      | 138   |

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

### 2.2.2 Phylogénie de souches de virus Puumala

Dans le cadre de l'épidémiologie moléculaire, le laboratoire coordonnateur avait obtenu la séquence complète de la partie du segment S codant pour la nucléoprotéine pour 7 souches détectées en 2012 et 7 en 2014. Les séquences de 15 autres souches ont été obtenues en 2015. Ces séquences ont été alignées avec un jeu de 79 séquences complètes de N représentatives des topotypes existants, incluant des séquences rapportées récemment et issues de virus détectés en France chez le campagnol roussâtre, puis une analyse phylogénétique (méthode de vraisemblance GTR+G+I) a été effectuée sur l'ensemble du jeu de séquences.

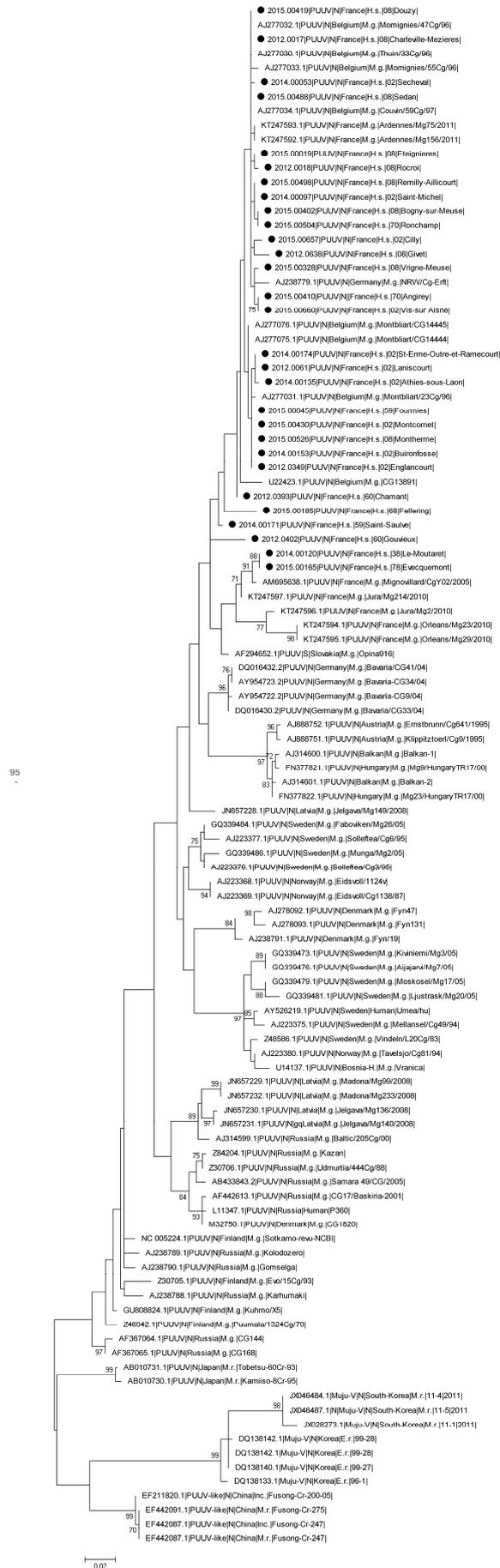
Les séquences des 29 souches détectées sont toutes très proches des souches détectées en Allemagne et en Belgique et s'inscrivent dans le cluster de souches de l'Europe de l'Ouest (*Figure 1*), les souches détectées chez l'homme et le rongeur dans le Jura et celles détectées chez le rongeur dans la région d'Orléans formant cependant un cluster indépendant.

L'utilisation du séquençage de nouvelle génération (NGS) n'a pas pu être effective cette année faute de ressources humaines. Le développement de cette technologie reste d'actualité.

### 2.2.3 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.

Il n'y a pas eu d'échantillons, ni de souches distribués.

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la partie codante du segment S des souches détectées chez l'homme en France (indiquées par le signe ●) et des souches de virus Puumala représentatives des différents topotypes (les valeurs de bootstrap  $\geq 70\%$  sont indiquées).



### 3 Activités de surveillance

#### 3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

##### France Métropolitaine (laboratoire coordonnateur)

- Réseau de partenaires :

Le laboratoire coordonnateur reçoit des prélèvements pour un diagnostic de première intention et également pour un diagnostic de deuxième intention. Ces derniers sont expédiés par les laboratoires partenaires effectuant un diagnostic de première intention (cf. 2.2.).

- Prélèvements réceptionnés

Le laboratoire coordonnateur a reçu en 2015, pour un diagnostic de laboratoire d'infection par un hantavirus, 386 prélèvements (370 sérums, 13 plasmas, 2 urines, 1 LBA) provenant de 319 patients (63 ayant eu au moins un 2<sup>ème</sup> prélèvement). Près des trois-quarts de ces prélèvements (72,3%) ont été adressés par des laboratoires pour un diagnostic de 2<sup>ème</sup> intention.

Tous les prélèvements reçus pour un diagnostic de 2<sup>ème</sup> intention ont une origine hospitalière (*Tableau 5*). Il en est de même pour la plupart de ceux reçus pour un diagnostic de 1<sup>ère</sup> intention. Le non remboursement des frais de diagnostic sérologique explique vraisemblablement le faible niveau de demande de cet examen auprès des médecins libéraux.

Une fiche de renseignements (pas toujours parfaitement remplie) a été reçue pour 97% des prélèvements (309/313). Ce très bon pourcentage a été obtenu grâce à de nombreuses relances auprès des prescripteurs (58% des fiches sont reçues en même temps que les prélèvements, en nette amélioration par rapport à 2014 – 38% –).

*Tableau 5 : Origine des prélèvements reçus par le laboratoire coordonnateur.*

| Diagnostic   | Origine                     |                                   | Effectif |
|--|-----------------------------|-----------------------------------|----------|
|  | Région                      | Département                       |          |
| de confirmation<br>= 2 <sup>ème</sup> intention<br>(n = 279) | Alsace                      | CHRU Strasbourg (67)              | 13       |
|  | Aquitaine                   | CHU Bordeaux                      | 5        |
|  | Bourgogne                   | CHU Dijon (21)                    | 16       |
|  | Champagne-Ardenne           | CHU de Reims (51)                 | 15       |
|  |                             | CH de Charleville-Mézières (08)   | 58       |
|  | Franche-Comté               | CHRU de Besançon (25)             | 33       |
|  | Ile de France               | Laboratoire Cerba (95)            | 92       |
|  | Lorraine                    | CHRU Nancy (54)                   | 11       |
|  | Nord Pas de Calais          | CHRU de Lille (59)                | 8        |
|  | Picardie                    | CH de Laon (02)                   | 4        |
| CH de Saint Quentin (02)                                     |                             | 3                                 |          |
| CHU Amiens (80)  |                             | 1                                 |          |
| Rhône-Alpes  | Laboratoire Biomnis (69)    | 20                                |          |
| de 1 <sup>ère</sup> intention<br>(n = 107)                   | Alsace                      | CH Haguenau (67)                  | 1        |
|  |                             | Clinique Ste Anne Strasbourg (67) | 1        |
|  |                             | Hôpitaux civils de Colmar (68)    | 4        |
|  | Auvergne                    | CHU Clermont-Ferrand (63)         | 15       |
|  | Basse Normandie             | CHU Caen (14)                     | 3        |
| Franche-Comté  | CH Belfort-Montbéliard (90) | 1                                 |          |

| Diagnostic                          | Origine                 |                                | Effectif |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------|
|                                     | Région                  | Département                    |          |
|                                     | Haute Normandie         | CH Le Havre (76)               | 1        |
|                                     | Ile de France           | Hôpital Bichat (75)            | 12       |
|                                     |                         | Hôpital Pitié Salpêtrière (75) | 1        |
|                                     |                         | Hôpital Robert Debré (75)      | 2        |
|                                     |                         | Hôpital Saint-Antoine (75)     | 3        |
|                                     |                         | Hôpital Saint-Louis (75)       | 1        |
|                                     |                         | Hôpital Tenon (75)             | 6        |
|                                     |                         | Institut Pasteur (75)          | 4        |
|                                     |                         | CH Melun (77)                  | 3        |
|                                     |                         | Hôpital Beaujon (92)           | 4        |
|                                     |                         | Hôpital Louis Mourier (92)     | 2        |
|                                     |                         | Hôpital Ambroise Paré (92)     | 1        |
|                                     |                         | Hôpital Raymond Poincaré (92)  | 6        |
|                                     |                         | Hôpital Avicenne (93)          | 1        |
|                                     |                         | CHU Créteil (94)               | 9        |
|                                     |                         | Hôpital Bicêtre (94)           | 2        |
|                                     | Languedoc<br>Roussillon | CHU de Nîmes (30)              | 2        |
|                                     | Limousin                | CHU de Limoges (87)            | 1        |
|                                     | Lorraine                | CHR de Metz-Thionville (57)    | 5        |
|                                     | Midi Pyrénées           | CHU de Toulouse (31)           | 1        |
|                                     | Nord Pas de Calais      | CH Béthune (62)                | 1        |
|                                     |                         | CH Lens (62)                   | 1        |
|                                     | Poitou-Charentes        | CH Niort (79)                  | 1        |
|                                     | Rhône Alpes             | CH Bourg en Bresse (01)        | 3        |
|                                     |                         | CH Montélimar (26)             | 1        |
|                                     |                         | CH Valence (26)                | 1        |
|                                     |                         | CHU Saint-Etienne              | 2        |
|                                     |                         | CHU Lyon (69)                  | 2        |
| H. Femme Mère Enfant Lyon (69)      |                         | 1                              |          |
| CH Chambéry (73)                    |                         | 1                              |          |
| Hôpitaux du pays du Mont-Blanc (74) | 1                       |                                |          |

- Résultats

Le laboratoire coordonnateur a effectué sur tous ces prélèvements, dans le cadre du diagnostic, une recherche d'IgM et d'IgG anti-hantavirus [ELISA IgM anti-virus Puumala (PUUV), Seoul (SEOV), Hantaan (HTNV) ou Sin Nombre (SNV) et IgG anti-PUUV, SEOV, HTNV, ou SNV + IF Ig anti-SEOV, DOBV, HTNV ou PUUV], le choix des antigènes testés dépendant du lieu d'exposition des patients. Le laboratoire coordonnateur a également recherché l'ARN de PUUV ou d'hantavirus en cas de demande expresse ou sur certains prélèvements ciblés dans le cadre de la surveillance. Au total, 2 661 examens ont été effectués sur les 357 prélèvements reçus (*Tableau 6*).

Tableau 6 : Examens effectués par le labo. coordonnateur dans le cadre de la surveillance.

| Examens           |                        | Effectifs <sup>1</sup> |
|-------------------|------------------------|------------------------|
| IF Ig             | PUUV                   | 378                    |
|                   | SEOV                   | 378                    |
| ELISA IgM         | PUUV                   | 378                    |
|                   | SEOV                   | 378                    |
|                   | SNV                    | 10                     |
| ELISA IgG         | PUUV                   | 378                    |
|                   | SEOV                   | 378                    |
|                   | SNV                    | 10                     |
| RT-PCR temps réel | PUUV                   | 128                    |
| RT-PCR Nichée     | Hantavirus Arvicolinae | 122                    |
|                   | Hantavirus             | 123                    |
| TOTAL             |                        | 2 661                  |

<sup>1</sup> Tous les examens n'ont pas été effectués sur tous les prélèvements (choix en fonction du contexte clinique et épidémiologique, de l'intervalle date de début de maladie et date de prélèvement, de la nature du prélèvement, et du volume disponible).

Sur la base des résultats de ces examens, les 313 cas (6 patients exclus parmi les 319 prélevés car déjà prélevés et comptabilisés en 2014) ont été classés dans les catégories suivantes :

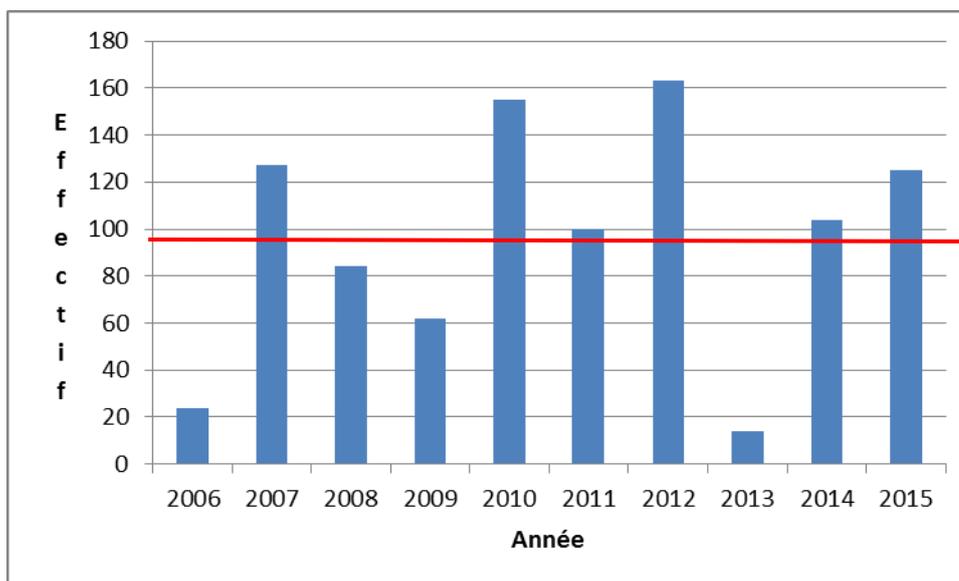
- 63 cas d'infection récente par le virus Puumala, confirmés virologiquement (détection de l'ARN de PUUV par RT-PCR temps réel ou par RT-PCR Nichée ciblant les virus associés aux rongeurs de la sous-famille des Arvicolinae puis identification par analyse de la séquence).
- 1 cas d'infection récente par le virus Seoul, confirmé virologiquement (détection de l'ARN de SEOV par RT-PCR Nichée ciblant le genre Hantavirus puis identification par analyse de la séquence)
- 1 cas d'infection récente par le virus Tula, confirmé virologiquement (détection de l'ARN du virus par RT-PCR Nichée ciblant le genre *Hantavirus* et par RT-PCR Nichée spécifique des hantavirus associés aux rongeurs de la sous-famille des Arvicolinae puis identification par analyse de la séquence)
- 61 cas d'infection récente par un hantavirus, confirmés sérologiquement (présence d'IgM et d'IgG anti-hantavirus).
- 1 cas probable d'infection récente par un hantavirus (présence d'IgM anti-hantavirus uniquement, détectés par ELISA et IF).
- 16 cas possibles d'infection récente par un hantavirus (présence d'IgM anti-hantavirus détectées par ELISA seulement)
- 12 cas probables d'infection ancienne par un hantavirus (présence d'IgG anti-hantavirus uniquement, détectés par ELISA et IF).
- 85 cas avec absence d'infection ancienne ou récente par un hantavirus (absence d'IgM ou d'IgG anti-hantavirus sur au moins un prélèvement effectué au moins 10 jours après le début de la maladie)
- 73 cas avec un statut indéterminé (n'entrant pas dans les catégories précédentes)

Au final, 126 cas ont été considérés comme des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus [CCIRH] (65 virologiquement et 61 sérologiquement). L'analyse des tendances portera sur 126 cas. Des fiches de renseignements ont été disponibles pour ces cas sauf un.

La médiane d'âge des 126 CCIRH est de 39 ans (de 15 à 85 ans) et le sex-ratio (M/F) de 2,8 (93 hommes et 33 femmes), valeurs conformes à celles observées ces 10 dernières années.

Le nombre de CCIRH détecté en 2015 se trouve bien au-dessus de la moyenne de cas détectés (96 cas) au cours des 10 dernières années (*Figure 2*). Sur cette période, nous observons des années dites « épidémiques » tous les deux à quatre ans. Ces variations d'incidence sont bien connues et ne sont pas dues à un biais de recrutement. Elles sont à mettre en rapport avec la dynamique des populations de rongeurs et la dynamique de circulation du virus dans ces populations qui ne font pas l'objet d'une surveillance.

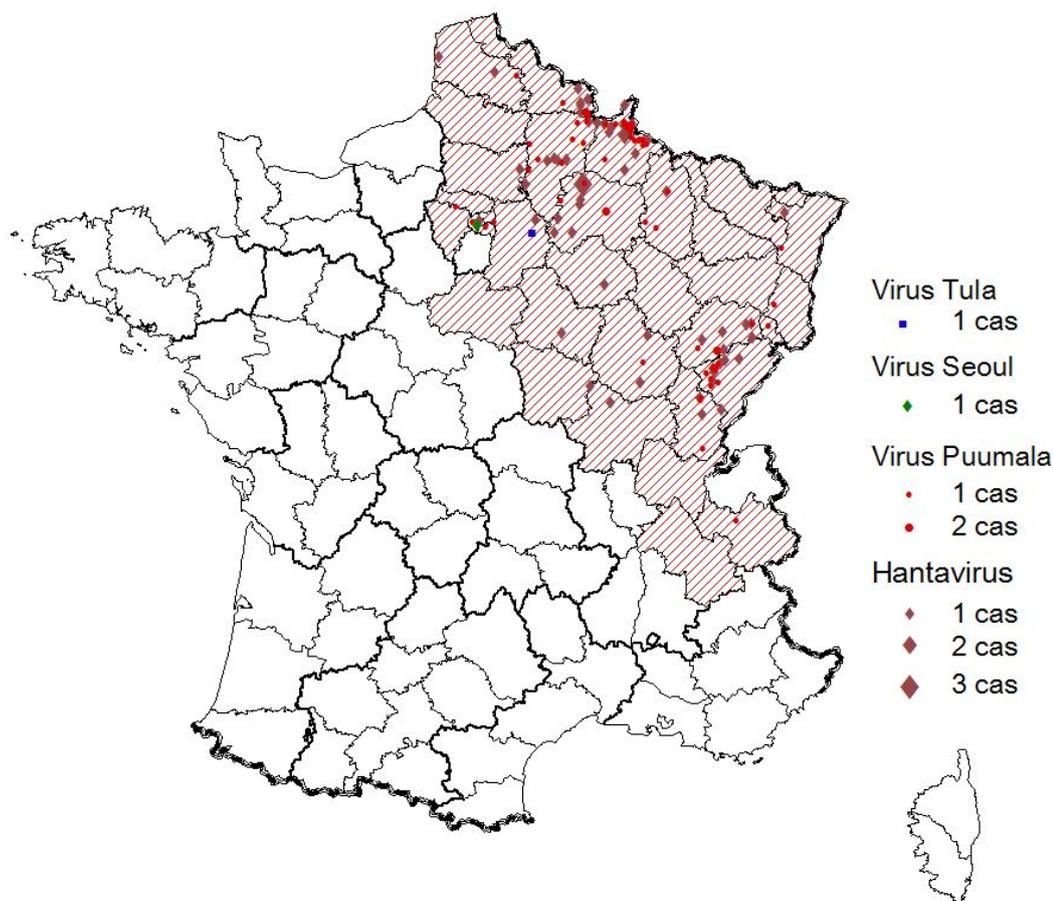
*Figure 2 : Distribution annuelle des cas confirmés d'infection par un hantavirus en France métropolitaine, 2006-2015 sur la base de la date du prélèvement du patient (le trait rouge figure la moyenne sur la période).*



Le pic de détection habituellement retrouvé à la fin du printemps est observé à nouveau cette année (*Figure 3*).

La distribution géographique selon les départements de 125 des 126 CCIRH résidant en France métropolitaine est présentée sur la *Figure 4* (un cas ayant une exposition avérée au Luxembourg n'est pas figuré). Les données se fondent d'abord 1/ sur le lieu (commune) probable d'exposition (n=94), puis s'il n'est pas indiqué 2/ sur le lieu (commune) de résidence du patient (n=32), et enfin s'ils ne sont pas indiqués 3/ sur le département d'origine du laboratoire ayant effectué le prélèvement (n=0). Tous les cas, y compris les 2 cas d'infection respectivement par le virus Tula et le virus Seoul, sont situés dans le quart Nord-Est de la France classiquement touché par les infections humaines par le virus Puumala. Parmi les foyers traditionnels d'endémie (Ardennes, Aisne, Nord, Franche-Comté et Oise), les 4 premiers ont été les plus touchés (*Figure 4, Tableau 7*).

Figure 4 : Distribution spatiale en France métropolitaine de 125 des 126 cas confirmés d'infection récente par un hantavirus (vraisemblablement le virus Puumala), détectés en 2015 (en hachuré, les départements où des cas ont été détectés sur la période 2003-2014).



### Région Antilles-Guyane (laboratoire associé)

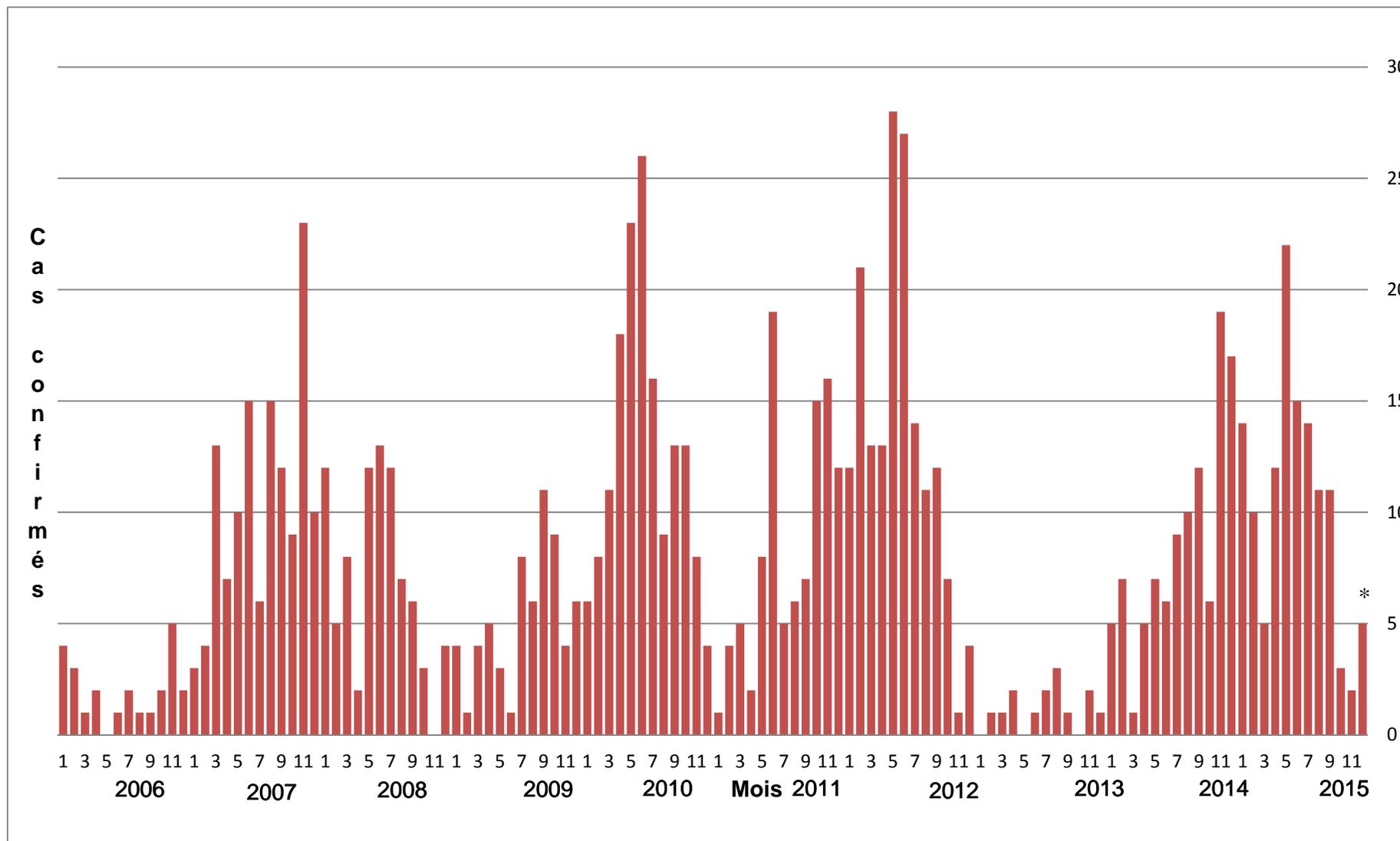
#### - Réseau de partenaires

Depuis l'identification du premier cas humain d'infection autochtone par un hantavirus du Nouveau Monde en 2008, le virus Maripa, des médecins hospitaliers sont sensibilisés aux aspects cliniques et épidémiologiques liés à l'infection par ce virus émergent en Guyane. Ils sont aussi informés des capacités techniques disponibles au laboratoire pour répondre à toute demande de diagnostic (sérologique et/ou moléculaire). Il en est de même pour nos partenaires hospitaliers de Martinique et de Guadeloupe.

#### - Activités

En 2015, le laboratoire associé a reçu 20 échantillons biologiques provenant de 15 patients présentant un tableau évocateur d'infection par un hantavirus du Nouveau Monde. Tous ces prélèvements ont été reçus pour un diagnostic de première intention, les laboratoires privés ou hospitaliers ne disposant pas d'outils d'investigations moléculaires et/ou sérologiques (Tableau 8). Comme déjà observé depuis 2012, aucun cas d'infection aiguë par un hantavirus du Nouveau Monde n'a été rapporté par le laboratoire. Toutefois, la recherche systématique d'anticorps IgG hantavirus a permis de mettre en évidence 2 cas positifs en lien avec une infection ancienne. Ces cas correspondent à des patients résidant en Guyane.

Figure 3 : Distribution mensuelle des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus (vraisemblablement le virus Puumala) en France métropolitaine Janvier 2006 – Décembre 2015 (sur la base de la date de prélèvement du patient).



\* Des prélèvements de patients effectués en décembre 2015 seront vraisemblablement analysés en janvier 2016

**Tableau 7 : Distribution spatio-temporelle des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus en France métropolitaine Janvier– Décembre 2015** (sur la base du département d'exposition ou de résidence si lieu d'exposition non précisé et sur la base de la date de prélèvement du patient ; un cas exposé dans le Pas de Calais détecté en janvier 2015 n'est pas figuré car prélevé fin 2014 ainsi qu'un autre exposé au Luxembourg).

| Région             | Département | Population        | Année      |             |           |             |            |             |           |           |          |           |           |           |           |           |           |          |          |          |            |
|--------------------|-------------|-------------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|------------|
|                    |             |                   | 2012       |             | 2013      |             | 2014       |             | 2015      |           |          |           |           |           |           |           |           |          |          |          |            |
|                    |             |                   | Total      | Incid.†     | Total     | Incid.†     | Total      | Incid.†     | 1         | 2         | 3        | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10       | 11       | 12       | Total      |
| Nord Pas de Calais | 59          | 2 587 128         | 7          | 0,27        | 1         | 0,04        | 18         | 0,70        | 2         | 0         | 0        | 1         | 1         | 2         | 0         | 0         | 1         | 0        | 0        | 2        | 9          |
|                    | 62          | 1 463 628         | 1          | 0,07        | 1         | 0,07        | 5          | 0,34        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         | 1         | 0        | 0        |          | 2          |
| Picardie           | 02          | 540 888           | 16         | 2,96        | 6         | 1,11        | 33         | 6,10        | 2         | 1         | 0        | 0         | 2         | 1         | 2         | 1         | 2         | 1        | 1        | 1        | 14         |
|                    | 60          | 810 300           | 11         | 1,36        | 0         | 0           | 6          | 0,74        | 0         | 0         | n,1      | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| Champagne Ardenne  | 08          | 282 778           | 11         | 3,89        | 1         | 0,35        | 18         | 6,37        | 5         | 1         | 0        | 1         | 11        | 4         | 4         | 3         | 2         | 2        | 0        |          | 33         |
|                    | 10          | 305 606           | 6          | 1,96        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 51          | 568 750           | 11         | 1,93        | 0         | 0           | 5          | 0,88        | 3         | 1         | 0        | 0         | 1         | 2         | 1         | 2         | 0         | 0        | 0        | 1        | 11         |
|                    | 52          | 182 136           | 4          | 2,2         | 1         | 0,55        | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
| Ile de France      | 75          | 2 240 621         | 1          | 0,04        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 1        | 0         | 0         | 0         | 0         | 1*        | 0         | 0        | 0        |          | 2          |
|                    | 77          | 1 353 946         | 5          | 0,37        | 0         | 0           | 3          | 0,22        | 0         | 0         | 0        | 1         | 0         | 1‡        | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 2          |
|                    | 78          | 1 412 356         | 2          | 0,14        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 1        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
|                    | 92          | 1 586 434         | 0          | 0           | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
|                    | 93          | 1 538 726         | 1          | 0,06        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
|                    | 94          | 1 341 831         | 0          | 0           | 0         | 0           | 2          | 0,15        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| Centre             | 45          | 662 297           | 0          | 0           | 0         | 0           | 1          | 0,15        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
| Lorraine           | 54          | 733 266           | 6          | 0,82        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 55          | 192 800           | 14         | 7,26        | 0         | 0           | 2(1*)      | 1,04        | 0         | 0         | 1        | 0         | 0         | 0         | 2         | 1         | 0         | 0        | 0        |          | 4          |
|                    | 57          | 1 046 468         | 3          | 0,29        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 88          | 377 282           | 6          | 1,59        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
| Alsace             | 67          | 1 104 667         | 3          | 0,27        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 2         | 0        | 0        |          | 2          |
|                    | 68          | 755 202           | 1          | 0,13        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| Bourgogne          | 21          | 525 931           | 8          | 1,52        | 0         | 0           | 2(1*)      | 0,38        | 0         | 0         | 0        | 2         | 2         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 4          |
|                    | 58          | 216 786           | 2          | 0,92        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 71          | 555 039           | 2          | 0,36        | 1         | 0,18        | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0        | 1        |          | 2          |
|                    | 89          | 341 902           | 1          | 0,29        | 0         | 0           | 1          | 0,29        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| Franche Comté      | 25          | 531 062           | 6          | 1,13        | 1         | 0,19        | 2          | 0,38        | 1         | 5         | 0        | 2         | 0         | 2         | 1         | 0         | 1         | 0        | 0        | 1        | 13         |
|                    | 39          | 260 932           | 27         | 10,35       | 0         | 0           | 4          | 1,53        | 1         | 0         | 0        | 0         | 2         | 1         | 1         | 1         | 1         | 0        | 0        |          | 7          |
|                    | 70          | 239 750           | 4          | 1,67        | 2         | 0,83        | 0          | 0           | 0         | 2         | 1        | 1         | 3         | 0         | 2         | 1         | 0         | 0        | 0        |          | 10         |
|                    | 90          | 143 940           | 4          | 2,78        | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| Rhône-Alpes        | 01          | 612 191           | 1*         | 0,16        | 0         | 0           | 1*         | 0,16        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 38          | 1 224 993         | 0          | 0           | 0         | 0           | 1          | 0,08        | 0         | 0         | 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 0          |
|                    | 73          | 421 105           | 0          | 0           | 0         | 0           | 0          | 0           | 0         | 0         | 1        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0        |          | 1          |
| <b>Total</b>       |             | <b>26 148 804</b> | <b>164</b> | <b>0,63</b> | <b>14</b> | <b>0,05</b> | <b>104</b> | <b>0,40</b> | <b>14</b> | <b>10</b> | <b>5</b> | <b>12</b> | <b>22</b> | <b>15</b> | <b>14</b> | <b>11</b> | <b>11</b> | <b>3</b> | <b>2</b> | <b>5</b> | <b>124</b> |

† Incid. = Incidence pour 100 000 habitants ; \* Cas d'infection récente par le virus Seoul ; ‡ Cas d'infection par le virus Tula

*Tableau 8 : Récapitulatif des demandes de diagnostic d'infection par un hantavirus de 2009 à 2014 (laboratoire associé).*

| Année                        | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Echantillons reçus           | 25   | 21   | 15   | 35   | 14   | 15   |
| IgM SNV et/ou RT-PCR positif | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    |
| IgG SNV                      | -    | -    | -    | -    | 0    | 2    |

Ces 15 demandes de diagnostic proviennent uniquement de structures hospitalières : 80% (12/15) du Centre Hospitalier de Cayenne et plus spécifiquement du service de réanimation, et 20% (3/15) du Centre Hospitalier de Fort de France (Martinique (*Tableau 9*)).

*Tableau 9 : Origine des prélèvements adressés au laboratoire associé en 2015*

| Secteur             | Guyane | Martinique | Guadeloupe | Total |
|---------------------|--------|------------|------------|-------|
| Secteur hospitalier | 12     | 3          | -          | 15    |
| Secteur privé       | -      | -          | -          | -     |
| Total               | 12     | 3          | -          | 15    |

### 3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Non applicable.

### 3.3 Participation aux réseaux de surveillance

#### Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Le laboratoire coordonnateur édite chaque début du mois M un rapport de son activité de surveillance sur la période écoulée entre le 1<sup>er</sup> janvier de l'année et le mois M-1.

Ce rapport est diffusé par email au début du mois M :

- à l'unité des Maladies entériques, alimentaires, zoonotiques et à transmission vectorielle du département des maladies infectieuses de l'InVS
- au laboratoire associé (Institut Pasteur de Guyane)
- aux partenaires du réseau de laboratoires métropolitains effectuant un diagnostic de première intention (cf. 2.2.1).

Le laboratoire coordonnateur a également des échanges réguliers par email ou par téléphone avec l'unité des Infections entériques, alimentaires, zoonotiques et à transmission vectorielle du département des maladies infectieuses de l'Institut de Veille Sanitaire, qui peuvent devenir fréquents lors d'alertes (cf. § 4).

#### Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Le CNR des Hantavirus est membre du réseau européen pour le diagnostic des maladies virales d'importation (European Network for diagnostics of Imported viral Diseases, Berlin, Allemagne : <http://www.enivd.org/>). Ce réseau regroupe des laboratoires spécialisés de plus de 30 pays européens. Les objectifs de ce réseau sont de surveiller l'introduction et la circulation de virus en Europe, de définir des conduites à tenir en cas d'importation de ces virus, d'échanger réactifs et matériel biologique et de standardiser les techniques de diagnostic. Le responsable du CNR n'a pas pu participer pour raison personnelle à la

XXIV<sup>ème</sup> réunion des membres du réseau qui s'est tenue à Thessalonique (Grèce) du 19 au 21 octobre 2015.

Le CNR des Hantavirus est en contact régulier avec le programme Emerging and Vector-borne Diseases de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) à Stockholm en Suède (<http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>) via le coordonnateur du Programme Hervé Zeller, ancien responsable du CNR. Les données de surveillance sont transmises annuellement à l'ECDC via l'InVS.

Le laboratoire coordonnateur et le laboratoire associé ont pour partenaire la « Viral Special Pathogens Branch, Centers for Disease Control and Prevention », Atlanta USA (en particulier pour la fourniture de réactifs concernant les hantavirus du Nouveau Monde), via le Dr. Pierre Rollin.

Le CNR des Hantavirus est membre du Réseau International des Instituts Pasteur et collabore avec certains Instituts dans le cadre du diagnostic et de l'épidémiologie des infections par hantavirus (en particulier l'Institut Pasteur de Madagascar et bien sûr l'Institut Pasteur de Guyane, laboratoire associé du CNR).

### 3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNR a continué à s'intéresser à l'origine géographique et au volume des patients résidant en métropole pour lesquels un diagnostic de 1<sup>ère</sup> intention a été effectué au sein du réseau de laboratoires partenaires du CNR (CNR compris). Il s'agit de savoir si des cas suspects sont prélevés tout au long de l'année et sur l'ensemble du territoire métropolitain et en quelle proportion. Les données nouvellement obtenues en 2015 portent sur l'année 2014 (il est difficile d'obtenir des partenaires du réseau de surveillance ces données pour l'année qui vient de s'écouler : les données pour l'année 2015 ne sont pas toutes encore reçues et n'ont pu être analysées).

La demande de diagnostic ainsi que le nombre de cas confirmés pour l'année 2014 semble se situer dans la normale. Les demandes restent les plus abondantes au cours du printemps et de l'été (*Tableau 9, Figure 5*). Le pourcentage de patients prélevés en zone d'endémie reste très élevé (*Tableau 9 ; Figure 6*).

*Tableau 9 : Caractéristiques des patients prélevés en France métropolitaine pour un diagnostic d'hantavirose 2011-2014.*

| Année | Nombre de patients prélevés | Patients prélevés en zone d'endémie | Cas confirmés         |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 2011  | 1 569                       | 89%<br>(1 399 / 1 569)              | 6,4%<br>(100 / 1 569) |
| 2012  | 1 871                       | 84%<br>(1 184 / 1 410)*             | 8,7%<br>(163 / 1 872) |
| 2013  | 1 135                       | 82%<br>(926 / 1133)                 | 1,2%<br>(14 / 1 135)  |
| 2014  | 1629                        | 82%<br>(1337 / 1629)                | 6,4%<br>(104 / 1629)  |

\* le département d'origine n'est pas connu pour 461 cas en 2012 et 2 cas en 2013

Figure 5 : Distribution mensuelle des patients prélevés pour un diagnostic d'infection par un hantavirus et des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus (sur la base de la date de prélèvement), France métropolitaine 2011 – 2014.

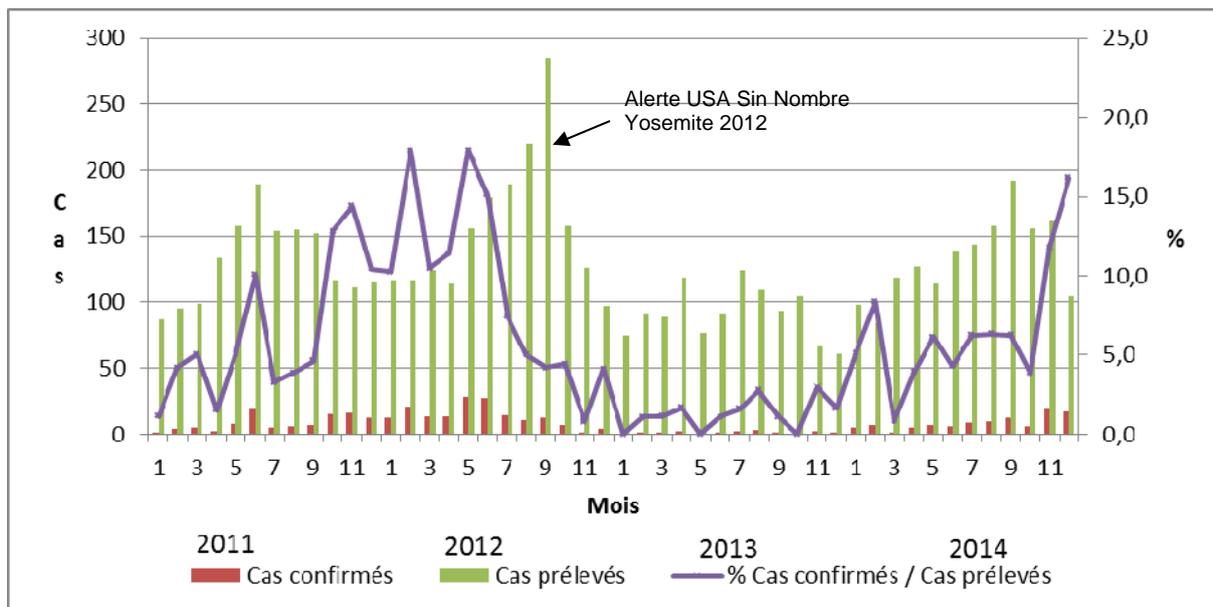
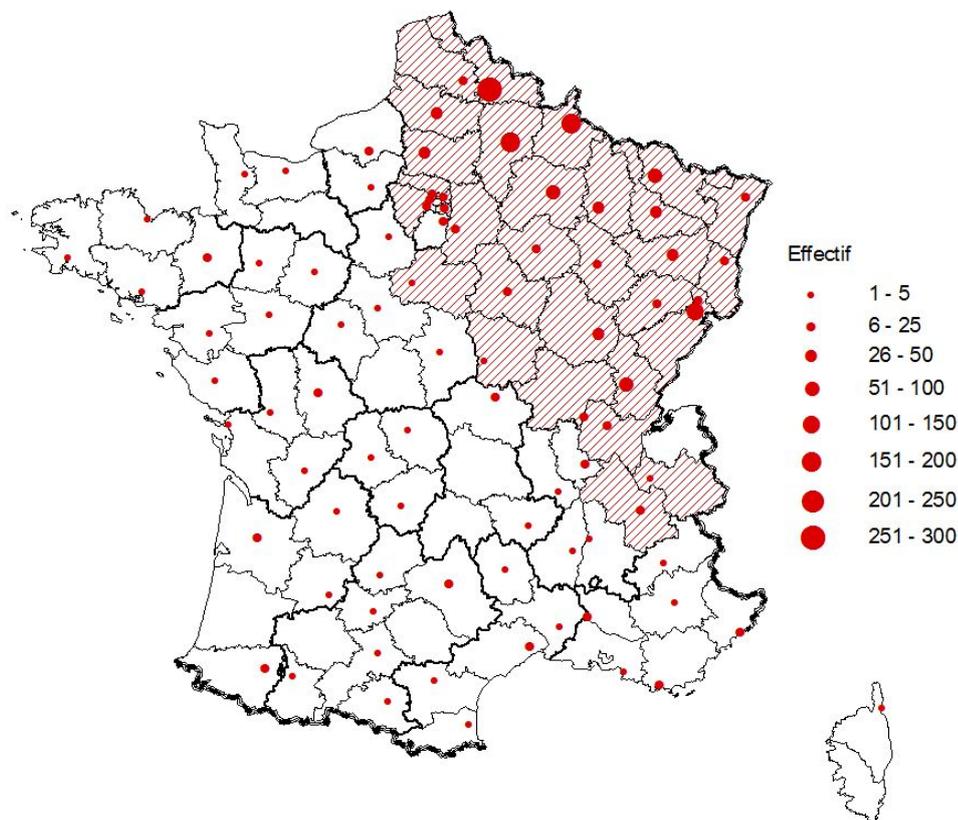


Figure 6 : Distribution spatiale des patients prélevés pour un diagnostic d'infection par un hantavirus en France métropolitaine en 2014 (rond rouge par département). La distribution se fonde sur le département du lieu de prélèvement ou sur celui du laboratoire transmetteur si le premier n'est pas connu ; en hachuré, les départements où des cas confirmés d'infection par un hantavirus ont été détectés de 2003 à 2014.



## **4 Alertes**

Au besoin, des alertes sont émises par email auprès de nos interlocuteurs de l'unité des Infections entériques, alimentaires, zoonotiques et à transmission vectorielle du département des maladies infectieuses de l'Institut de Veille Sanitaire. Les réponses apportées par nos interlocuteurs à l'InVS à nos alertes ont toujours été très rapides et constructives.

### **4.1 Cas d'infection récente par le virus Puumala groupés géographiquement**

Deux cas hospitalisés d'infection par un hantavirus, confirmés sérologiquement par les laboratoires Cerba et Biomnis, survenus dans la commune de Petersbach (67) en septembre 2015 ont fait l'objet d'un signalement et d'une investigation par la Cellule de l'InVS en région Lorraine-Alsace. Le résultat du diagnostic sérologique a été confirmé par le CNR et était en faveur d'une infection par le virus Puumala. Le résultat de la détection moléculaire de ce virus dans les prélèvements transmis a été positif pour un cas et limite pour le 2<sup>ème</sup>, confirmant les résultats sérologiques.

### **4.2 Cas d'infection récente par le virus Seoul**

Les cas confirmés d'infections par le virus Seoul sont très rares en Europe. Nous avons rapporté depuis 2012 trois cas confirmés virologiquement (détection du virus chez la personne infectée), les seuls jusqu'à présent en Europe.

Nous avons confirmé virologiquement cette année un nouveau cas d'infection par le virus Seoul. Le patient, cafetier résidant dans Paris, a présenté en août 2015 un syndrome fébrile algique avec atteintes hépatique et rénale nécessitant des dialyses. La contamination a eu lieu vraisemblablement pendant son activité professionnelle, au cours du nettoyage de la cave de son établissement. Suite à l'investigation de l'agence Régionale de Santé, il a été convenu d'effectuer au moins la dératisation de l'immeuble concerné.

### **4.3 Cas d'infection récente par le virus Tula**

Nous avons confirmé virologiquement un cas d'infection par le virus Tula. Le patient résidant à 60 km à l'Est de Paris, a présenté en juin 2015 un syndrome fébrile algique avec thrombopénie et atteinte hépatique. La contamination a vraisemblablement eu lieu au cours de contacts répétés à mains nues avec des campagnols rapportés par le chat du propriétaire à son domicile.

Jusqu'à présent, un cas avait été confirmé seulement sérologiquement en Allemagne en 2003 et le virus avait été détecté chez un autre cas, non immunocompétent, en République tchèque en 2013. Ces cas présentaient un syndrome rénal et pulmonaire. La description de ce cas en France chez une personne immunocompétente confirme le pouvoir pathogène de ce virus européen.

Le prélèvement nous avait été transmis par le laboratoire Cerba pour confirmation des résultats positifs en sérologie. L'ajout des techniques moléculaires dans nos diagnostics permet de révéler la diversité des hantavirus responsables des infections humaines et de ne pas attribuer par défaut toutes les infections au virus Puumala. Cela a des conséquences dans les mesures à prendre pour lutter contre ces infections.

Il n'y a pas eu d'observation de phénomènes anormaux dans la région Antilles-Guyane.

## **5 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR**

### **5.1 Recherche d'hantavirus en France métropolitaine chez le hérisson commun (*Erinaceus europaeus*)**

#### **Contexte**

Jusqu'en 2006, un seul hantavirus était décrit comme associé à ces petits mammifères insectivores (le virus Thottapalayam associé à la musaraigne musquée *Suncus murinus*). Depuis 2006, plus d'une trentaine d'hantavirus ont été décrits chez les insectivores, comme des musaraignes (Famille des Soricidae, Ordre Soricomorpha), des taupes (Famille des Talpidae, Ordre Soricomorpha), et même des chauves-souris (Ordre Chiroptera). Dans le cadre de sa veille microbiologique, le laboratoire coordonnateur, a poursuivi sa collaboration avec le Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE) situé au sein de l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris) à Nantes portant sur la recherche d'un hantavirus dans la collection d'organes de hérissons communs d'Europe (*Erinaceus europaeus*), dont dispose le CVFSE dans le cadre de son programme sur l'état de santé des écosystèmes. Il s'agit d'animaux très communs en France, appartenant à l'ordre Erinaceomorpha, proche de l'ordre Soricomorpha.

#### **Résultats**

Un total de 160 organes (rein, poumon, foie et rate) prélevés sur 40 hérissons de juillet 2014 à mars 2015 en région nantaise essentiellement ont été testés pour la présence d'ARN d'hantavirus par une RT-PCR nichée pan-hantavirus ciblant une portion du gène L (Klempa B *et al.* Emerg Infect Dis 2006). Les résultats de cette recherche ont été négatifs.

Depuis 2012, nous avons testé les prélèvements effectués de mai 2010 à mars 2015 sur 191 hérissons originaires du département de la Loire Atlantique (n = 156) et des départements limitrophes (n = 35). Il s'agissait essentiellement d'animaux adultes (n = 121) et de mâles pour plus de la moitié. Les pourcentages de prélèvements étaient similaires pour les 4 saisons.

#### **Conclusion**

La circulation d'un hantavirus chez le hérisson en région nantaise est peu probable. D'autres régions pourraient être investiguées via d'autres centres de réhabilitation de la faune sauvage en France pour savoir si cet animal est un hôte naturel ou non d'un hantavirus.

### **5.2 Développements d'outils de diagnostic d'une infection par l'hantavirus Thailand**

Bien que certains hantavirus associés aux rongeurs présentent de réels dangers en termes de santé publique, l'épidémiologie de ces infections n'est bien étudiée qu'en Amérique, Europe et Asie. En Afrique, la détection d'hantavirus est récente (Witkowski PT *et al.* Virus Res 2014) et les connaissances actuelles se limitent à la description d'hantavirus chez les mammifères, aucun cas humain d'infection récente par un hantavirus n'ayant été virologiquement diagnostiqué. Nous avons rapporté récemment la détection à Madagascar d'un variant du virus Thailand (THAIV), dénommé virus Anjozorobe, chez le rat noir *Rattus rattus* (Reynes JM *et al.* Vector Borne Zoonotic Dis 2014). THAIV, décrit en Asie du Sud-Est, est soupçonné de provoquer des infections humaines mais aucun cas clinique n'a été virologiquement confirmé. En collaboration avec l'Institut Pasteur de Madagascar (accueil d'une stagiaire et support financier), nous avons développé des outils spécifiques permettant l'étude de ce virus et des infections qu'il provoque (ou pourrait provoquer chez l'homme).

### **Diagnostic moléculaire par RT-PCR temps réel**

Le design des amorces a été réalisé sur la partie codante du gène S. En effet, après alignement des cinq séquences complètes du virus Anjzorobe, de celles de THAIV et de ses autres variants Serang et Jurong disponibles sur GenBank, le segment S présentait des zones plus conservées que les segments M ou L, ce qui permettait un design d'amorces plus facile dans ce segment. Les amorces et la sonde ont été sélectionnées avec le logiciel Primer3Plus dans les 150 premiers nucléotides de la partie codante du gène S qui est la partie la plus conservée pour la plupart des séquences des hantavirus.

La souche de référence (749) de THAIV a été bien détectée avec un seuil de détection appliqué à un stock viral de THAIV identique à celui de la RT-PCR nichée pan-hantavirus utilisée par le CNR (Klempa B et al. Emerg Infect Dis 2006). Les souches de référence des virus Seoul, Dobrava, Hantaan et Puumala n'ont pas été détectées et aucun signal n'a été rapporté quand la technique a été appliquée à des prélèvements de foie de rats bruns (*Rattus norvegicus*) d'élevage certifié indemne d'hantavirus. Pour compléter l'étude de la spécificité de cette technique et étudier sa sensibilité, elle a été appliquée, en parallèle avec la RT-PCR Nichée pan-hantavirus, aux échantillons de foie de 50 rats noirs. La détection a été positive pour 24 échantillons par RT-PCR temps réel et pour 30 échantillons par RT-PCR Nichée pan-hantavirus. La discordance de résultats portait sur 6 échantillons. Les résultats obtenus par la technique conventionnelle étant pris comme référence, la sensibilité était de 80%. Etant donné la discordance de résultats qui a été confirmée par un deuxième essai, il reste à vérifier qu'il n'y a pas de mutations sur la séquence de ces 6 souches en des points critiques empêchant la bonne hybridation des amorces ou de la sonde.

### **Diagnostic sérologique par IF et ELISA**

Des antigènes permettant la détection des IgG et IgM anti-THAIV par ELISA ont été produits sur cellules Vero E6 à partir de la souche de référence THAIV. Des lames de cellules infectées par cette souche ont été également produites permettant la détection d'anticorps anti-THAIV par immunofluorescence. Le test ELISA IgG anti-THAIV a été testé avec succès en utilisant comme témoins positifs les sérums de 6 rats noirs malgaches trouvés infectés par technique moléculaire et en utilisant comme témoins négatifs les sérums de 6 rats bruns d'élevage indemnes d'infection par un hantavirus.

La souche de référence THAIV a été adaptée aux cellules de lapin RK13 par passage successif et un stock viral a été constitué afin de permettre une immunisation de lapin et disposer d'un stock de sérum hyper-immun qui sera utilisé pour la détection des IgM anti-THAIV ou pour la détection d'antigène de THAIV dans des cellules infectées. Cette immunisation sera effectuée en 2016 par un prestataire de service et le test ELISA IgM anti-THAIV pourra être mis au point.

Une tentative d'isolement du virus Anjzorobe à partir d'organes de rats noirs de Madagascar trouvés infectés par ce virus a été effectuée sur cellules Vero E6 mais sans succès. Cette manipulation sera répétée en 2016. Néanmoins, un stock de la protéine N recombinante du virus Anjzorobe a été produit par la plate-forme de protéines recombinantes de l'Institut Pasteur à Paris avec le système baculovirus sur cellules de lépidoptères (*Spodoptera frugiperda* 9). Le rendement de production ne permet pas l'utilisation de cette protéine pour une détection d'anticorps par ELISA. La protéine servira déjà à immuniser deux lapins en 2016 et constituer un stock de sérum hyper-immun (anticorps polyclonaux) dirigé contre ce variant de THAIV.

### 5.3 PHRC-N HANTADIAG

Nous avons obtenu un financement fin décembre 2014 via l'appel Programme Hospitalier de Recherche Clinique National (PHRC) 2014, pour un projet co-coordonné avec le Dr. Penalba du Centre Hospitalier de Charleville-Mézières (promoteur) et en partenariat avec les centres hospitaliers de Belfort-Montbéliard, du Sud de l'Oise, de Laon, de Saint-Claude, de Verdun ainsi que les centres hospitaliers universitaires de Besançon, de Dijon, de Nancy, et de Reims. Le CNR des Hantavirus reçoit l'appui de deux entités de l'Institut Pasteur à Paris pour le management de données, les analyses statistiques, les aspects éthique et réglementaires et le respect des bonnes pratiques de recherche clinique

Ce projet vise d'abord à évaluer les performances de 9 trousse commerciales de diagnostic sérologique des hantaviroses dans les conditions usuelles d'utilisation, à l'admission, chez des patients hospitalisés avec des signes évocateurs d'une infection par le virus Puumala avec comme retombée attendue de recommander pour la métropole, les trousse de diagnostic sérologique ayant eu les meilleures performances. Il consiste secondairement à étudier la cinétique virale dans le plasma et l'urine de ces patients et à évaluer ainsi l'intérêt d'un prélèvement d'urine pour le diagnostic moléculaire d'une hantavirose (seuls les patients ayant un résultat positif pour le test rapide Reagentia Reascan PUUV IgM) sont concernés par ce deuxième objectif.

Ce projet d'une durée de 42 mois devrait s'achever en juin 2018. Un total de 80 cas d'infection récente par le virus Puumala est attendu pour une durée maximale d'inclusion de 26 mois (la vitesse d'inclusion sera dépendante de l'incidence de la maladie pendant cette période) et au moins autant pour les témoins. Les différents examens seront effectués au cours de la dernière année du projet.

L'activité des 6 premiers mois 2015 a porté sur les aspects réglementaires (assurance du projet, avis Comité de Protection des Personnes, avis ANSM, inscriptions aux Clinical Trials, déclaration à la CNIL, établissement des conventions inter-hospitalières, etc.), l'organisation d'une réunion d'ouverture fin avril à l'Institut Pasteur à Paris avec les participants du projet. L'ouverture des premiers centres d'investigation a débuté en juillet (ceux du CH de Charleville-Mézières) et s'est poursuivie au cours du dernier trimestre de l'année. Tous étaient ouverts en 2015 sauf ceux du CHU de Besançon, en attente de signatures de la convention.

Les inclusions ont donc démarré, mais après le pic saisonnier. Fin 2015, 9 patients étaient inclus : 3 avec un résultat du test rapide positif et 6 avec un résultat négatif.

Via nos activités de surveillance, nous verrons rapidement au début du printemps si l'incidence mensuelle des cas augmente et en conséquence si de nombreux cas sont susceptibles d'être inclus dans le projet.

### 5.4 Publications et communications réalisées en lien avec les activités de recherche

#### Publications nationales

/

#### Publications internationales

Reynes JM, Dutrop CM, Carli D, Levast M, Fontaine N, Denoyel GA, Philit JB. [Puumala hantavirus infection in Isère: Geographic extension of this zoonosis in France]. *Med Mal Infect.* 2015 May;45(5):177-80.

Zeimes CB, Quoilin S, Henttonen H, Lyytikäinen O, Vapalahti O, Reynes JM, Reusken C, Swart AN, Vainio K, Hjertqvist M, Vanwambeke SO. Landscape and regional environmental

analysis of the spatial distribution of hantavirus human cases in Europe. Front Public Health. 2015 Mar 31;3:54.

Reynes JM, Carli D, Boukezia N, Debruyne M, Herti S. Tula hantavirus infection in a hospitalised patient, France, June 2015. Euro Surveill. 2015 Dec 17;20(50).

Communications orales nationales

/

Communications orales internationales

/

Communications affichées nationales

/

Communications affichées internationales

/

Conférence sur invitations:

Reynes JM: Epidémiologie et diagnostic biologique des hantavirus en France. 16<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie. 10-12 Juin 2015, Nancy.

NB : seules sont citées les publications et communications réalisées (les prévues ou en cours ne font pas l'objet de citation).