

EXTRAIT DU RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Hantavirus

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	Institut Pasteur, Unité Environnement et Risques Infectieux	Jean-Marc Reynes
Laboratoire Associé	Institut Pasteur de la Guyane, Laboratoire de Virologie	Anne Lavergne

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	8
Démarche Qualité	8
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	10
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	10
2.5 Activités d'expertises	12
2.6 Activités de séquençage	15
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	16
3. Activités de surveillance	18
3.1 Description du réseau de partenaires	18
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	21
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	28
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	28
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	29
4. Alertes	31
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	33
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	33
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	34
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	34
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	36
6.1 Activités de recherche en lien direct avec les missions et activités du CNR	36
6.2 Liste des publications et communications en lien direct avec les missions et activités du CNR	39
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	40

8. Programme d'activité pour les années suivantes	41
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	44
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	44
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	45
1.3 Locaux et équipements	46
1.4 Collections de matériel biologique	49
1.5 Démarche qualité du laboratoire	51
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	53
2.1 Liste des techniques de référence	53
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	55

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Le CNR des Hantavirus a été pour la période allant du 1^{er} avril 2017 au 31 décembre 2022 placé sous la responsabilité de l'Institut Pasteur (laboratoire coordonnateur) et de l'Institut Pasteur de Guyane (IPG) à Cayenne (laboratoire associé). Le CNR a pour mission de développer une expertise sur les hantavirus du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde, d'apporter conseils en la matière, 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 2022 sont les suivants:

- une année inter-épidémique en France métropolitaine avec seulement 24 cas humains d'infection récente par un hantavirus détectés (dont 40% dans l'Avesnois, foyer traditionnel d'endémie)
- dont un cas d'infection récente par le virus Seoul en Occitanie.
- quatre cas humains d'infection récente par l'hantavirus Maripa diagnostiqués par le laboratoire associé (Institut Pasteur de Guyane) dont un mortel. Depuis 2008, onze cas d'infection par le virus Maripa ont été détectés en Guyane dont six décès.
- les résultats d'une étude de séroprévalence chez les travailleurs forestiers de la moitié nord de la France métropolitaine, indiquant que l'exposition au virus Puumala dans le nord-ouest de la France est nulle ou très limitée.
- les premiers résultats du projet hospitalier de recherche clinique HANTADIAG, montrant que la cinétique du virus Puumala de lignée Europe Centrale dans le plasma humain de patients hospitalisés est du même ordre que celles observées pour les lignées scandinaves ou alpines-adriatiques et que l'urine n'est pas un échantillon approprié pour le diagnostic moléculaire de cette infection.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

The Hantavirus NRC has been endorsed for the April 2017 to December 2022 period by the Institut Pasteur (coordinator laboratory) and by the Institut Pasteur of French Guiana, based in Cayenne (associated laboratory). The NRC has four missions regarding hantaviruses from the Old and the New Worlds: expertise, advices, surveillance and alert.

The highlights of the year are the followings:

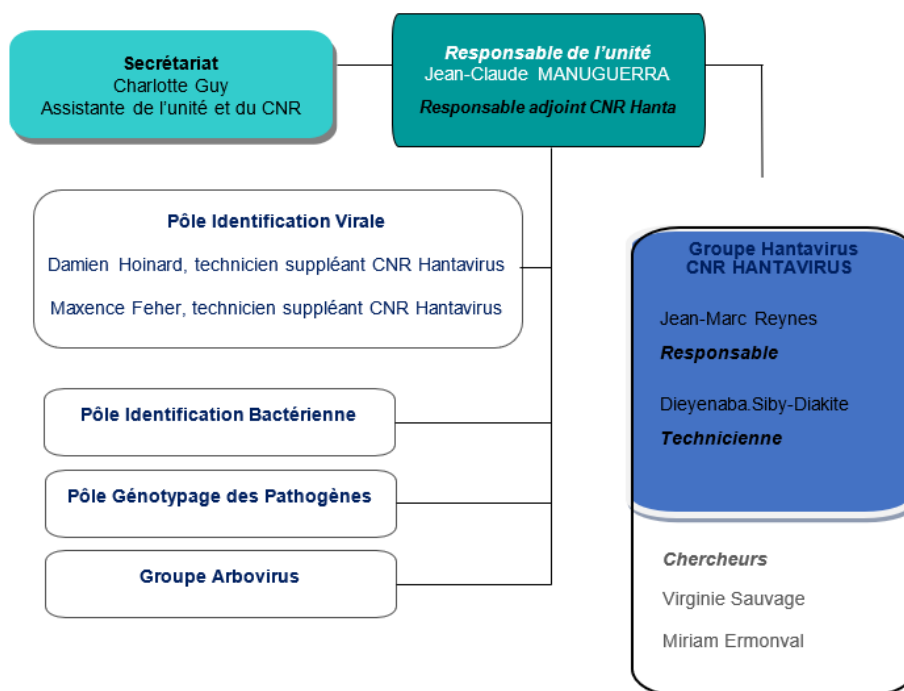
- an inter-epidemic year in metropolitan France, with only 24 acute hantavirus human cases detected (40% of them in the Avesnois, the traditional endemic area)
- including one human SEOV case in Occitanie region.
- four human cases of Maripa hantavirus infection diagnosed in French Guiana, one of which was fatal. Since 2008, eleven cases of Maripa hantavirus infection have been detected in French Guyana, including six deaths.
- the results of a seroprevalence study among forestry workers from Northern France, indicating that exposure to Puumala virus in northwestern France is null or very limited.
- the first results of the project HANTADIAG, showing that the kinetic of Puumala virus strains from Central-European lineage in human plasma is similar to those reported for strains from the Scandinavian or Alpes-Adrian lineages, and that urine is not an appropriate sample for molecular diagnostic of this infection.

1. Missions et organisation du CNR

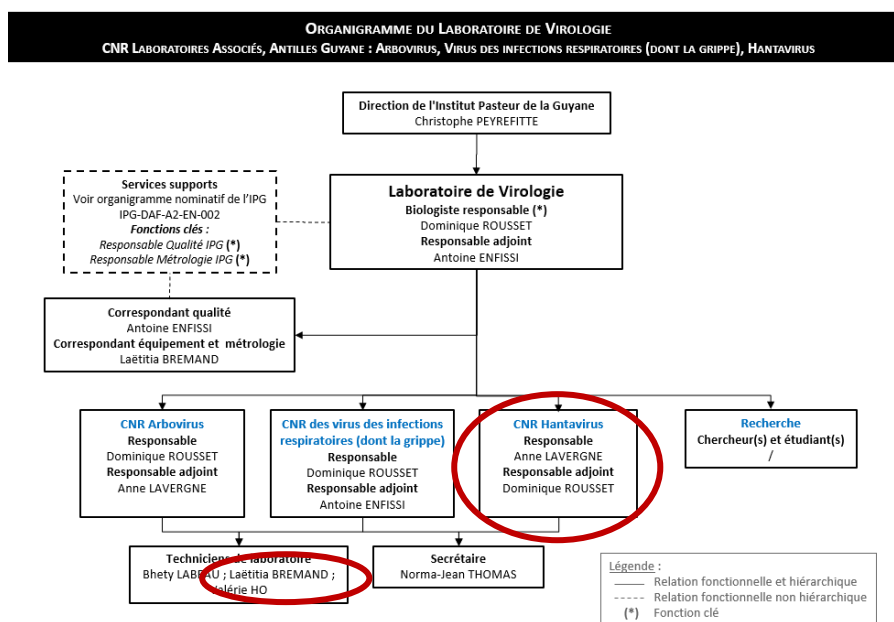
Organigramme

Aucun changement n'est à signaler au sein du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé (Figures 1 et 2)

- Figure 1 : Organigramme du laboratoire coordonnateur, Institut Pasteur Paris



- Figure 2 : Organigramme du laboratoire associé, Institut Pasteur de Guyane



Mission et Organisation

Les nouvelles missions définies dans l'appel à candidature de l'agence nationale de santé publique (Santé Publique France) le 19 juin 2016 ont été confiées, pour la période allant du 1^{er} avril 2017 au 31 décembre 2022, à l'unité de Biologie des Infections Virales Emergentes (UBIVE) de l'Institut Pasteur à Lyon par arrêté du 7 mars 2017, puis à l'Unité Environnement et Risques Infectieux de l'Institut Pasteur à Paris par arrêté du 12 décembre 2019 (laboratoire coordonnateur ou « LC ») et au laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (laboratoire associé ou CNR Hantavirus-LA).

Les missions du CNR et son organisation (personnel, locaux et équipements de laboratoire) sont restées identiques en 2022 à celles décrites antérieurement (voir Annexe 1).

Démarche Qualité

Le laboratoire coordonnateur dispose d'une accréditation COFRAC (N° 8-2588) selon la norme NF EN ISO 15189 2012 pour **trois techniques de détection moléculaire** dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie – Sous-famille Virologie spécialisée (VIROH) code BM VB01 et pour **trois techniques sérologiques** dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous-domaine Microbiologie – Sous-famille Microbiologie générale (MICROBIOBM) code BM MG01. Ces techniques accréditées couvrent, depuis juillet 2017, 100% des examens de diagnostic exécutés (voir Annexe 2).

A l'occasion de l'audit COFRAC en Juin 2022 (visite de surveillance), le laboratoire coordonnateur a obtenu le maintien de cette accréditation.

Le laboratoire de virologie de l'IPG, qui héberge le CNR Hantavirus-LA, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3373 depuis novembre 2014 pour la version 2007 et depuis novembre 2015 pour la version 2012 de cette norme (sous-famille concernée : microbiologie générale / portée A) (voir annexe 2).

A l'occasion de la visite de surveillance du COFRAC en novembre 2019, le laboratoire associé a obtenu le maintien de cette accréditation ainsi qu'une extension du périmètre d'accréditation de la sous-famille VIROH pour les techniques de détection moléculaire (portée B flexible). Le laboratoire associé a obtenu à l'occasion de cet audit COFRAC son accréditation NF EN ISO 15189 pour la **technique de détection moléculaire de l'hantavirus Maripa** dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie – Sous-famille Virologie spécialisée (VIROH). Le dossier de validation de méthode pour le diagnostic sérologique reste à finaliser.

Conformément à l'article L 5139-1 du code de Santé Publique et à l'arrêté du code de la Santé Publique, en date du 26 avril 2012, fixant la liste des micro-organismes et toxines (MOT), le laboratoire coordonnateur dispose, via le responsable de l'unité ERI (Mr Jean-Claude Manuguerra), d'autorisations de détention et de mise en œuvre des micro-organismes hantavirus Dobrava-Belgrade, Hantaan, Seoul, Sin Nombre, Andes, Choclo, et Laguna Negra, et de leur matériel génétique, délivrées par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Ces autorisations sont valables jusqu'au 29 janvier 2025.

Le CNR Hantavirus-LA détient du virus Sin Nombre inactivé servant de matrice antigénique pour la réalisation de tests sérologiques dans le cadre de ses activités de CNR. Ce virus a été ajouté à la liste des MOT dans l'arrêté du 26 avril 2012. La responsable du CNR Hantavirus-LA (Anne Lavergne) dispose des autorisations de détention, d'acquisition et de mise en œuvre de cet agent pathogène délivrée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Cette autorisation est valable jusqu'au 14 mai 2023. Le renouvellement de ce dossier est en cours de traitement auprès l'ANSM.

Le laboratoire associé ne dispose pas en revanche des autorisations de détention et de mise en œuvre du MOT Laguna Negra (variant Maripa virus). Le laboratoire associé ne peut

donc pas à l'heure actuelle réaliser d'essai inter-laboratoires pour la recherche du génome viral. Néanmoins, nous disposons d'un contrôle interne pour les amplifications géniques. Dans le cadre des infections aiguës à hantavirus, les résultats sont basés sur l'analyse conjointe des résultats de sérologie IgM / IgG et des résultats de PCR. Les résultats positifs pour la recherche de l'hantavirus Maripa ont toujours montré une sérologie IgM positive associée à une PCR également positive, ces résultats laissant supposer la validité des approches mises en place. A l'heure actuelle, dans le cas particulier de détection dans un prélèvement biologique de la présence d'un MOT pour lequel l'IPG ne dispose pas d'une autorisation de détention (ex : RT-PCR temps réel positive pour le virus Maripa), le prélèvement (et tous les aliquots correspondants) font l'objet d'une cession au laboratoire coordinateur à Paris ou à défaut d'une destruction et ce, dans un délai de 30 jours maximum.

Conformément au décret du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain, nous procédons annuellement à la déclaration de nos collections d'échantillons biologiques humains (CEBOH).

Dans le cadre de la mise en œuvre du nouveau Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) entré en application le 25 mai 2018, l'Institut Pasteur a institué un programme permanent de conformité au RGPD. Il a dans le cadre de celui-ci :

- désigné un délégué à la protection des données (DPO) depuis juillet 2018 ;
- établi un registre des opérations de traitement pour lesquelles il agit d'une part en qualité de responsable du traitement et d'autre part en qualité de sous-traitant ;
- souscrit auprès de la CNIL un engagement de conformité aux méthodologies de référence MR-01 – MR-02 et MR-03 ;
- pris des initiatives de sensibilisation de ses personnels à la protection des données.

Enfin, pour les projets relevant de la loi du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine, le laboratoire coordinateur bénéficie de l'appui de la Coordination Clinique du Centre de Recherche Translationnelle (CRT) de l'Institut Pasteur à Paris pour l'instruction des dossiers. Selon le cas, ce support s'étend aux demandes d'avis, autorisation, déclaration auprès d'un Comité de Protection des Personnes, de l'ANSM, du Comité Ethique et Scientifique pour les Recherches, les Etudes et les Evaluations dans le domaine de la Santé (CESREES), et de la Commission Nationale de l'informatique et des Libertés (CNIL). L'Institut Pasteur dispose par ailleurs, en cas de besoin, d'un « Institutional Review Board ».

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

Le laboratoire coordonnateur a reconduit les techniques de diagnostic accréditées: ELISA IgG et IgM Hantavirus, IF Ig Hantavirus et RT-PCR temps réel virus Puumala segment S, RT-PCR nichée "Arvicolinae" segment S et RT-PCR nichée "Hantavirus" segment L (voir Annexe 2) ainsi qu'une technique de titrage d'hantavirus en plaque sur cellules Vero E6 fonctionnelle pour certains de nos souches d'hantavirus (virus Puumala et virus Nova en particulier).

Nous avons réalisé les premiers essais d'une technique de détection moléculaire des virus Seoul/Hantaan par RT-PCR en temps réel permettant la détection du segment S (*Kramski M et al., Clinical Chemistry, 2007*) au cours du dernier trimestre 2022. Un dossier de validation de méthode est toujours en cours de rédaction pour une future demande d'accréditation (Accréditation pour la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie Famille Virologie (VIROH) VB1).

Le laboratoire associé a reconduit les techniques mises en place: (i) RT-PCR temps réel spécifique du variant Maripa utilisée en première intention pour la recherche de génome virale (*Matheus S et al., 2018*) (technique accréditée), (ii) RT-PCR nichée conventionnelle réalisée avec des amorces consensus du segment S des hantavirus du Nouveau Monde (*Johnson AM et al., Virology, 1997*) réservée en cas de détection d'IgM anti-hantavirus et de RT-PCR temps réel négative pouvant être le reflet d'une infection par un autre hantavirus que le variant Maripa, et (iii) technique de sérologie pour la recherche d'IgM et IgG des hantavirus du Nouveau Monde (voir Annexe 2). Il n'y a pas eu de développement ou de mise en oeuvre d'autres techniques en 2022.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Le projet hospitalier de recherche clinique national HANTADIAG visant à évaluer entre autres des trousse commerciales sérologiques est toujours en cours (cf. § 6.1).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Une demande de transfert de technique moléculaire a été exprimée auprès du laboratoire coordonnateur par l'unité de Virologie de l'Institut Pasteur de Guinée. Le laboratoire coordonnateur a cédé à ce dernier un ARN transcrit synthétique quantifié (segment L) du virus Puumala pour effectuer des tests moléculaires (RT-PCR nichée pan-hantavirus) à des fins de recherche.

2.4 Collections de matériel biologique

Souches, antigènes, immuns-sérums de référence

- **Laboratoire coordonnateur**

Il dispose des souches suivantes :

Virus Dobrava-Belgrade souche DOB EO 7/7

Virus Hantaan souches 76-118 et Sapporo VP5

Virus Nova Te34 (sous accord de transfert de matériel)

Virus Prospect Hill PH 569/7

Virus Puumala Montbliart-1-2008

Virus Seoul souches Girard Point, Urban rat, Tchoupitoulas, GB-B 552/5

Virus Seoul souche Mantenay-Montlin/Rn/FRA/2015/2015.00179/liver (isolement 2015 du CNR)

Virus Thailand souches 605 et 749

Virus Tula souche Moravia (sous accord de transfert de matériel)

Il dispose également:

- de protéines recombinantes (N) pour le virus Puumala et Sin Nombre (cette dernière fournie par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA) ;

- des antigènes produits à partir de cellules infectées pour les virus Hantaan, Nova, Puumala, Seoul, Thailand, Tula, Sin Nombre, et Laguna Negra. Ceux des deux derniers virus cités et ceux du virus Seoul destinés au test ELISA IgG ont été fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA.

Il dispose enfin :

- de polyclonaux non purifiés produits sur lapins et dirigés contre tout ou partie des protéines des virus Thailand, Nova, Tula, Puumala, Laguna Negra, et Seoul (les trois derniers fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA).

- d'ascites polyclonales de souris contre les virus Hantaan (production CNR), et Sin Nombre (production CDC).

- de divers ARN de synthèse utilisés comme témoins positifs dans les techniques de diagnostic moléculaire.

En 2022, toutes les souches Hantavirus MOT en attente de transfert du site de Lyon vers celui de Paris, ont été réceptionnées par le CNR.

- **Laboratoire associé**

Il dispose pour la réalisation de tests diagnostiques de première intention d'antigènes, de protéines recombinantes et d'ascites fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA :

- antigène inactivé Sin Nombre sous forme de lysats de cellules infectées;

- protéine recombinante (nucléocapside) du virus Sin Nombre (428 AA);

- ascite de souris anti-virus Sin-Nombre.

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR figurent en annexe 1.

En 2022, le laboratoire coordonnateur a cédé à l'Institut Pasteur de Guinée de l'ARN synthétique du virus Puumala (segment L) afin d'effectuer dans ce pays des recherches

d'hantavirus chez les rongeurs et chez l'homme par des techniques moléculaires.

Le laboratoire associé a cédé au laboratoire coordonnateur les échantillons primaires (sérum) contenant le virus Maripa (MOT) de deux cas parmi les quatre identifiés en 2022. Les autres échantillons ont été détruits n'ayant pu être transférés dans les délais impartis (30 jours).

2.5 Activités d'expertises

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 de 38 à 110 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 notables de résultats sont aussitôt mentionnées par email au laboratoire concerné. Les résultats obtenus par le laboratoire coordonnateur font l'objet d'une vérification par un deuxième essai lorsqu'une discordance est observée. Il reste important de procéder à cette confirmation des résultats des examens sérologiques effectués avec des tests commerciaux relativement peu utilisés (en particulier en France).

Fin 2022, ces laboratoires étaient au nombre de quatorze (le laboratoire de virologie du CHU d'Amiens a cessé cette activité de diagnostic fin janvier 2022). Onze utilisent un test de diagnostic rapide permettant de détecter des IgM dirigées contre le virus Puumala (et contre les virus Dobrava-Belgrade et Hantaan pour l'un d'entre eux). Deux utilisent un test ELISA, permettant de détecter les anticorps IgM et IgG dirigés contre les hantavirus zoonotiques de l'Ancien Monde et un dernier laboratoire utilise un test IF permettant de détecter les anticorps IgM et IgG dirigés contre les hantavirus zoonotiques de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde. Ces laboratoires se trouvent pour la plupart dans la zone d'endémie des cas humains d'infection par le virus Puumala (Tableau 1).

Tableau 1 : Laboratoires effectuant en première intention un diagnostic sérologique des hantavirus en France métropolitaine et participant à la surveillance, fin 2022.

Laboratoires	Trousses de diagnostic sérologique Hantavirus
Besançon CHRU (25)	Reagentia POC Puumala IgM
Cerba (95)	Euroimmun Pool 1 Eurasia ELISA IgG et IgM
Charleville-Mézières CH (08)	Reagentia Reascan+ Puumala IgM
Compiègne-Noyon CH (60)	Reagentia POC Puumala IgM
Dijon CHU (21)	Reagentia POC Puumala et Reascan Dobrava-Hantaan IgM
Dole CH (39)	Reagentia POC Puumala IgM
Eurofins Biomnis (69)	Euroimmun Mosaic 1 IF IgM et IgG
Laon CH (02)	Reagentia POC Puumala IgM
Lille CHRU (59)	Euroimmun Pool 1 Eurasia ELISA IgG et IgM
Nancy CHRU (54)	Reagentia Reascan+ Puumala IgM
Reims CHU (51)	Reagentia POC Puumala IgM
Saint-Claude CH (39)	Reagentia Reascan Puumala IgM

Le laboratoire coordonnateur a reçu en 2022, pour un diagnostic de laboratoire d'infection par un hantavirus, 236 échantillons (229 sérums ou plasmas, 4 urines et 3 LCR) provenant de 201 patients. **Un total de 99 prélèvements a été reçu de ces laboratoires. La répartition par laboratoire est indiquée au § 3.1.** C'est donc moins de la moitié des prélèvements (42%) qui ont été adressés par les laboratoires du réseau pour un diagnostic de 2ème intention.

En 2022, le délai moyen de resitution des résultats est de 10 jours (seulement 2% des résultats ont été transmis hors délais). La fiche de renseignements cliniques, biologiques et épidémiologique était disponible pour 83% des cas suspects et 100% des cas confirmés.

Activité d'expertise proprement dite: confirmation de diagnostic

Techniques commerciales ELISA ou IF IgG anti-hantavirus

La concordance de résultats était de 77,6% pour les 67 prélèvements testés par les laboratoires utilisant les troussees commerciales ELISA ou IF et dont les résultats étaient disponibles (0 résultat indisponible, 5 non testés), avec un accord fort entre les techniques commerciales et celle du CNR (coefficient de Kappa: 0,65 ; IC 95% : [0,47-0,83]. Ce pourcentage est similaire à celui mesuré l'an dernier tandis que le coefficient de kappa est nettement amélioré. 13,4% soit 9 des prélèvements avaient une discordance complète de résultat (Positif – Négatif) (Tableau 2).

L'analyse des 8 cas discordants « NEG CNR-POS LABO » montre pour 3 cas un défaut de spécificité des techniques commerciales (IF et ELISA). Il n'a pas été possible de conclure pour les 5 autres, faute de sérum tardif de contrôle. L'analyse du cas discordant « POS CNR-NEG LABO » semble en faveur d'un défaut de spécificité du test ELISA du CNR (le résultat du test IF du CNR était négatif).

Tableau 2 : Résultats de la détection des IgG anti-hantavirus (technique ELISA et IF).

Autres laboratoires	CNR			Total
	Négatif	Limite	Positif	
Négatif	26 (1)	0 (0,5)	1 (0)	27
Limite	5 (0,5)	0 (1)	0 (0,5)	5
Positif	8 (0)	1 (0,5)	26 (1)	35
Total	39	1	27	67

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

Techniques commerciales ELISA ou IF IgM anti-hantavirus

La concordance de résultats était de 53,7% pour les 67 prélèvements testés par les laboratoires avec les troussees commerciales ELISA ou IF et dont les résultats étaient disponibles (5 non testés et 0 résultat indisponible), avec un accord très faible entre les techniques commerciales et celle du CNR (coefficient de Kappa pondéré : 0,18 ; IC 95% : [0,0-0,42]). Ce pourcentage et le coefficient sont en nette diminution par rapport à celui observé l'an dernier. 34% soit 23 des prélèvements avaient une discordance complète de résultat (Positif – Négatif) (Tableau 3).

L'analyse des 6 cas discordants « POS CNR-NEG LABO » met en évidence pour les techniques commerciales mises en œuvre dans le réseau de laboratoire un défaut de

sensibilité pour 4 cas et pour celle du CNR un défaut de spécificité pour 1 cas (impossible de conclure pour le dernier cas, faute de sérum de contrôle). La technique commerciale mise en défaut utilise seulement la protéine N recombinante et présente un défaut de sensibilité pour les échantillons prélevés un mois après le début de maladie, ce qui est le cas pour les 4 patients concernés.

L'analyse des 17 cas discordants « NEG CNR-POS LABO » montre un défaut de spécificité des tests commerciaux pour 8 cas mais il n'a pas été possible de conclure pour les 9 autres cas, faute de sérum tardif de contrôle.

Tableau 3 : Résultats de la détection des IgM anti-hantavirus (technique ELISA et IF).

Autres laboratoires	CNR			Total
	Négatif	Limite	Positif	
Négatif	12 (1)	1 (0,5)	6 (0)	19
Limite	1 (0,5)	0 (1)	2 (0,5)	3
Positif	17 (0)	4 (0,5)	24 (1)	45
Total	30	5	32	67

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

Techniques commerciales tests rapides PUUV IgM

La concordance de résultats était seulement de 50,0% pour les 22 prélèvements testés par les laboratoires avec les trousse commerciales, avec un accord faible entre les techniques commerciales et celle du CNR (coefficient de Kappa pondéré : 0,29 ; IC 95% : [0,0-0,70]). Quatre prélèvements avaient une discordance complète de résultat (Positif – Négatif) (Tableau 4). Ces résultats sont nettement moins bons que ceux observés les deux années précédentes mais portent sur un effectif réduit.

L'analyse des 4 cas discordants « NEG CNR - POS LABO -> » ne permet pas de conclure sur un défaut de sensibilité ou de spécificité d'un des tests, faute de sérum tardif de contrôle.

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

Autres laboratoires	CNR			Total
	Négatif	Limite	Positif	
Négatif	4 (1)	4 (0,5)	0 (0)	8
Limite	1 (0,5)	2 (1)	1 (0,5)	4
Positif	4 (0)	1 (0,5)	5 (1)	10
Total	9	7	6	22

(entre parenthèses : coefficient de pondération)

Les discordances ont concerné essentiellement des résultats positifs des tests commerciaux et des résultats négatifs du CNR. Etant donné la très faible prévalence de la maladie cette année chez les cas suspects, le défaut de spécificité des tests commerciaux a été accentué et leur valeur prédictive positive a vraisemblablement été diminué.

Le laboratoire associé a reçu en 2022, 53 échantillons biologiques provenant de 48 patients présentant un tableau évocateur d'infection par un hantavirus du Nouveau Monde (Tableau 6). Le nombre de demandes de diagnostic hantavirus est resté stable par rapport à l'année 2021.

2.6 Activités de séquençage

En 2022, l'équipe du laboratoire coordinateur a repris les activités de séquençage qui avaient été interrompues entre 2017 et 2022. Sur cette période, ce sont 779 cas confirmés d'infection récente par un hantavirus dont 524 cas confirmés d'infection récente par le virus Puumala et 4 par le virus Seoul. Nous avons réalisé la caractérisation moléculaire de **21 souches du virus Puumala** détectées en France métropolitaine chez des patients entre 2017 et 2022 par séquençage Sanger du domaine codant du segment S (séquençage de 3 amplicons chevauchants obtenus par RT-PCR nichée conventionnelle). Sur les 21 isolats obtenus, 19 provenaient des traditionnels départements de la zone d'endémie connue [l'Aisne (02), les Ardennes (08), le Nord (59), la Meuse (55), la Moselle (57), le Jura (39), le Doubs (29) et la Haute-Saône (70)], et deux, des départements de l'Eure (27) et du Cher (18) qui appartiennent à la zone d'extension de la zone d'endémie depuis 2019 et 2021, respectivement.

Comme observé lors de l'étude couvrant la période 2012-2016 (Reynes JM et al. Emerg Infect Dis 2019), les 21 séquences des souches PUUV obtenues appartiennent toutes à la lignée d'Europe Centrale (CE) et se répartissent au sein de 2 sous-lignées (Q64 et R64) et de 3 clusters phylogénétiques distincts en fonction de leur origine géographique : les souches Q64 et Q258 retrouvées dans le Nord et Nord-Est, les souches R64 et Q258 retrouvées dans le Sud et les souches R64 et K258 retrouvées dans la partie Ouest de la zone d'endémie (regroupant la région de la Sologne [Cher (18), Loir-et-Cher (41) et Loiret (45)] et du Morvan [Nièvre (58) et Saône-et-Loire (71)]) (cf. Reynes JM et al. Emerg Infect Dis 2019 pour la description de la lignée et des sous-lignées circulant en France métropolitaine). Cette étude a fait l'objet d'un stage d'une étudiante en 2^{ème} année de DUT Génie Biologique de l'Université de Paris Est Créteil Val de Marne (UPEC).

Le laboratoire coordinateur a également séquencé **une souche du virus Séoul** détectée chez un patient de 53 ans, résidant dans l'Hérault (unique cas humain d'infection par le virus Seoul diagnostiqué en 2022). Une technique de PCR Multiplex associée au séquençage haut débit a permis d'acquérir le segment S complet et les segments M et L de façon partielle (cf 3.2)

En 2022, le laboratoire associé a réalisé les confirmations de diagnostic des **4 cas d'infection par l'hantavirus Maripa** (variant de l'espèce Orthohantavirus negraense, anciennement appelé virus Laguna negra) par séquençage NGS (Minion, Oxford Nanopore) soit complet soit partiel du segment S. Ne disposant pas des autorisations de détention et de mise en œuvre du virus Laguna Negra (variant Maripa), il n'est plus en mesure d'effectuer des analyses complémentaires sur le matériel génétique ainsi que des tentatives d'isolement. Ces demandes d'autorisation devront être déposées ultérieurement (a minima pour du matériel génétique).

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Externe au CNR ; accès au Pôle de Génotypage des pathogènes (PGP) de l'unité ERI
	Séquençage Sanger et NGS (Illumina, Oxford nanopore)

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Externe au CNR (PGP au sein unité ERI) ; 1/Expertise bio-informatique sollicitée pour l'analyse des données de séquences NGS, 2/autonomie d'analyse pour les données issues du séquençage Sanger). CLC Main Workbench et accès au serveur de calcul de l'Institut Pasteur

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations intervenues dans le cadre de la surveillance

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Séquençage de souches virales par Sanger ou NGS. Génération de séquences consensus pour analyses phylogénétiques (épidémiologie moléculaire). Le séquençage vient en complément des tests de diagnostic sérologiques et moléculaires.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

/

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Nombre de souches séquencées dans l'année : **21 souches PUUV et 1 souche SEOV**

Pour le virus Puumala, séquençage en priorité des souches détectées dans les départements d'extension de la zone d'endémie + sélection annuelle de prélèvements sur l'ensemble de la zone d'endémie répondant aux critères suivants : charge virale « confortable » (Ct<33), volume suffisant en biothèque et non opposition du patient à l'utilisation secondaire de son(s) prélèvement(s) et données associées, à des fins de recherche et dans le cadre de la pathologie pour laquelle il consulte.

A partir de 2022, séquençage systématique de tout autre hantavirus détecté (Seoul, Tula,...)

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : **NON**

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadata associées : **GenBank ou SRA**

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Le CNR reçoit des prélèvements primaires de laboratoires privés ou hospitaliers (essentiellement plasmas et sérums). Le CNR ne reçoit pas directement de souches pour séquençage.

Les séquences des souches sont mises à la disposition de la communauté scientifique via un enregistrement dans GenBank. Les données brutes de séquençage haut débit (NGS) sont également déposées dans la base de données SRA (Short Read Archive).

3. Activités de surveillance

- une année inter-épidémique en France métropolitaine avec seulement 24 cas humains d'infection récente par un hantavirus détectés (dont 40% dans l'Avesnois, foyer traditionnel d'endémie)
- dont un cas humain d'infection récente par le virus Seoul en Occitanie.
- quatre cas humains d'infection par l'hantavirus Maripa détecté en Guyane.

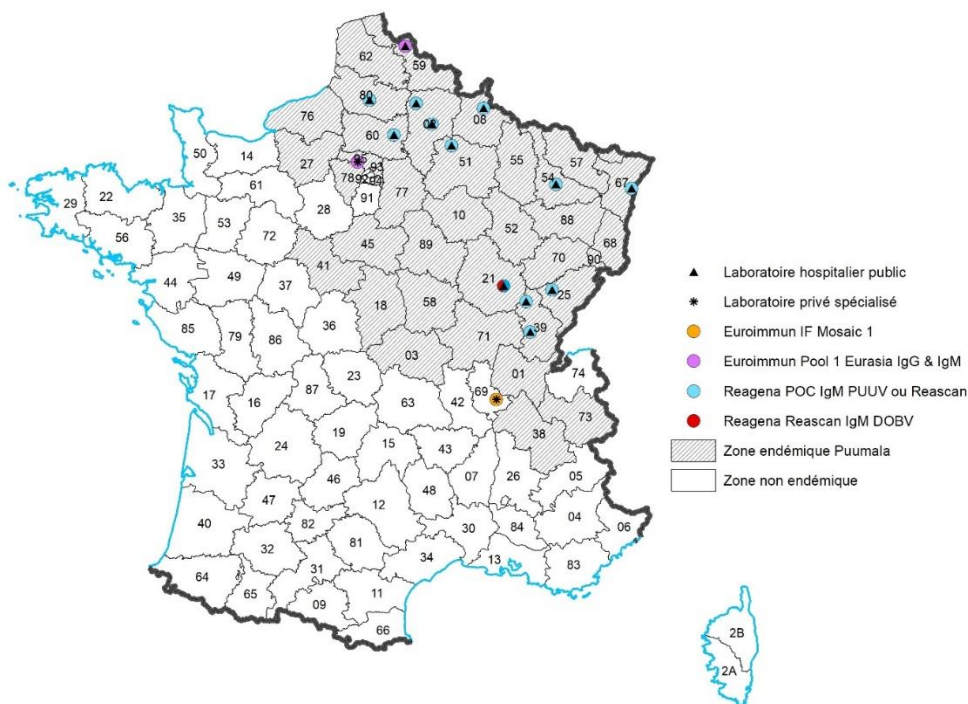
3.1 Description du réseau de partenaires

France Métropolitaine (laboratoire coordonnateur)

- Réseau de partenaires :

Le laboratoire coordonnateur reçoit des prélèvements pour un diagnostic de première intention et surtout pour un diagnostic de deuxième intention. Ces derniers sont expédiés par les laboratoires partenaires effectuant un diagnostic de première intention (cf. 2.5.1). Fin 2022, ces laboratoires étaient au nombre de quatorze [le laboratoire de virologie du CHU d'Amiens (80) a cessé cette activité de diagnostic fin janvier 2022].

Figure 1 : Répartition des 14 laboratoires du réseau en France métropolitaine (en hachuré, les départements où des cas d'infection par hantavirus ont été détectés sur la période 2012-2021). Figure sur la carte la référence du test sérologique proposée par chaque laboratoire.



- Prélèvements réceptionnés :

Le laboratoire coordonnateur a reçu en 2022, pour un diagnostic de laboratoire d'infection par un hantavirus, 236 échantillons (229 sérums ou plasmas, 4 urines et 3 LCR)

provenant de 201 patients. Moins de la moitié de ces prélèvements (42%) ont été adressés par des laboratoires pour un diagnostic de 2^{ème} intention (Tableau 5).

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

Diagnostic	Origine		Effectif
	Région	Département	
de 2 ^{ème} intention = confirmation (n = 99)	Auv - Rhône-Alpes	Laboratoire Eurofins Biomnis (69)	10
	Bourgogne – Franche-Comté	CHU Dijon (21)	5
		CHRU de Besançon (25)	2
		CH Dole (39)	1
		CH Saint-Claude/Lons-le-Saunier(39)	2
	Grand-Est	CH de Charleville-Mézières (08)	2
		CHU de Reims (51)	2
		CHRU Nancy (54)	4
		CHRU Strasbourg (67)	3
	Hauts-de-France	CH de Laon (02)	4
		CH de Saint Quentin (02)	1
		CHRU de Lille (59)	25
		CHIC Compiègne-Noyon (60)	2
	Ile-de-France	CHU Amiens (80)	1
Laboratoire Cerba (95)		35	
de 1 ^{ère} intention (n = 137)	Auvergne – Rhône- Alpes	CH Bourg-en-Bresse (01)	3
		CH Montluçon (03)	3
		CHU Saint-Etienne (42)	4
		CHU Lyon (69)	12
		Labo Médipole Villeurbanne (69)	1
		CH Chambéry (73)	3
	Bretagne	CH des Pays-de-Morlaix (29)	1
		CHU Rennes (35)	6
		CH Lorient (56)	2
	Bourgogne-Franche- Comté	CH Beaune (21)	2
		CH Belfort-Montbéliard (90)	1
	Centre – Val de Loire	CHR Orléans (45)	2
	Grand-Est	CH Saverne (67)	1
		CH Colmar (68)	4
		CH Remiremont (88)	3
	Hauts-de-France	CH Arras (62)	1
		CH Boulogne-sur-Mer (62)	3
		CHU Amiens (80)	6
	Ile-de-France	Hôpital Bichat-Claude-Bernard (75)	8
		Hôpital européen G. Pompidou (75)	1
		Hôpital Necker-Enfants malades (75)	2
		Hôpital Pitié Salpêtrière (75)	1
		Hôpital Saint Antoine (75)	1
		Hôpital Saint-Louis (75)	3
		Hôpital Tenon (75)	13
		CHG Longjumeau (91)	1
		Hôpital Ambroise Paré (92)	3
		Hôpital Foch (92)	1
		Hôpital Avicenne (93)	4
Hôpital Bicêtre – Le Kremlin B. (94)		1	
Hôpital Paul Brousse (94)		1	
CHIC Créteil (94)		1	
CHU Créteil (94)	10		
Nouvelle Aquitaine	CHU Bordeaux (33)	7	
	CHU Poitiers (86)	2	

Diagnostic	Origine		Effectif
	Région	Département	
	Occitanie	CH Ales-Cévennes (30)	1
		CHRU Montpellier (34)	6
		CH Perpignan (66)	3
	Provence – Alpes – Côte d’Azur	CH Antibes-Juan-les-Pins (06)	1
		CHU Nice (06)	1
		CHU Marseille (13)	1
		CH du Pays-d’Aix (13)	2
		CHIC Toulon (83)	3
	Réunion	CHU Saint-Denis (974)	1

Région Antilles-Guyane (laboratoire associé)

- Réseau de partenaires :

Depuis l'identification en 2008 du premier cas humain d'infection autochtone par un hantavirus du Nouveau Monde, le virus Maripa, le CNR Hantavirus-LA a développé des outils sérologiques et moléculaires spécifiques aux hantavirus du Nouveau Monde. Il est le seul laboratoire dans le département à réaliser ce diagnostic de 1^{ère} intention, les laboratoires privés ou hospitaliers ne disposant pas d'outils d'investigations moléculaires et/ou sérologiques (des trousse de diagnostic sérologique existent mais les différents laboratoires en Guyane ne les ont pas mises en place). Les médecins hospitaliers sont sensibilisés aux aspects cliniques et épidémiologiques liés à l'infection par ce virus émergeant en Guyane. Ils sont aussi informés des capacités techniques disponibles au laboratoire pour répondre à toute demande de diagnostic (sérologique et/ou moléculaire).

- Prélèvements réceptionnés :

En 2022, le laboratoire associé a reçu 53 échantillons biologiques provenant de 48 patients présentant un tableau évocateur d'infection par un hantavirus du Nouveau Monde (Tableau 6). Le nombre de demandes de diagnostic hantavirus est resté stable par rapport à l'année 2021.

La quasi-totalité des demandes de diagnostic provenaient du Centre Hospitalier de Cayenne (CHC), une seule provenant d'un médecin de ville (1,9% de l'ensemble des prélèvements). Les prélèvements du CHC proviennent de différents services : 49% (26/53) du service de réanimation, 30,2% (16/53) du service des maladies infectieuses, 15,1% (8/53) du service des urgences et 3,8% (2/53) du service de pédiatrie et de la permanence d'accès au soin de santé.

Tableau 6 : Origine des prélèvements adressés au laboratoire associé en 2022.

Origine	Guyane	Martinique	Guadeloupe	Total
Secteur hospitalier	52	0	0	52
Centre de santé	0	0	0	0
Secteur privé	1	0	0	1
Total	53	0	0	53

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

France Métropolitaine (laboratoire coordonnateur)

Le laboratoire coordonnateur a effectué sur tous ces prélèvements (sauf les 4 urines), dans le cadre du diagnostic, une recherche d'IgM et d'IgG anti-hantavirus [ELISA IgM anti-virus Puumala (PUUV), Thailand (THAIV), et Sin Nombre (SNV) et IgG anti-PUUV, THAIV, et SNV + IF Ig anti-PUUV et THAIV], le choix des antigènes testés dépendant du lieu d'exposition des patients.

Le laboratoire coordonnateur a également recherché l'ARN de PUUV, du virus Seoul (SEOV), ou d'hantavirus en cas de demande expresse ou sur certains prélèvements ciblés dans le cadre de la surveillance. Au total, 1 739 examens ont été effectués sur les 236 prélèvements testés (Tableau 7).

Sur la base des résultats de ces examens, les 201 cas suspects ont été classés dans les catégories suivantes :

- **13 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 temps réel ou par RT-PCR nichée ciblant le la famille *Hantaviridae* puis identification par analyse de la séquence).**
- **10 cas d'infection récente par un hantavirus, confirmés sérologiquement (présence d'IgM et d'IgG anti-hantavirus).**
- **0 cas probable d'infection récente par un hantavirus (présence d'IgM anti-hantavirus détectées par ELISA seulement et confirmée par IF)**
- **11 cas possibles d'infection récente par un hantavirus (présence d'IgM anti-hantavirus détectées par ELISA seulement)**
- **8 cas d'infection ancienne par un hantavirus (présence d'IgG anti-hantavirus uniquement, détectés par ELISA et confirmé par IF).**
- **3 cas possible d'infection ancienne par un hantavirus (présence d'IgG anti-hantavirus détectées par ELISA seulement)**
- **65 cas avec absence d'infection ancienne ou récente par un hantavirus (absence d'IgM et d'IgG anti-hantavirus sur au moins un prélèvement effectué au moins 10 jours après le début de la maladie)**
- **91 cas avec un statut indéterminé (n'entrant pas dans les catégories précédentes)**

Tableau 7 : Examens effectués par le labo. coordonnateur dans le cadre de la surveillance.

Examens		Effectifs ¹
Technique	Antigène ou virus ²	
IF Ig	PUUV	232
	THAIV	232
ELISA IgM	PUUV	232
	THAIV	232
	SNV	1
ELISA IgG	PUUV	232
	THAIV	232
	SNV	1
RT-PCR temps réel	PUUV	118
	SEOV	1
RT-PCR nichée	Hantavirus Arvicolinae	113
	Hantavirus	113
TOTAL		1 739

¹ Tous les examens n'ont pas été effectués sur les 236 prélèvements reçus (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).

² L'antigène THAIV est utilisé pour détecter les anticorps anti-virus Seoul (SEOV), Dobrava-Belgrade (DOBV) ou Hantaan (HTNV) avec la même efficacité que les antigènes SEOV, DOBV ou HTNV. Il a l'avantage de ne pas être classé dans les « MOT », ce qui allège la mise en œuvre des techniques.

Au final, 24 cas ont été considérés comme des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus [CCIRH] (14 virologiquement et 10 sérologiquement). Il n'y a pas eu de patient résidant en France ou à l'étranger, exposés à l'étranger. Un des patients détectés en 2022 a été prélevé en 2021 (et comptabilisé dans les cas de 2021).

La médiane d'âge des 24 CCIRH est de 42,0 ans (de 13 à 69 ans) et est conforme à celles observées depuis 2012 (Tableau 8). Le sexe-ratio (M/F) de 2,0 (16 hommes et 8 femmes) est parmi les plus bas sur cette période (Tableau 8).

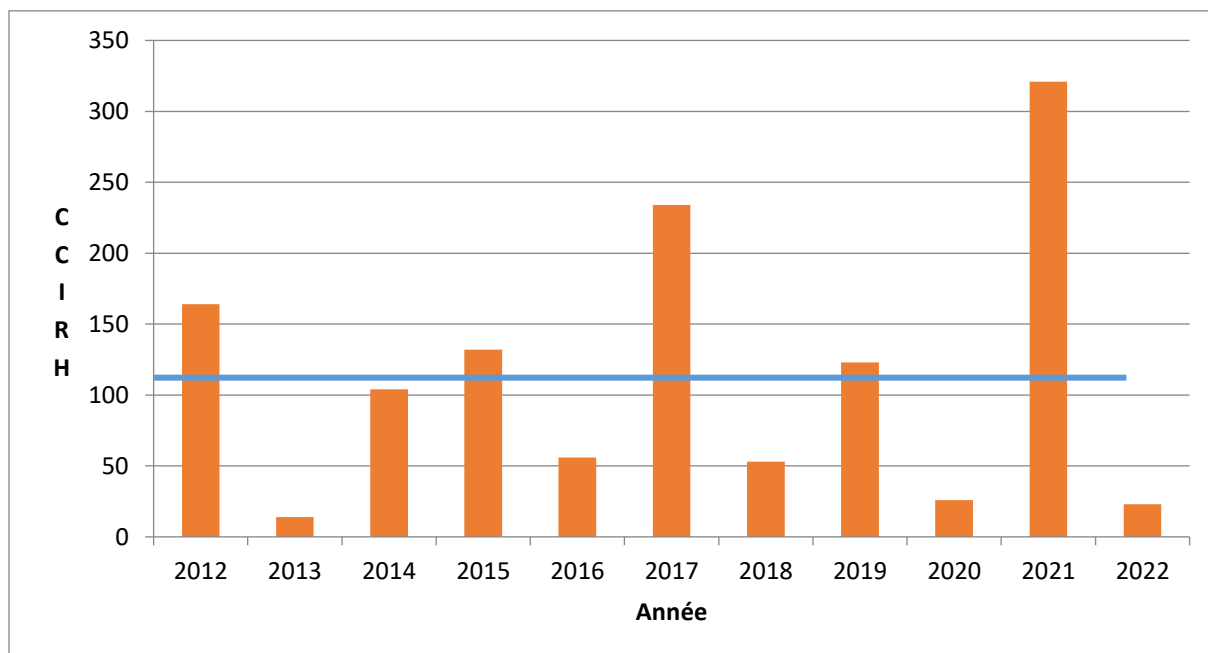
Tableau 8 : Sexe-ratio et âge médian des CCIRH résidant et exposés en France métropolitaine

Année (de prélèvement)	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de cas	164	14	104	132	56	234	53	122*	27*	321	23
Age médian	42	48,0	38,5	39,0	39,0	40,0	43,0	40,0	40,0	41,5	42,0
Sexe-ratio	3,3	2,5	4,2	2,7	2,3	2,5	2,1	5,1	25,0	2,2	2,0

* 4 cas parmi les 126 détectés en 2019 sont prélevés en 2018 et un cas parmi les 27 détectés en 2020 est prélevé en 2019

Le nombre de CCIRH détecté en 2022 se trouve bien en deçà de la moyenne (trait bleu) de cas détectés (123 cas) sur la période 2012-2021 (Figure 2). Sur cette période, nous observons des années dites « épidémiques » tous les deux à trois ans, séparées par des périodes inter-épidémiques. Ces variations d'incidence sont bien connues et 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. L'année 2022 apparaît donc comme une année inter-épidémique.

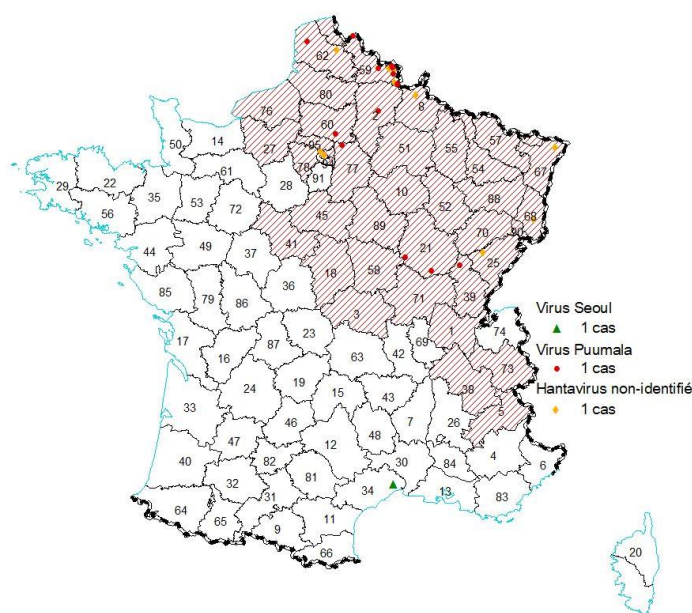
Figure 2 : Distribution annuelle des cas confirmés d'infection par un hantavirus en France métropolitaine, 2012-2022 sur la base de la date du prélèvement du patient (le trait bleu représente la moyenne sur la période 2012-2021).



Malgré le très faible nombre de cas, le pic principal de détection habituellement retrouvé à la fin du printemps est observé en 2022. Un pic secondaire est également observé cette année à la fin de l'été (Figure 3).

La distribution géographique selon les départements des 24 CCIRH résidant en France métropolitaine est présentée sur la Figure 5. Les données se fondent d'abord 1/ sur la commune de résidence du patient (n=23), ou 2/ sur une commune différente de la commune de résidence, indiquée comme lieu d'exposition (n=1). Il n'y a pas eu d'extension de la zone d'endémie. L'Avesnois dans le Nord, foyer traditionnel d'endémie, a concerné près de 40% des cas (Figure 4, Tableau 9).

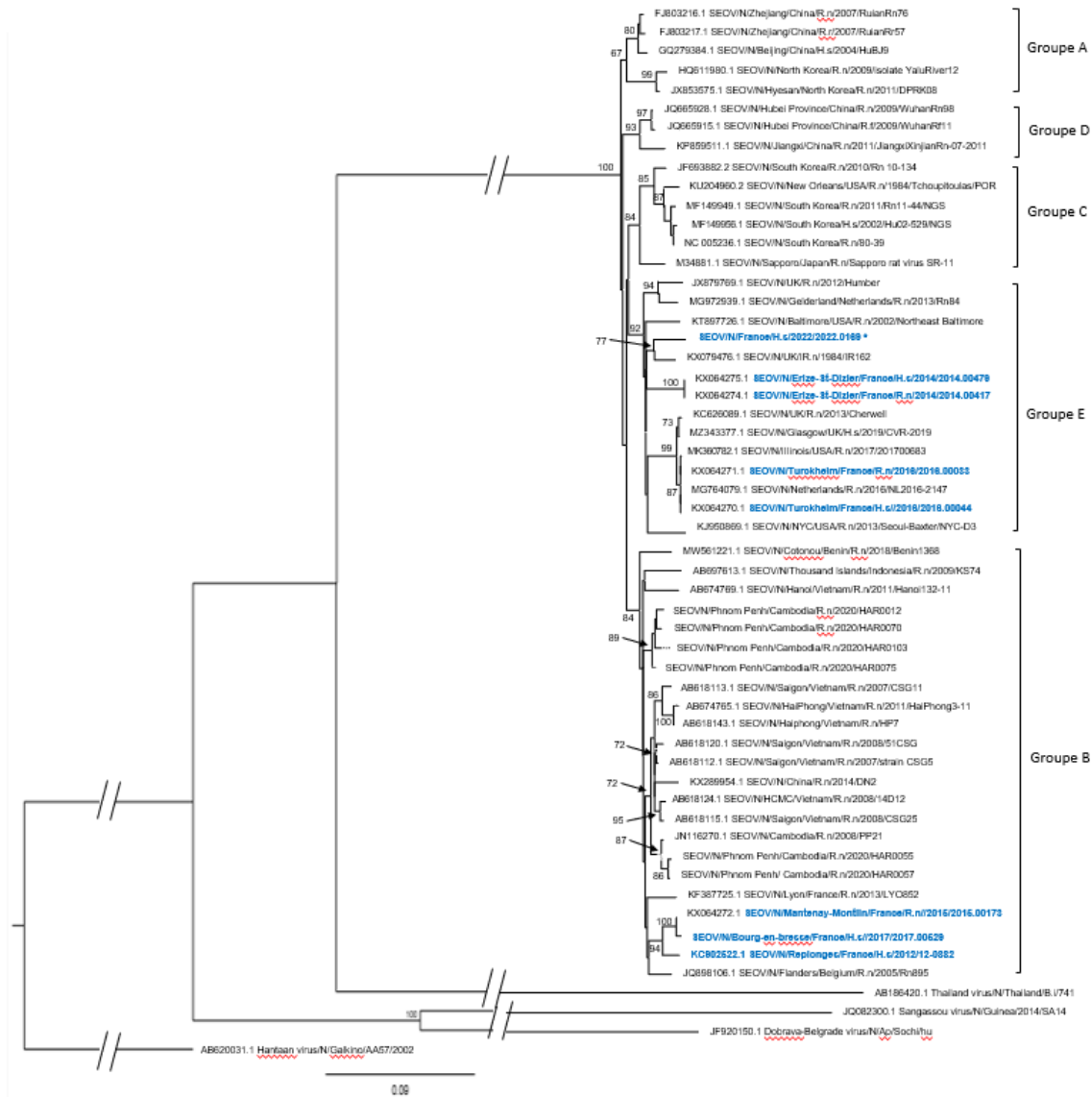
Figure 4 : Distribution spatiale des 24 cas confirmés d'infection récente par un hantavirus détectés en France métropolitaine en 2022 (en hachuré, les départements où des cas d'infection par hantavirus ont été détectés sur la période 2012-2021).



Les cas d'infection par le virus Seoul (SEOV) ne sont pas fréquents et font l'objet d'une alerte. Cela n'a pas été le cas pour le patient diagnostiqué cette année, suite à une détection tardive (décembre) par rapport à la date de prélèvement (août). L'alerte n'était plus justifiée. La détection de la souche a été possible grâce à la mise en place en décembre d'une technique de RT-PCR temps réel ciblant le segment S de ce virus, plus sensible que la technique de RT-PCR Nichée ciblant le segment L des Hantavirus. Il s'agit du 10ème patient infecté par SEOV que nous diagnostiquons depuis la mise en place de la détection moléculaire en 2012 (un de ces cas a été confirmé seulement sérologiquement).

Le patient concerné est un homme hospitalisé âgé de 53 ans, résidant dans l'Hérault, Il présentait un syndrome fébrile algique avec hématurie, thrombopénie, insuffisance rénale aigue et cytolysse hépatique, typique d'une infection par hantavirus et en particulier avec l'atteinte hépatique quand il s'agit du virus Seoul. Le patient a présenté à distance un syndrome de Guillain-Barré. Il n'a pas été possible de cerner les circonstances d'exposition. Le patient a effectué un séjour de 5 jours au Kenya qui s'est terminé une semaine avant le début des signes cliniques. Il ne signale pas d'exposition particulière pendant ce séjour. Il est en revanche intervenu dans la mise en carton d'affaires (déménagement) et de nettoyage de son ancien domicile dans l'Hérault avant et après son séjour au Kenya. Il ne rapporte pas de contact avec des rats domestiques et d'élevage. Pourtant la souche détectée chez ce patient (séquence complète du segment S obtenue par technique de PCR Multiplex associée au séquençage haut débit) est proche de souches circulant chez ces types de rats (Figure 5).

Figure 5 : Arbre phylogénétique fondé sur les séquences du domaine codant du segment S de souches du virus Seoul (SEOV) détectées chez l'homme et les rongeurs en France de 2012 à 2022 et de souches SEOV représentatives publiées et disponibles dans GenBank. Les séquences indiquées en bleu correspondent à des souches détectées chez des cas humains et chez des rongeurs en France métropolitaine entre 2012 et 2022, et séquencées par le CNR. L'étoile (*) indique la séquence détectée chez le patient de 53 ans.



En 2022, quatre cas d'infection aiguë par le virus Maripa ont été identifiés. La recherche systématique d'anticorps IgG anti-hantavirus n'a mis en évidence aucun cas en lien avec une infection ancienne (Tableau 10).

Le délai moyen de restitution des résultats (sérologie + détection moléculaire) a été de 3,8 jours par rapport à la date de réception au laboratoire.

Tableau 10 : Bilan des résultats de diagnostic d'infection par un hantavirus, 2012 – 2022.

Année	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Echantillons reçus	15	35	14	15	15	19	18	23	16	44	53
RT-PCR positive	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	5
IgM anti-SNV positive	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	5
IgG anti-SNV positive	NT*	NT	0	2	2	0	2	0	1	0	3
Cas aigus détectés	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	4

* NT = non testé

Figure 3 : Distribution mensuelle des cas confirmés d'infection récente par un hantavirus (CCIH) en France métropolitaine Janvier 2012 – Décembre 2022 (sur la base de la date de prélèvement du patient ; la courbe bleue indique la moyenne mensuelle de cas sur la période 2012-2021)

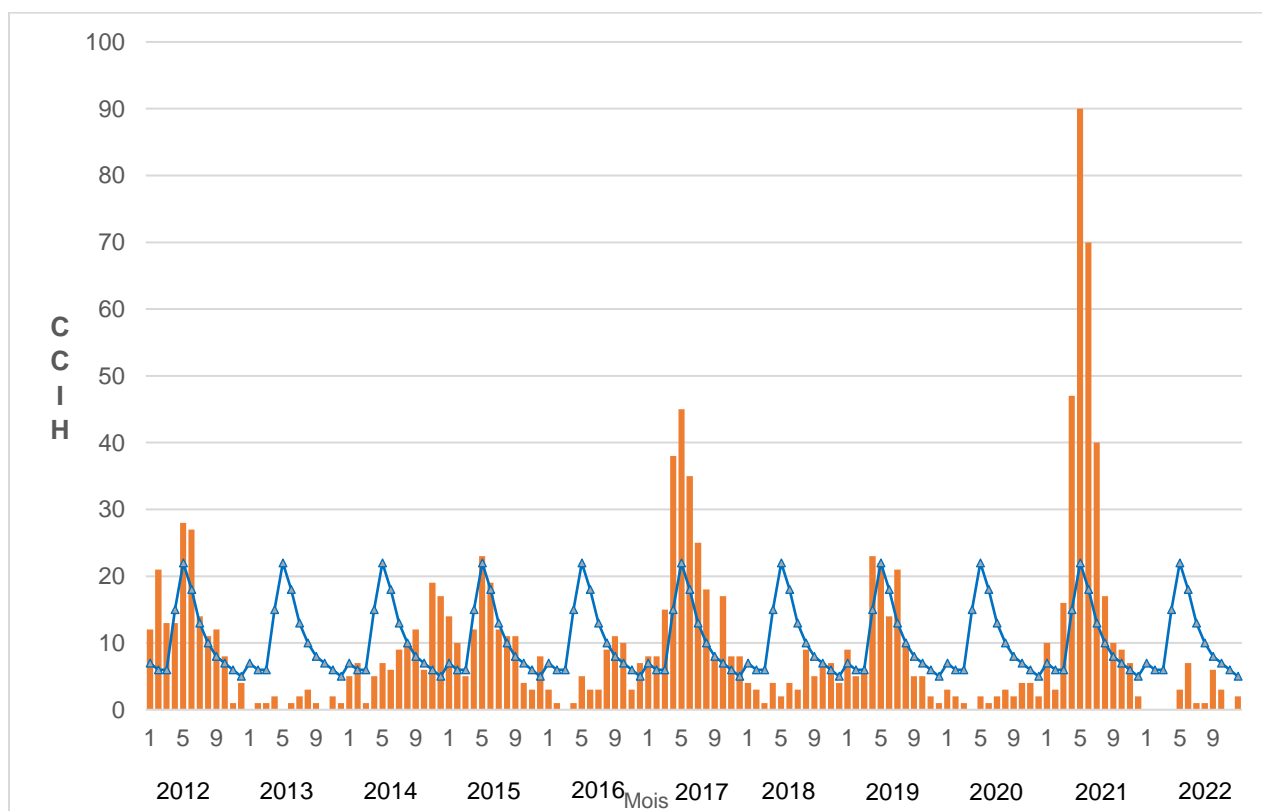


Tableau 9 : Distribution spatio-temporelle de cas confirmés d'infection récente par un hantavirus, 2022, France métropolitaine (départements avec cas détectés sur la période 2003-2022) :

Région	Département	Population Municipale Décret 2019	2017		2018		2019		2020		2021		2022												
			Total	Incid.†	Total	Incid.†	Total	Incid.†	Total	Incid.†	Total	Incid.*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Hauts-de-France	02	546 527	37	6,87	16	2,97	31	5,67	6	1,10	20	3,66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	59	2 604 361	39	1,5	17	0,58	20	0,77	5	0,19	22	0,84	0	0	0	0	1	2	0	0	3	2	0	1	9
	60	824 503	9	1,1	3	0,24	7	0,85	0	0	9	1,07	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	62	1 468 018	4	0,27	3	0,20	1	0,07	1	0,07	1	0,07	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
	80	572 443	0	0	0	0	0	0	1	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grand-Est	08	273 579	30	10,8	5	1,80	16	5,85	4	1,46	20	7,31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	10	310 020	1	0,32	0	0	0	0	0	0	1	0,32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	51	568 895	5	0,87	2	0,35	3	0,53	1	0,18	1	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	52	175 640	4	2,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	54	733 481	3	0,41	1	0,14	1	0,14	0	0	1	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	55	187 187	5	2,62	0	0	3	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	57	1 043 522	1	0,1	0	0	1	0,1	0	0	2	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	67	1 125 559	4	0,36	0	0	2	0,18	0	0	2	0,18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	68	764 030	3	0,39	0	0	1	0,13	0	0	2	0,26	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Normandie	88	367 673	3	0,82	0	0	1	0,27	0	0	4	1,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	601 843	0	0	0	0	1	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	76	1 254 378	0	0	0	0	0	0	0	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile-de-France	75	2 187 526	0	0	1*	0,05	0	0	1*	0,05	1	0,05	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	77	1 403 997	0	0	0	0	3	0,21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	78	1 438 266	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	92	1 609 306	2	0,12	0	0	1	0,06	1	0,06	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	93	1 623 111	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	94	1 387 926	0	0	2	0,15	1	0,07	0	0	1	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Centre V-de-L ;	95	1 228 618	2	0,16	0	0	2	0,16	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	304 256	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	41	331 915	1	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45	678 105	0	0	0	0	4	0,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bourgogne-Franche-Comté	21	533 819	5	0,94	0	0	4	0,75	0	0	4+1‡	0,94	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	25	539 067	25	4,66	1	0,19	8	1,48	0	0	71	13,17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	39	260 188	33	12,66	1	0,38	4	1,54	3	1,15	134	51,50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	58	207 182	0	0	0	0	1	0,48	0	0	1	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	70	236 659	10	4,21	0	0	3	1,27	0	0	4	1,69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	71	553 595	2	0,36	0	0	1	0,18	0	0	3	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	89	338 291	0	0	0	0	3	0,89	0	0	2	0,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Auvergne Rhône-Alpes	90	142 622	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3,51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	01	643 350	2(1*)	0,32	0	0	0	0	0	0	1	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	03	337 988	0	0	0	0	1	0,30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	38	1 258 722	4	0,32	0	0	0	0	0	0	1	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	73	431 174	0	0	1	0,23	0	0	2	0,46	2	0,46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Occitanie	34	1 175 623											0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	1
Provence-A-C A	05	141 284	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		32 414 239	234	0,72	53	0,16	124	0,38	26	0,08	321	1,00	0	0	0	0	3	7	1	1	6	3	0	2	23

† Incid. = Incidence pour 100 000 habitants ; * Cas d'infection récente par le virus Seoul ; ‡ le cas détecté en janvier 2022 en Côte d'Or est compté en 2021 car prélevé en octobre 2021

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

Non applicable (il n'y a pas de traitement spécifique par des anti-infectieux pour les maladies causées par les hantavirus).

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France

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

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

- à l'unité des infections zoonotiques, vectorielles, et alimentaires, de la direction des Maladies Infectieuses de l'agence nationale de santé publique, Santé publique France.
- au bureau des risques infectieux émergents et des vigilances de la direction générale de la santé,
- au laboratoire associé (Institut Pasteur de Guyane),
- aux partenaires du réseau de laboratoires métropolitains effectuant un diagnostic de première intention

Le laboratoire coordonnateur a également des échanges réguliers par email ou par téléphone avec l'unité des infections zoonotiques, vectorielles et alimentaires de la direction des maladies infectieuses de l'agence Santé publique France dans le cadre des alertes (cf. § 4).

Le laboratoire associé contribue à l'alerte sanitaire en signalant à la cellule de veille d'alerte et de gestion sanitaire de l'ARS concernée, à la Cire concernée, et au laboratoire coordonnateur l'identification de tout nouveau cas humain ou phénomène anormal (cf. § 4).

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Le CNR des Hantavirus est membre du réseau européen pour la détection précoce et la surveillance des maladies virales (ré-)émergentes ou EVD-LabNet (acronyme de Emerging Viral Diseases-Expert Laboratory Network) soutenu par l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) : <https://www.evd-labnet.eu/> (ce réseau est une refonte du précédent réseau ENIVD European Network for diagnostics of Imported Viral Diseases). Les objectifs de ce réseau sont en particulier de partager les connaissances sur le diagnostic et la surveillance des maladies virales émergentes. Plusieurs autres CNR hébergés par l'Institut Pasteur (CNR FHV, CNR des virus respiratoires, et CNR Rage) ainsi que la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) de l'Institut Pasteur en sont membres. Christophe Batejat, responsable adjoint de la CIBU et correspondant Qualité du CNR Hantavirus est le point focal de l'Institut Pasteur pour ce réseau.

Le CNR des Hantavirus transmet annuellement les données de surveillance à de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) à Stockholm en Suède (<http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>) via Santé publique France.

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).

L'Institut Pasteur à Paris est membre de l'association Pasteur Network et à ce titre, le CNR

des Hantavirus collabore avec certains Instituts de ce réseau dans le cadre du diagnostic et de l'épidémiologie des infections par hantavirus, en particulier avec l'Institut Pasteur du Cambodge, et bien sûr l'Institut Pasteur de Guyane, laboratoire associé du CNR.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNR a continué à s'intéresser à l'origine géographique et au nombre de patients résidant en métropole prélevés pour un diagnostic de 1^{ère} intention 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, sur l'ensemble du territoire métropolitain et dans quelle proportion.

Le nombre de demandes de diagnostic pour des patients résidant sur le territoire métropolitain en 2022 est très légèrement inférieure à la moyenne observée sur la période 2012-2022 (1725 demandes). En revanche, le nombre de cas détecté est faible et par conséquent le pourcentage de cas confirmés est du même ordre que ceux observés pour les années inter-épidémiques (2013, 2016, 2018, 2020) (Tableau 11).

Les demandes restent les plus abondantes au cours de l'été. Le pic estival du pourcentage de CCIRH parmi les patients prélevés est observé en 2022 comme c'est le cas lors des années épidémiques (2012, 2015, 2017, 2019 et 2021) (Figure 6). Il existe toujours une disparité géographique des demandes. Le pourcentage de patients prélevés en zone d'endémie de PUUV reste très élevé, le plus faible observé étant en 2012 quand l'alerte lancée par les autorités américaines concernant le virus Sin Nombre a provoqué une demande accrue de diagnostic à l'automne et en partie dans la zone de non endémie (Tableau 11; Figure 7).

Tableau 11 : Caractéristiques des patients prélevés en France métropolitaine pour un diagnostic d'hantavirose 2012-2022.

Année	Nombre de patients prélevés	% de cas confirmés (effectif)	% de patients prélevés en zone d'endémie* (n/N)
2012	1 869	8,8 (164)	81,5% (1 148 / 1 408)
2013	1 120	1,3 (14)	82,2% (921 / 1 120)
2014	1 618	6,4 (104)	85,3% (1 376 / 1 614)
2015	1 725	7,7 (132)	88,9% (1 533 / 1 725)
2016	1 550	3,6 (56)	88,9% (1 356 / 1 525)
2017	1 944	12,0 (233)	87,7% (1 703 / 1 941)
2018	1 637	3,2 (53)	87,6% (1 433 / 1 636)
2019	1 885	6,5 (123)	86,4% (1 622 / 1 878)
2020	1 361	1,9 (26)	84,3% (1 148 / 1 361)
2021	2 569	12,5 (321)	88,0% (2 257 / 2 566°)
2022	1 699	1,4 (23)	84,4% (1 419/1 682)

* le département d'origine n'est pas connu pour 461 cas en 2012, 4 en 2014, 25 en 2016, 3 cas en 2017, 1 en 2018, 7 en 2019, 3 en 2021, et 17 en 2022.

Figure 6 : 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 2012 – 2022.

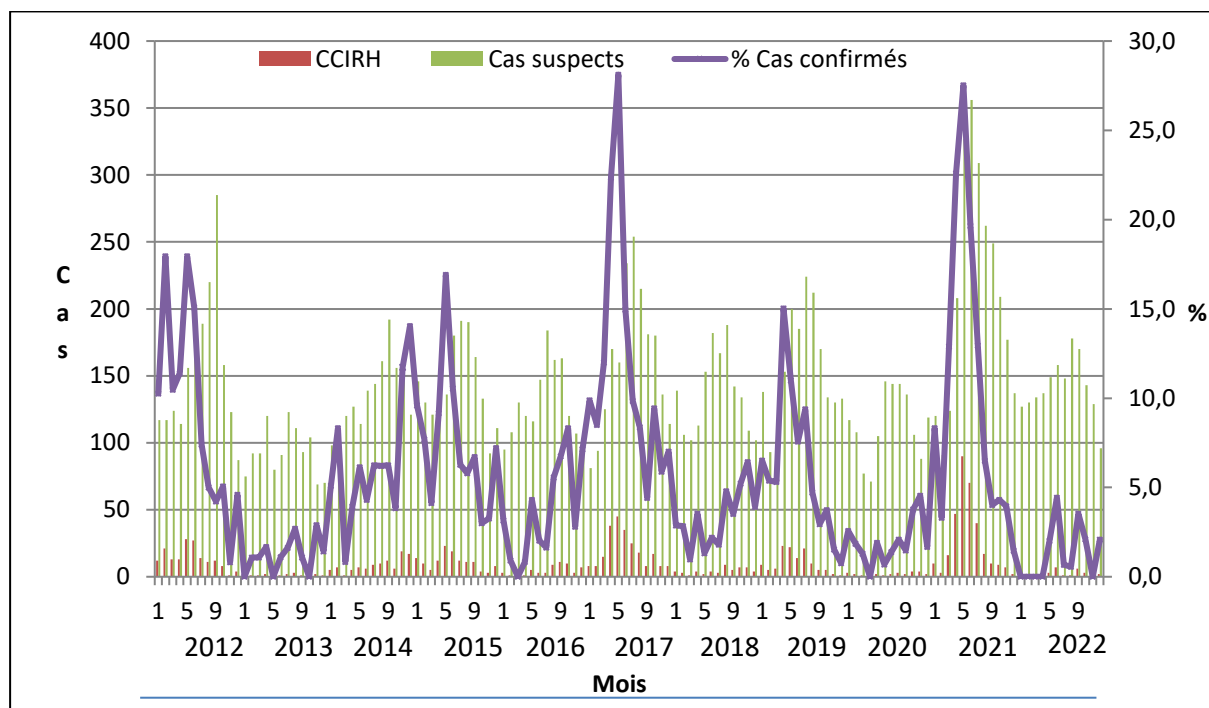
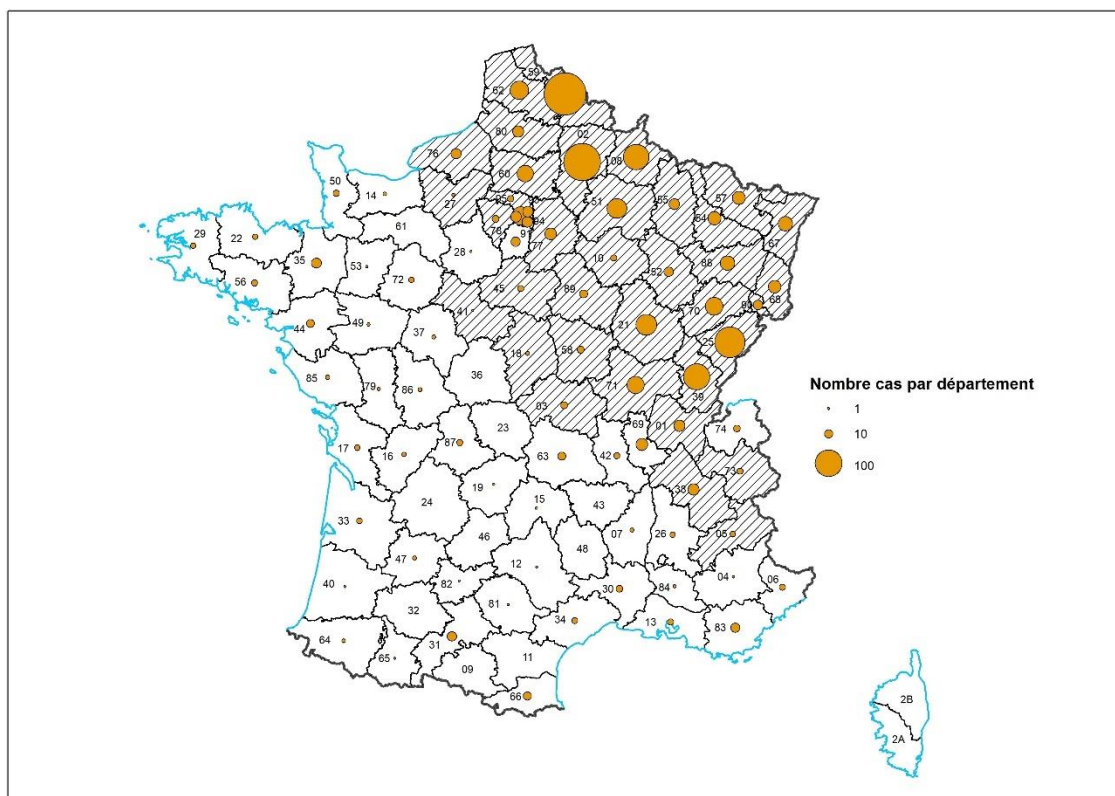


Figure 7 : Distribution spatiale en 2022 des patients prélevés pour un diagnostic d'infection par un hantavirus en France métropolitaine et par département (rond orange par département). La distribution se fonde sur le département du lieu de prélèvement ou sur celui du laboratoire transmetteur si le premier n'est pas connu ; en hachuré, les départements où des cas confirmés d'infection par hantavirus ont été détectés de 2012 à 2021.



4. Alertes

Au besoin, des alertes sont émises par email auprès de nos interlocuteurs de l'unité des Infections zoonotiques, vectorielles, et alimentaires du département des maladies infectieuses de Santé publique France (SpF). Les réponses apportées à nos alertes par nos interlocuteurs de SpF ont toujours été très rapides et constructives.

• Laboratoire coordonnateur

Aucune alerte n'a été émise cette année.

• Laboratoire associé

Entre mars et septembre 2022, quatre cas d'infection aiguë par le virus Maripa ont fait l'objet d'une déclaration. Deux d'entre eux étaient des patients hospitalisés dans le service de réanimation du Centre Hospitalier de Cayenne (CHC) pour détresse respiratoire et un dans le service des Maladies infectieuses. Ces trois cas ont eu une issue favorable. Un quatrième patient est quant à lui décédé au services des urgences du CHC. Les caractéristiques des cas sont présentées dans le tableau 12. De plus, sur la période 2022, une moindre létalité a été observée par rapport aux années précédentes ainsi qu'une baisse du ratio H/F (avant 2022, les cas détectés étaient tous de sexe masculin).

Tableau 12 : Caractéristiques de cas identifiées positif pour la recherche du virus Maripa en Guyane en 2022.

Cas	Date de signalement	Sexe	Age	Issue	Virus identifié (séquençage)	Lieu de résidence
1	14/03/2022	H	32	RAD*	Maripa	Remire-Montjoly
2	22/04/2022	F	19	Décès	Maripa	Macouria (Sablanche)
3	28/08/2022	F	58	RAD*	Maripa	Remire-Montjoly (à environ 2 km du cas 1)
4	07/09/2022	F	41	RAD*	Maripa	Macouria (Sablanche)

RAD : retour à domicile.

Ces quatre cas étaient localisés dans deux communes proches du Cayenne (Remire-Montjoly et Macouria) dans lesquelles des cas d'hantavirus avaient précédemment été identifiés. Dans ces mêmes communes, les cas étaient distants d'environ 2 km.

Une investigation environnementale (captures de rongeurs) a pu être réalisée autour de trois des quatre cas (les captures n'ayant pu être faites autour du deuxième cas). Sur l'ensemble de ces zones (sites autour des domiciles), il avait été noté la présence de rongeurs dans et autour des habitations (patients potentiellement en contact).

Le premier site (commune de Remire-Montjoly) correspondait à une zone densément peuplée, d'habitations informelles de bois, imbriquées les unes dans les autres, construites pour partie sur

une zone humide remblayée. L'ensemble était très insalubre. La présence permanente de rongeurs avait été signalée par l'entourage de la patiente. Le second site (commune de Rémire-Montjoly) était le lieu d'habitation du patient. La zone correspondait également à une zone d'habitat informel, mais beaucoup plus diffus, en front de mer. Les captures ont été réalisées dans une zone abandonnée d'agriculture vivrière d'environ 1/4 d'hectare, comprenant bambous et végétations herbacées. Le troisième site (commune de Macouria) était au milieu d'une zone diffuse, d'une centaine d'hectares, d'habitations illégales. Les pièges ont été posés en périphérie immédiate du domicile de la patiente, sur de la terre battue, zones herbeuses, et proximité de zones d'évacuation d'eaux usées et de dépose de déchets.

Au total, 19 rongeurs ont été capturés sur le premier site (8 souris domestiques (*Mus musculus*) et 11 rats bruns (*Rattus norvegicus*) ; effort de piégeage 560 nuits-pièges), 7 sur le deuxième (1 souris domestique et 6 rats bruns : effort de piégeage 168 nuits-pièges) et 5 sur le troisième (1 rat noir (*R. rattus*) et 4 rats bruns). Aucun réservoir potentiel appartenant aux genres *Zygodontomys* et *Oligoryzomys* n'a été capturé.

Les animaux ont été euthanasiés et des prélèvements d'organes (foie, rate, rein, poumon) et de sang ont été réalisés. Poumons et reins (organes cibles des Hantavirus) ont été analysés pour la recherche du génome viral des hantavirus du Nouveau Monde (par qRT-PCR ciblant le virus Maripa et par PCR conventionnelle et nichée, Vincent et al. 2000). Aucun prélèvement ne s'est avéré positif pour la recherche du génome viral.

Le séquençage complet ou partiel des virus identifiés pour les quatre cas humains en 2022 montre que ces derniers appartiennent bien à l'espèce *Orthohantavirus negraense* (variant Maripa). Une analyse phylogénétique préliminaire de ces séquences montre deux clades distincts qui se structurent en fonction de l'origine géographique des cas : un clade regroupant les séquences virales issues de la localité de Remire-Montjoly et un clade regroupant les séquences virales de la région de Macouria/Iracoubo.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Liste des formations aux professionnels de santé ;

/

Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

- Accueil d'une étudiante en 2^{ème} année de DUT Génie Biologique de l'Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne (UPEC) pour un stage d'une durée de 2 mois (11/04/2022 au 17/06/2022) dont le sujet a porté sur "le Génotypage de souches du virus Puumala détectées chez l'homme, en France métropolitaine, sur la période 2017-2021" (cf 2.6).

Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

/

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

Rétro-information aux partenaires :

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

Information/formation :

Les pages du site Web du CNR des Hantavirus, mises en ligne pour la première fois en décembre 2012, font l'objet de mises à jour régulières avec en particulier l'ajout chaque mois du rapport mensuel de surveillance (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/hantavirus>).

Le site Web du CNR présente sur sa page d'accueil les coordonnées du laboratoire coordonnateur et celles du laboratoire associé.

Le site est très utile en particulier pour informer nos correspondants des conditions pré-analytiques. Les extraits des rapports des années d'exercice 2012 à 2021 y sont actuellement disponibles. Le nombre de pages consultées est de 6449 en 2022, en baisse depuis 2 ans (16 017 consultations en 2020, 11 085 en 2021), diminution mise pour partie sur le compte de la mise en place du consentement aux cookies à la mi-2021. 86% des consultations en 2022 ont concerné la page « La maladie –Recommandations » (pourcentage du même ordre que ceux des années précédentes).

Concernant le laboratoire coordonnateur, au moins deux postes téléphoniques fixes (secrétariat et responsable du laboratoire coordonnateur) peuvent être joints pendant les heures ouvrables. En dehors des heures ouvrables, un message donne les numéros de téléphone mobile du responsable du laboratoire coordonnateur ou de son adjoint. Une adresse email générique cnr-hantavirus@pasteur.fr a été créée et renvoie les messages au personnel du CNR. Seuls le responsable et son adjoint exercent l'activité de conseil. Les appels sont tracés sur un fichier de type Excel partagé par le personnel où sont notés l'objet de l'appel reçu et la réponse apportée.

Le laboratoire associé à l'Institut Pasteur de la Guyane dispose d'un site web faisant l'objet

de mises à jour régulières sur lequel sont présentés le laboratoire de virologie et le CNR des hantavirus. Pendant les heures ouvrables, le responsable et le responsable adjoint peuvent être contactés par téléphone, mail ou fax. Une adresse électronique générique cnrhantavirus@pasteur-cayenne.fr (automatiquement redirigée sur les boîtes mail des responsables) est également disponible.

Le laboratoire associé est également amené à effectuer des prestations de conseil auprès des professionnels de santé (cliniciens, biologistes, médecins généralistes ou public) essentiellement par courriel ou par téléphone aux heures ouvrées du laboratoire. Ces prestations sont exclusivement réalisées par le responsable ou le responsable adjoint du CNR. Dans le cadre du renforcement de la démarche qualité, ces prestations sont tracées via l'ouverture de fiches « Prestations de conseil ».

Activités de conseil aux professionnels de santé :

Le laboratoire coordonnateur a enregistré 10 prestations de conseil par téléphone, email ou courrier :

- il a été sollicité en pré-analytique par des médecins pour savoir si une suspicion d'infection par un hantavirus pour un patient et une demande d'examen étaient justifiées (n=4), la conduite à tenir suite à une exposition à des rongeurs (morsures, manipulation) (n=2). Les sollicitations reçues pour préciser les conditions pré-analytiques des demandes d'examens ne sont pas comptabilisées : il est proposé systématiquement de consulter nos recommandations en ligne sur le site Web du CNR.
- 4 sollicitations post-analytiques de médecins nous ont amenés à commenter des comptes rendus de résultats d'examens (choix des antigènes, cinétique virale et des anticorps, autre étiologie possible).

Le laboratoire associé a enregistré 2 prestations de conseil. La première prestation concernait une demande d'information par l'ARS faisant suite à l'identification du quatrième cas en 2022. A l'issue de cette réunion, il a été décidé de réaliser une enquête de séroprévalence autour des cas de 2022 en ciblant les quartiers autour du premier, troisième et quatrième cas (populations plus importantes). Par la suite, nous avons été sollicités par la Croix Rouge afin de réaliser une présentation sur les hantavirus et leurs réservoirs à destination des médiateurs sociaux en charge de maraudes dans les quartiers ciblés pour expliquer l'enquête de séroprévalence hantavirus.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Participation à la révision de 14 fiches « Orthohantavirus » de la base de données Baobab (Base d'OBservation des Agents Biologiques) géré par le pôle Biologique du département Expertise et Conseil Technique de l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) (<https://www.inrs.fr/publications/bdd/baobab.html>).

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

- Participation au groupe d'échanges entre acteurs nationaux (Direction Générale de la Santé, Caisse Centrale de la Mutualité Sociale Agricole, Santé publique France), et régionaux sur les hantavirus coordonné par l'ARS Bourgogne Franche Comté : révision de la plaquette informative

sur l'hantavirus Puumala et la prévention d'infection (<https://www.pasteur.fr/fr/file/44209/download>)

- Echanges avec les journalistes Cécile Blaize et Laure Marescaux pour la rédaction du numéro hors-série N°218 du journal 60 Millions de consommateurs : Punaises, souris, cafards, mites, ... : comment s'en débarrasser (https://bibliotheque.60millions-mag.com/detail/publication/detail-top-right/666?issue_id=134301).
- Il y a eu des questions émanant de deux particuliers portant sur la conduite à tenir en cas d'infestation du logement par des rongeurs et d'exposition à ces rongeurs ou leurs déjections et d'un particulier portant sur la conduite à tenir en cas de consommation de fruits souillés par des déjections de rongeurs.
- Participation à l'émission de radio Fo zot Savé Guyane la première le 05 Mars 2022 sur les émergences virales. (<https://la1ere.francetvinfo.fr/guyane/programme-audio/fo-zot-save-66bb3975-44dd-4dc9-b46a-042cafdc934e/>).

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

6.1 Activités de recherche en lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1 PHRC-N HANTADIAG (labo. coordonnateur)

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 puis par le Dr. JM Galempoix 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, Dijon, Nancy, et 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 éthiques et réglementaires et le respect des bonnes pratiques de recherche clinique.

Un des 2 objectifs de l'étude consistait à étudier la détection moléculaire de PUUV dans le plasma et l'urine de patients hospitalisés dont l'infection aigue par un hantavirus était confirmée sérologiquement. Les résultats sont disponibles pour cet objectif du projet :

- la détection moléculaire de PUUV au cours de la maladie a été étudié dans le sérum ou plasma de patients en Suède et Slovénie où circulent des souches PUUV de lignées différentes de celle présente en France. L'usage de l'urine dans ce diagnostic a peu souvent été investigué. Nous avons donc étudié en France la détection de PUUV dans le plasma et l'urine d'une cohorte de patients hospitalisés.

- plasma et urine ont été prélevés quotidiennement chez des patients hospitalisés présentant un syndrome fébrile algique avec thrombocytopénie, évoluant d'au plus 8 jours et présentant des IgM et des IgG anti-PUUV dans leur sérum collecté à l'admission et/ou environ un mois après la sortie de l'hôpital. Les ARN ont été extraits des échantillons et l'ARN de PUUV a été détecté par RT-PCR en temps réel.

- soixante-sept patients présentaient une infection aigue par un hantavirus confirmé sérologiquement. A l'inclusion, l'ARN de PUUV a été détecté dans le plasma de 55 des 62 patients (88.7%) prélevés dans la première semaine d'évolution de la maladie, tandis qu'il n'était détecté dans l'urine que de 15 des 60 patients (25%) prélevés au même moment. Il a été ensuite détecté respectivement dans le plasma et l'urine de 33 (71,7%) et 2 (4,4%) des 46 patients prélevés à leur sortie de l'hôpital durant la 2^{ème} semaine d'évolution de la maladie. Quand l'ARN de PUUV a été détecté dans l'urine, il l'était dans le plasma et non vice versa.

- en conclusion, la détection de l'ARN de PUUV dans le plasma de patients hospitalisés en France est similaire à celle observée en Suède et en Slovénie. L'urine n'est pas un échantillon adapté à cette détection.

L'autre objectif du projet consiste à évaluer les performances des kits commerciaux sérologiques dans les conditions usuelles d'utilisation sur les échantillons des patients inclus dans l'étude. Les résultats devraient être disponibles en 2023 (*Travaux soumis pour publication*).

6.1.2 SMARTTIQ-PUUV (labo. coordonnateur)

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication:

Krug C, Rigaud E, **Siby-Diakite D**, Bénézet L, **Papadopoulos P**, de Valk H, Deffontaines G, Septfons A, **Reynes JM**. Seroprevalence of hantavirus in forestry workers, Northern France, 2019-2020. *Viruses*. 2023 Jan 25;15(2):338.

Astract

We aimed to estimate the seroprevalence of *Puumala orthohantavirus* (PUUV) among forestry workers in northern France, and to explore sociodemographic risk factors. We conducted a random cross-sectional seroprevalence survey among 1777 forestry workers in 2019-2020. The presence of immunoglobulin G against PUUV antigens in serum was assessed using enzyme-linked immunosorbent assay and confirmed using immunofluorescence assay. Poisson regression models were used to explore factors associated with seropositivity. Weighted seroprevalence was 5% (3-6) in northeastern France, 4% (2-6) in north central France, and 1% in two regions located in the center of the country (Auvergne and Limousin). There were no seropositive workers detected in northwestern France. Seropositivity was associated with age, sex, and cumulative seniority in the forestry sector. Seroprevalence was highest in known endemic areas of the northeast and lowest in the northwest. Nevertheless, we found serological evidence of PUUV infection in two regions located in the center of the country, suggesting circulation of the virus in these regions, previously thought to be non-endemic.

6.1.3 HANTAVIRUS et rats sauvages : projets ARMAGUEDON, Rat en Ville-Eurométropole de Strasbourg et RATVAR (labo. coordonnateur)

ARMAGUEDON est un projet de recherche financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projet (AAP) générique 2020, conduit par le Muséum National d'Histoire Naturelle, l'Institut Pasteur, VetAgroSup à Lyon et Sorbonne Université, en partenariat avec la ville de Paris. Il s'agit d'une étude intégrative inédite par son approche interdisciplinaire en génomique, écologie urbaine, éco-épidémiologique et sciences humaines. Sa vocation est d'aider à la gestion des rats de Paris et de développer une meilleure connaissance de la biodiversité urbaine. Initialement d'une durée de 30 mois (1^{er} mars 2021 – 31 août 2023), le projet a été prolongé d'une durée de 12 mois portant son échéance au 31 août 2024. Les objectifs sont 1/ d'étudier la population parisienne de rats bruns (biologie et génétique des populations), 2/ d'identifier pathogènes et vecteurs dans cette population en lien avec leur fond génétique et leur environnement, 3/ d'étudier la résistance aux rodenticides de ces rats et 4/ la perception des habitants sur la présence des rats dans les espaces urbains.

Plusieurs unités de l'Institut Pasteur sont impliqués dans le 2^{ème} objectif du projet, et en particulier 3 CNR rattachés à ces unités: le CNR de la leptospirose, le CNR de la peste et autres yersinioses, et le CNR des Hantavirus. La coordination du projet est assurée au sein de l'Institut Pasteur par Virginie Sauvage (cf Organigramme). Le CNR des Hantavirus sera impliqué dans la détection de l'hantavirus Seoul dans des échantillons de rats prélevés dans différents parcs et jardins de la ville de Paris, et dans la caractérisation moléculaire des souches détectées.

La première année du projet (2021) a été consacré l'obtention des autorisations administratives et réglementaires ainsi qu'à la collecte de prélèvements de rongeurs qui s'est poursuivie sur l'année 2022. Sur ces deux années, sept parcs ou jardins ont été sélectionnés [Jardin des plantes (5^{ème} arrondissement), parc des Buttes Chaumont (19^{ème}), parc zoologique de Paris (12^{ème}), parc Kellermann (13^{ème}), Square Saint-Médard (5^{ème}), Parvis de Notre Dame (4^{ème}) et Jardin

Atlantique (14^{ème}]) et des captures organisées sur chaque site entre mars et octobre de chaque année. Des échantillons de sang et d'excrétats ont été prélevés chez 36 rats qui ont été relâchés et les mêmes échantillons et des organes ont été prélevés chez 90 rats sacrifiés.

Le laboratoire coordonnateur est également impliqué dans deux autres projets de recherche qui visent à recenser les pathogènes à potentiel zoonotique portés par les rats (*Rattus norvegicus* et *Rattus rattus*) vivant en milieu urbain et ce afin de mieux appréhender les risques sanitaires pour l'homme. Il s'agit du projet « Rat en Ville-Eurométropole de Strasbourg » (collaboration avec l'IPHC de Strasbourg) qui s'intéresse aux rats vivant dans cette métropole et le projet RATVAR (AAP ANRS MIE EMERGEN 2021, 1er décembre 2021 - 30 Novembre 2023) aux rats d'une dizaine d'autres villes de France parmi lesquelles Lyon, Besançon, Bordeaux, Nantes, Marseille et Nancy. Comme pour le projet ARMAGUEDON, le CNR sera impliqué dans la détection de l'hantavirus Seoul dans les échantillons de rats prélevés et par la caractérisation moléculaire des souches détectées. En 2022, ce sont 45 rats qui ont été capturés et sacrifiés à Strasbourg et 65 dans le cadre du projet RATVAR. Pour tous ces animaux, des échantillons de sang, d'excrétats et des organes ont été prélevés.

Pour ces trois projets, la collecte d'échantillons sera poursuivie en 2023 et la recherche de l'Hantavirus Seoul sera initiée.

Ces trois études devraient permettre de mieux évaluer la circulation du virus Seoul et sa diversité génétique au sein des populations urbaines de rats en France métropolitaine.

6.1.4 Enquête de séroprévalence autour des cas Maripa (labo. associé)

Faisant suite à l'identification des quatre cas d'hantavirus en 2022, une enquête de séroprévalence a été initiée par l'ARS et SpF. Cette étude avait pour objectif d'estimer la séroprévalence des infections récentes et plus anciennes à hantavirus du Nouveau Monde autour de 3 des 4 cas confirmés d'infection par le virus Maripa détectés en 2022 en Guyane.

La recherche active de cas s'est déroulée dans une zone proche des lieux d'habitation de trois cas confirmés d'infection à hantavirus en 2022 (2 sites localisés à Macouria et un à Rémire-Montjoly). Les trois sites d'enquête incluaient le voisinage des cas confirmés. Des informations cliniques, comportementales, démographiques et relatives aux facteurs de risque collectifs et individuels d'exposition à l'hantavirus ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire standardisé. Cette collecte d'information a été accompagnée d'un prélèvement sanguin pour rechercher la présence des marqueurs sérologiques d'infection récente (IgM) et ancienne (IgG) de contamination à un hantavirus du Nouveau Monde.

Cette enquête s'est déroulée du 28 novembre au 16 décembre 2022. Au total, 274 personnes ont été incluses dans l'étude. 53% des participants étaient des femmes et 47% des hommes. L'âge médian était de 42 ans et 83% des participants étaient nés en Haïti. La quasi-totalité des participants était arrivée en Guyane et dans une des trois zones d'enquête avant 2022.

Parmi les participants, aucun n'a présenté de marqueurs spécifiques d'une infection récente (IgM) à hantavirus. Néanmoins, la présence d'IgG a été observée pour 14 d'entre eux soit 5% des participants. Aucune différence significative n'a été observée entre les ratios des IgG des personnes arrivées avant 2022 et celles arrivées courant 2022. Ce résultat laisse supposer que les personnes ne se sont pas majoritairement contaminées sur les sites d'enquête. Pour chaque site, il n'a pas été observé de regroupement des personnes portant un marqueur d'une infection ancienne à hantavirus et le lieu de résidence des cas confirmés diagnostiqués en 2022.

Concernant les activités/comportements individuels considérés à risque (profession, travaux de nettoyage dans locaux peu aérés, ménage à domicile, activités agricoles ou en forêt, utilisation de pièges ou de poison contre les rongeurs, contact avec des rongeurs vivants ou morts), aucune différence significative n'a été mise en évidence entre des personnes porteuses d'IgG contre les hantavirus et les autres personnes enquêtées. De plus, aucune différence significative n'est observée entre les personnes porteuses d'IgG contre les l'hantavirus et les autres personnes enquêtées pour ce qui concerne l'observation de rongeurs ou de traces d'urine ou de crottes de rongeurs que ce soit autour ou dans le domicile.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'il n'y a pas de circulation préférentielle d'hantavirus sur les zones étudiées et que l'augmentation du nombre de cas en 2022 pourrait refléter un meilleur diagnostic clinique. La dynamique des réservoirs potentiels du variant Maripa reste néanmoins à être approfondies.

6.2 Liste des publications et communications en lien direct avec les missions et activités du CNR

(i) Publications nationales

Reynes JM, Penalba C, Galempoix JM. Hantavirus. EMC - Maladies infectieuses 2022 : 1-12 [Article 8-063-B-10]

(ii) Publications internationales

Bermejo M, Mestrallet S, Servettaz A, Pannet LA, Lebrun D, N'Guyen Y, Androletti L, **Reynes JM**, Hentzien M, Bani-Sadr F. Eosinophilia during hantavirus infection: a cohort study. Infect Dis (Lond). 2022 Apr;54(4):277-282.

Brun A, Greusard M, **Reynes JM**, Grenier M, Bamoulid J, Giraudoux P, Lepiller Q, Chirouze C, Bouiller K, Bailly B. Description of an outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in the southern Jura Mountains, France, in 2021. Infect Dis Now. 2023 Jan 5;53(4):104639.

Krug C, Rigaud E, **Siby-Diakite D**, Bénézet L, **Papadopoulos P**, de Valk H, Deffontaines G, Septfons A, **Reynes JM**. Seroprevalence of hantavirus in forestry workers, Northern France, 2019-2020. Viruses. 2023 Jan 25;15(2):338.

Matheus S, Houcke S, Lontsi Ngoula GR, Lecaros P, Pujo JM, Higel N, Ba A, Cook F, Djahi P, Resiere D, Hommel D, **Lavergne A**, Kallel H. Emerging Maripa Hantavirus as a Potential Cause of a Severe Health Threat in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2023 Mar 13:tpmd220390.

(iii) Communications orales nationales

/

(iv) Communications orales internationales

/

(v) Conférence sur invitation:

/

NB : seules sont citées les communications réalisées en 2022 ; les travaux soumis pour publication ne font pas l'objet de citation).

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Il n'existe pas en matière d'hantavirus un laboratoire national de référence pour le volet animal de l'infection. Néanmoins, le laboratoire coordonnateur a établi des relations avec des laboratoires s'intéressant à la faune sauvage, et en particulier aux hôtes naturels d'agents zoonotiques comme les hantavirus :

1/ le laboratoire Systématique, Evolution, Biodiversité au Museum National d'Histoire Naturelle à Paris pour le projet ANR ARMAGUEDON,

2/ le département d'écologie, de physiologie et d'éthologie de l'Institut pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) à Strasbourg pour un projet d'évaluation du risque zoonotique du rat brun (*Rattus norvegicus*) sur l'Eurométropole de Strasbourg

3/ le laboratoire de référence de la rage et de la faune sauvage de l'ANSES à Nancy et l'unité rongeurs sauvages, risques sanitaires et gestion des populations de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (VetAgro Sup) pour le projet RATVAR (ANRS MIE EMERGEN) visant à étudier en priorité le risque d'émergence de réservoirs chez les rongeurs associés aux variants circulants et nouveaux du SRAS-CoV-2.

Le laboratoire associé travaille en collaboration avec le laboratoire des Interactions Virus-Hôtes de l'IPG qui étudie depuis de nombreuses années la circulation des hantavirus dans les réservoirs rongeurs sauvages en Guyane

8. Programme d'activité pour les années suivantes

8.1 Laboratoire coordonnateur

8.1.1 Activité d'expertise

- Confirmation de diagnostic

Tel que spécifié dans l'arrêté du 2 mars 2022 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles, « les CNR s'engagent à ne réaliser, que de façon exceptionnelle, des actes qui constituent des activités habituelles de diagnostic des laboratoires d'analyse de biologie médicale (identification de souches courantes et diagnostics sérologiques), quand ces techniques ne sont pas facilement accessibles aux laboratoires de biologie médicale; dans tous les cas, les analyses pratiquées par les CNR donnent lieu à facturation auprès du laboratoire de biologie médicale qui lui a transmis l'échantillon à analyser ».

Par conséquent, depuis le 1er janvier 2023, le CNR des HANTAVIRUS traite les échantillons reçus de laboratoires ayant déjà effectué ce diagnostic et ce, à titre d'expertise (confirmation de diagnostic, identification et caractérisation de souches d'hantavirus) et n'effectue plus qu'exceptionnellement du diagnostic de laboratoire d'une hantavirose en première intention (demande expresse de diagnostic moléculaire lors de circonstances exceptionnelles / patient immuno-déprimé en particulier).

- Acquisition de nouvelles techniques et nouveaux réactifs

Nous projetons de mettre en place une technique de détection moléculaire du virus Seoul par RT-PCR en temps réel (*Kramski M et al. Clinical Chemistry 2007*). Cette technique serait disponible pour nos activités de diagnostic mais également pour les projets de recherche ANR 2020 ARMAGUEDON, « Rat en Ville-Eurométropole de Strasbourg » et le projet ANRS MIE EMERGEN 2021 RATVAR (cf. § 8.1.3). Un dossier de validation de méthode est toujours en cours.

- Caractérisation moléculaire de souches

Le laboratoire coordonnateur poursuivra sa mise au point de systèmes d'amplification conventionnelle permettant d'obtenir les séquences des segment S mais également M des souches de virus Puumala circulantes en France et de les caractériser phylogénétiquement.

- Technique AmpliSeq : PCR multiplex et séquençage NGS

Le laboratoire coordonnateur poursuivra le développement de techniques de PCR Multiplex associées au séquençage haut débit pour l'acquisition des génomes complets (séquences codantes des segments S, M et L) des virus Puumala et Seoul, afin de mieux décrire l'épidémiologie moléculaire des souches. Cependant, le NGS ne devrait pas être utilisé à court terme; les charges virales détectées dans la grande majorité des prélèvements humains que nous recevons étant très faibles, il nous faut développer une stratégie d'enrichissement.

- Evaluation des performances analytiques de deux trousse commerciales pour la détection moléculaire d'Hantavirus zoonotiques de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde.

Une évaluation indépendante des performances analytiques de deux kits de détection moléculaire récemment mis sur le marché par la société Altona Diagnostics, les kits RealStar® Hantavirus-HFRS RT-PCR (détection et différenciation des virus DOBV, PUUV, HTNV et SEOV) et

RealStar® Hantavirus-HPS RT-PCR (détection sans différentiation d'Hantavirus du Nouveau Monde), sera réalisée sur le deuxième semestre de l'année 2023. Ces deux kits PCR (au format RUO pour le moment) sont à ce jour les seuls sur le marché.

8.1.2 Activité de surveillance

La procédure d'organisation de la surveillance telle que suivie en 2022 sera reconduite au moins en 2023.

8.1.3 Activité de recherche

- PHRC-N HANTADIAG

Le programme sera achevé en 2023 avec l'évaluation des performances des kits commerciaux sérologiques dans les conditions usuelles d'utilisation sur les échantillons des patients inclus dans l'étude.

- ANR 2020 ARMAGUEDON, « Rat en Ville-Eurométropole de Strasbourg » et ANRS MIE EMERGEN 2021 RATVAR

Pour ces trois projets, la collecte d'échantillons sera poursuivie en 2023 et la recherche de l'Hantavirus Seoul sera initiée et les souches détectées, séquencées. Ces trois études devraient permettre de mieux évaluer la circulation du virus Seoul et sa diversité génétique au sein des populations urbaines de rats en France métropolitaine.

- Caractérisation moléculaire de souches du virus Seoul chez le rat brun sauvage, *Rattus norvegicus*, en Afrique

Récemment, la mise en place d'une PCR Multiplex pour acquérir les segments S, M et L par séquençage haut débit des souches du virus Seoul circulant en Europe, Asie du Sud et Afrique (souches du groupe B) a permis d'obtenir sur des prélèvements de rongeur (Ct<32) capturés au Cambodge des génomes complets ou quasi complets du virus (segment S et M complets et segment L partiel). Le laboratoire coordinateur a été sollicité par Guillaume Castel du centre de biologie pour la gestion des populations (CBGP-INRAE) à Montpellier, qui travaille sur les séquences d'hantavirus associés aux rongeurs, pour effectuer le séquençage de souches du virus Seoul détectés chez *Rattus norvegicus* en Afrique et plus précisément au Mali. A ce jour, l'épidémiologie moléculaire du virus SEOV en Afrique est très mal documentée voire quasi inexistante.

8.2 Laboratoire associé

8.1.4 Activité d'expertise et de surveillance

Dans le contexte d'acquisition de nouvelles techniques et nouveaux réactifs, le laboratoire associé poursuivra en 2023-2024 la mise en place et l'analyse de la technique de sérologie IgM et IgG Ancien Monde (Euroimmun Pool 1 Eurasia IgG et IgM) qui à l'heure actuelle n'a été réalisée que dans le cadre d'une enquête globale de séroprévalence et seulement dans le cadre de la recherche d'IgG. Elle devra être comparée à la technique Euroimmun Mosaic 1 IF IgG afin de confirmer les résultats obtenus (spécificité). Dans un second temps, elle pourra être mise en place pour le diagnostic des hantavirus de l'Ancien Monde.

8.1.5 Activité de recherche

En Guyane, la circulation d'hantavirus avait été établie sur la base d'une séroprévalence d'IgG spécifique d'hantavirus de 1,42 % (6/420) chez des patients ayant présenté des signes compatibles avec un syndrome pulmonaire à hantavirus (HPS) lors d'une étude sérologique

rétrospective. Cette prévalence était plus faible que celle observée au Brésil qui varie de 2% à 13% selon les périodes et les environnements analysés. Depuis, 11 cas humain d'infection à l'hantavirus Maripa ont été décrits. Les lieux de contamination probables des différents cas sont localisés sur la bande côtière dans trois communes (Rémire-Montjoly, commune attenante à Cayenne, Macouria et Iracoubo).

Afin d'évaluer, en population générale, la séroprévalence d'IgG des hantavirus du Nouveau Monde dans le département, une étude, débutée en 2020, a été mise en œuvre à partir de prélèvements biologiques issus de plus de 2400 patients répartis sur l'ensemble du territoire guyanais (collectés dans le cadre d'un projet EPI-ARBO porté par l'Unité d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de la Guyane).

Les résultats obtenus montrent une séroprévalence globale en IgG de 3,56 % pour les hantavirus du Nouveau Monde en Guyane. Celle-ci semble plus importante que celle décrites en 2008 lors de l'enquête rétrospective. Elle semble également plus importante dans les communes de l'intérieur du département et le long des fleuves frontières en comparaison de la séroprévalence observée sur la zone littorale. Ces résultats restent à être confirmés et analysés au regard des informations épidémiologiques (sexe, âge, nombre d'années de présence en Guyane).

En parallèle, une étude de séroprévalence globale en IgG des hantavirus de l'Ancien Monde a également été réalisée sur les mêmes échantillons biologiques. Cette étude a été réalisée à l'aide du kit ELISA anti-Hantavirus Pool IgG EUROIMMUN. Ils restent cependant à être confirmés par immunofluorescence. Les résultats permettront de voir si ces hantavirus hébergés par des rongeurs commensaux (rat) circulent en Guyane.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Par arrêté du 7 mars 2017 modifié par l'arrêté du 12 décembre 2019, le CNR des Hantavirus pour la période allant du 1er avril 2017 au 31 mars 2022 a été placé sous la responsabilité de l'unité de Biologie des Infections Virales Emergentes (UBIVE) de l'Institut Pasteur à Lyon (laboratoire coordonnateur) puis de l'unité Environnement et Risques Infectieux (ERI) de l'Institut Pasteur à Paris et du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (laboratoire associé). Les mandats des CNR ont fait l'objet d'une prolongation jusqu'au 31/12/2022 (arrêté publié le 17 mai 2021). Les missions du CNR telles que définies dans l'appel à candidature de Santé publique France (SpF) en juin 2016 sont :

a). Apporter une expertise :

- en participant au développement, à l'évaluation et à la diffusion 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) ;
- aux laboratoires de biologie de ville et hospitaliers pour le diagnostic des hantaviroses (confirmation de diagnostic, identification de virus, séquençage) ;
- en développant des collaborations avec des laboratoires étrangers, notamment au niveau européen.

b). Apporter un conseil :

- aux professionnels de santé ;
- auprès de l'agence nationale de santé Publique, des autres agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité de Santé (HAS) et du ministère chargé de la santé ;
- en participant à l'élaboration de mesures de prévention et de contrôle des hantaviroses ;
- en répondant aux demandes d'expertise ou à des enquêtes.

c). Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique :

- 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.

d). Contribuer à l'alerte :

- en signalant à l'agence nationale de santé publique 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, identification d'une exposition particulière (NAC, etc.), 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 SpF, à la Cellule de SpF en région Antilles-Guyane (Cire) et aux Agences Régionales de Santé (ARS) concernées, l'identification de tout nouveau cas humain ou phénomène anormal.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

- **Laboratoire coordonnateur**

Cinq personnes sont régulièrement impliquées dans les activités du CNR des Hantavirus : le responsable du laboratoire coordonnateur et le responsable-adjoint, une technicienne (suppléée par 2 autres techniciens de l'unité ERI), et enfin l'assistante de l'unité ERI (Tableau 13). Le responsable adjoint de l'unité ERI, Christophe Batejat, est également correspondant Qualité du CNR des Hantavirus.

Tableau 13 : Personnes impliquées dans les activités du laboratoire coordonnateur du CNR des Hantavirus (au 31/12/2022).

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Hantavirus
REYNES	Jean-Marc	Responsable	DVM, PhD	IP Paris (CDI)	0,85
MANUGUERRA	Jean-Claude	Resp. adjoint	DVM, PhD	IP Paris (CDI)	0,15
SIBY-DIAKITE	Dieynaba	Technicienne	Technicienne	IP Paris (CDI)	0,85
GUY	Charlotte	Assistante	Assistante polyvalente	IP Paris (CDI)	0,3
BATEJAT	Christophe	Correspondant Qualité	Ingénieur	IP Paris (CDI)	0,1
Suppléance					
FEHER	Maxence	Technicien	Technicien	IP Paris (CDI)	0,08
HOINARD	Damien	Technicien	Technicien	IP Paris (CDI)	0,07

Cette équipe a reçu l'appui en 2022 pour les activités de recherche de 2 chercheurs (Virginie Sauvage et Miriam Ermonval) et d'un ingénieur de recherche (cf organigramme).

- **Laboratoire associé**

Trois membres du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane, deux virologues et une technicienne, sont impliqués dans les activités du laboratoire associé (Tableau 14). En cas d'absence de la virologue responsable, la suppléance est assurée par la responsable du laboratoire de virologie.

Tableau 14 : Personnes impliquées dans les activités du laboratoire associé du CNR des Hantavirus (au 31/12/2022).

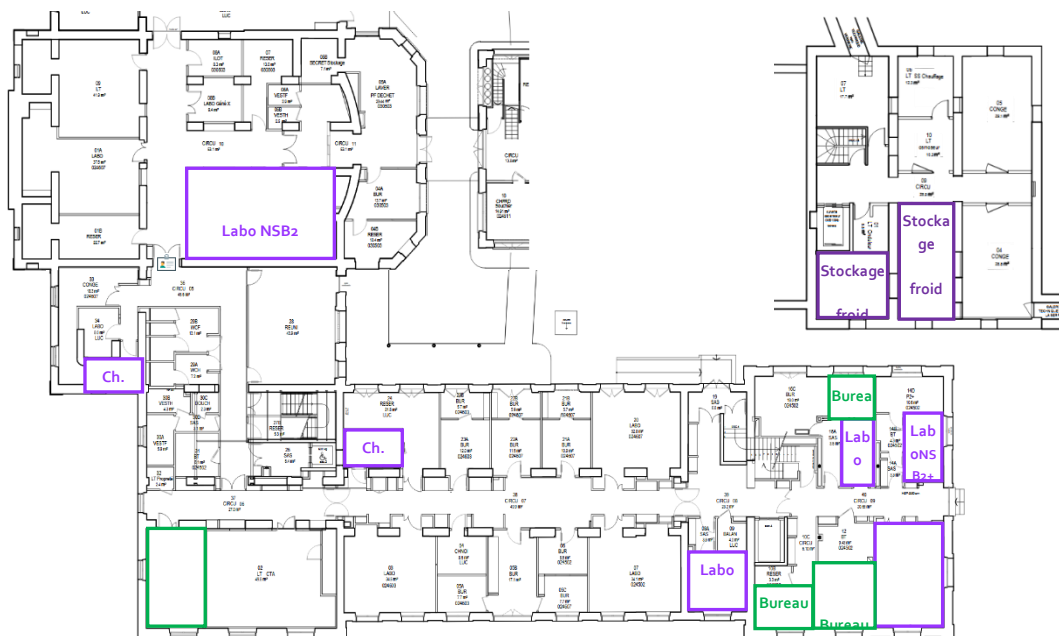
Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Hantavirus
LAVERGNE	Anne	Responsable labo associé	PhD, HDR	IP, Paris (CDI)	0,1
BREMAND	Laetitia	Technicienne	BTS	IP, Guyane (CDI)	0,2
ROUSSET	Dominique	Responsable de laboratoire de Virologie	MD, PhD	IP, Paris (CDI)	0.01

1.3 Locaux et équipements

- **Laboratoire coordonnateur**

Le laboratoire coordonnateur utilise une partie des locaux de l'unité ERI (Figure 8). Les locaux utilisés (58 m2 de bureau, 70 m2 de laboratoire et 47 m2 de pièces « froides ») sont des locaux partagés avec les autres équipes de l'unité. Ils sont situés au rez-de-chaussée du bâtiment Duclaux, dans sa partie centrale (01-RB) et son aile Fourneau (03-RB), et au sous-sol de l'aile Fourneau (03-S).

Figure 8 : Plan des locaux utilisés par le laboratoire coordonnateur.



Pièce 01-RB-02 : laboratoire NSB2 dédié exclusivement aux manipulations pré-PCR dans la cadre du diagnostic et composé de différentes pièces correspondant aux différentes étapes (pièce « extraction » équipée de 2 PSM de type 2, de 2 automates d'extraction Kingfisher, de 2 réfrigérateurs, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 2 micro-centrifugeuses, d'un agitateur ThermoMixer, d'un bain-marie ; pièce « préparation de Mix » équipée de 3 hottes à PCR, d'un

congélateur -20°C, d'un réfrigérateur, et d'une micro-centrifugeuse ; pièce « dépôt des témoins équipée d'un PSM de type 2 et de 2 bains à sec).

Pièce 03-RB-01 : bureau responsable et technicienne CNR (+ 6 autres postes de travail unité ERI).

Pièce 03-RB-08 : laboratoire NSB2+ partagé dédié d'un côté à la culture cellulaire et de l'autre au conditionnement d'échantillons primaires ; équipé de 2 PSM de type 2, d'1 incubateur à CO₂, d'1 microscope inversé, d'1 compteur automatique de cellules, d'1 centrifugeuse réfrigérée, d'1 bain-marie, d'1 réfrigérateur et d'1 congélateur.

Pièce 03-RB-10A : bureau responsable adjoint (responsable de l'unité ERI).

Pièce 03-RB-11 : bureau assistante + 2 techniciens suppléants (+ 3 autres postes de travail unité ERI)

Pièce 03-RB-13 : pièce de biologie moléculaire partagée contenant 1 thermocycleur temps-réel, 3 thermocycleurs classiques. 1 réfrigérateur, 1 sorbonne, matériels d'électrophorèse et 1 imageur

Pièce 03-RB-14C : laboratoire NSB2+ partagé dédié aux examens sérologiques et à la culture virale, équipé de 2 PSM de type 2, de 2 incubateurs à CO₂, d'1 centrifugeuse réfrigérée, de microcentrifugeuse, d'1 microscope inversé, d'1 bain-marie, d'1 laveur de plaque, d'1 sonicateur, d'1 broyeur de tissus, d'1 analyseur en temps réel de culture cellulaire xCELLigence 16 puits, d'1 congélateur -20°C sous paillasse, et de 2 réfrigérateurs.

Pièce 03-RB-15 : pièce noire partagée équipée d'1 lecteur de plaque, 1 laveur de plaque, 2 système Luminex Magpix, et Bioplex 200 (Bio-Rad) et 1 réfrigérateur.

Pièce 03-RB-16B : bureau partagé correspondant qualité, responsable adjoint de l'unité ERI (+ 1 autre poste de travail unité ERI).

Pièce 03-RB-25 : chambre froide partagée +2-+8°C

Pièce 03-RB-35 : chambre noire partagée équipée d'1 microscope droit à fluorescence.

Pièce 03-S1-02 : pièce de stockage des congélateurs -80°C dont 1 dédié au laboratoire coordonnateur et 1 partagé

Pièce 03-S1-03: pièce de stockage de congélateurs dont 1 congélateur -20°C dédié au laboratoire coordonnateur

Le laboratoire coordonnateur partage également l'utilisation du laboratoire NSB3 26-S2-03 situé au 2^{ème} sous-sol du bâtiment François Jacob. Le recours au laboratoire NSB3 se fait dans le cadre de manipulation des hantavirus appartenant au groupe à risque 3 (virus Seoul et Hantaan par exemple manipulés lors de la préparation de stock viral, des antigènes, etc.). Il est équipé d'1 PSM de type 3, de 4 PSM de type 2, de 4 agitateurs vortex, de 2 agitateurs tridimensionnels, d'1 agitateur magnétique chauffant, d'1 ultracentrifugeuse de paillasse, d'1 centrifugeuse réfrigérée, de 3 congélateurs -80°C, d'1 congélateur -20°C, d'1 réfrigérateur, de 5 incubateurs, d'1 sonicateur, de 2 broyeurs de tissus, de 2 microscopes inversés, d'un microscope droit, de 2 bains à sec, et d'1 bain-marie.

- **Laboratoire associé**

Le laboratoire de virologie de l'IP Guyane dispose actuellement d'une superficie globale de 310 m² répartie entre bureaux et laboratoires (Figure 9).

- un laboratoire (pièce 248) où sont réalisés la réception et l'aliquotage des échantillons (35 m²). Ce local est équipé d'un PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, d'un automate Evolis, d'un bain-

marie, d'un incubateur, d'agitateurs magnétiques, d'un pH-mètre, d'une balance de précision, d'un congélateur -20°C, d'un laveur de plaques, d'un lecteur de plaques, d'un réfrigérateur, d'une machine à glace et d'une hotte chimique.

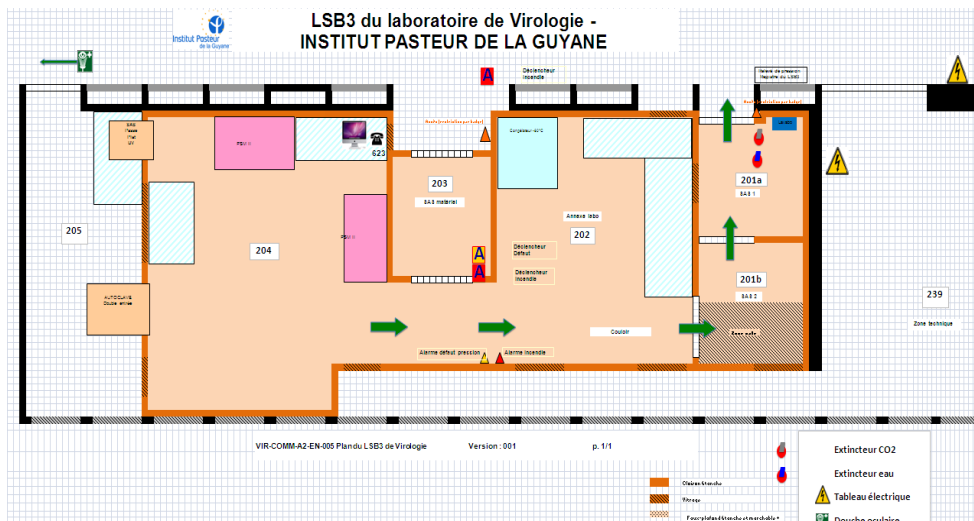
- un laboratoire LSB2 (pièces 247 et 246) dédié à l'entretien des cultures cellulaires, et à l'isolement des virus de classe 2 (25 m²). Ce laboratoire est équipé de deux PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 3 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO₂) et d'un microscope inversé.
- un laboratoire dédié aux activités de biologie moléculaire de 20 m² comprenant une pièce pour la préparation des mix réactionnels (pièce 244b) et une pièce pour l'extraction des ARN (pièce 244). Cet espace est équipé d'un PSM pour la préparation des mix, d'une centrifugeuse réfrigérée haute vitesse, de trois micro-centrifugeuses, de deux congélateurs -20°C, de deux réfrigérateurs, d'une hotte UV utilisée pour le dépôt des ARN et de deux blocs chauffants.

Figure 9 : Plan général du laboratoire de virologie (Institut Pasteur de la Guyane)



- Un laboratoire LSB3 de 70 m² (pour isolement et amplification virale des agents de classe 3, ainsi que pour les préparations d'antigènes. Il est équipé de deux PSM type II, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 2 incubateurs (28°C, et 37°C atmosphère 5% CO₂), d'un microscope inversé, un congélateur -80°C, un ordinateur et un autoclave double-entrée (Figure 11).

Figure 11 : Plan du laboratoire NSB3 du laboratoire de virologie (Institut Pasteur de la Guyane)



Le laboratoire partage également avec l'ensemble des équipes de l'Institut, une plateforme technique de biologie moléculaire. Le laboratoire y dispose de deux thermocycleurs (GeneAmp 9700 Applied Biosystems), de quatre thermocycleurs de PCR en temps réel (1 Applied Biosystems ABI7300, 1 StepOnePlus® et 2 Roche LC480) et d'une hotte PCR située dans une pièce spécifique, dédiée à la préparation des PCR nichées. Plusieurs générateurs et cuves d'électrophorèse horizontales ainsi qu'une station de capture d'image sont également mutualisés entre différents laboratoires de l'IPG.

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

1.4 Collections de matériel biologique

Souches, antigènes, immuns-sérums de référence

- **Laboratoire coordonnateur**

Il dispose des souches suivantes :

Virus Dobrava-Belgrade souche DOB EO 7/7

Virus Hantaan souches 76-118 et Sapporo VP5

Virus Nova Te34 (sous accord de transfert de matériel)

Virus Prospect Hill PH 569/7

Virus Puumala Montbliart-1-2008

Virus Seoul souches Girard Point, Urban rat, Tchoupitoulas, GB-B 552/5

Virus Seoul souche Mantenay-Montlin/Rn/FRA/2015/2015.00179/liver (isolement 2015 du CNR)

Virus Thailand souches 605 et 749

Virus Tula souche Moravia (sous accord de transfert de matériel)

Il dispose également :

- de protéines recombinantes (N) pour le virus Puumala et Sin Nombre (cette dernière fournie par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA) ;

- des antigènes produits à partir de cellules infectées pour les virus Hantaan, Nova, Puumala, Seoul, Thailand, Tula, Sin Nombre, et Laguna Negra. Ceux des deux derniers virus cités et ceux du virus Seoul destinés au test ELISA IgG ont été fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA.

Il dispose enfin :

- de polyclonaux non purifiés produits sur lapins et dirigés contre tout ou partie des protéines des virus Thailand, Nova, Tula, Puumala, Laguna Negra, et Seoul (les trois derniers fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA).

- d'ascites polyclonales de souris contre les virus Hantaan (production CNR), et Sin Nombre (production CDC).

- de divers ARN de synthèse utilisés comme témoins positifs dans les techniques de diagnostic moléculaire.

- **Laboratoire associé**

Il dispose pour la réalisation de tests diagnostiques de première intention d'antigènes, de protéines recombinantes et d'ascites fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA :

- antigène inactivé Sin Nombre sous forme de lysats de cellules infectées;
- protéine recombinante (nucléocapside) du virus Sin Nombre (428 AA) ;
- ascite de souris anti-virus Sin-Nombre.

Conditions de stockage

- **Laboratoire coordonnateur**

Les souches sont conservées à -80°C à l'ERI (03-S1-02) ou dans le laboratoire NSB3. L'ERI détient les autorisations d'acquisition, de détention et de mise en œuvre délivrées par l'ANSM pour le matériel génétique et les micro-organismes classés MOT. L'accès aux pièces contenant ces congélateurs se fait par badge personnel et au contenu des congélateurs via un autre badge personnel ou dédié. Le dernier transfert de souches depuis le site lyonnais a été effectué le 25/11/2022.

Les prélèvements trouvés positifs par les différentes techniques, les éventuels isolats et les réactifs sont stockés, soit à -20°C (03-S1-03) soit à -80°C (03-S1-02) au sein de l'ERI ou dans le laboratoire NSB3, la localisation de ce matériel biologique dépendant du groupe à risque du virus et de la présence ou non d'un MOT.

- **Laboratoire associé**

Le virus Maripa ayant vu son statut taxonomique révisé en 2017 par l'ICTV (reclassifié variant du virus Laguna Negra), il est donc considéré comme MOT.

Suite à ce changement de statut et ne disposant pas des autorisations de détention et de mise en œuvre pour le virus Laguna Negra, le laboratoire associé a cédé l'ensemble des échantillons diagnostiqués positifs en IgM et PCR au laboratoire coordonnateur détenteur des dites autorisations pour le virus Laguna Negra. A l'heure actuelle, dans le cas particulier de détection dans un prélèvement biologique de la présence d'un MOT pour lequel l'IPG ne dispose pas d'une autorisation de détention (ex : RT-PCR temps réel positive pour le virus Maripa et séquençage de confirmation), le prélèvement (et tous les aliquots correspondants) fera l'objet d'une cession au laboratoire coordonnateur à Paris ou à défaut d'une destruction et ce, dans un délai de 30 jours maximum. Dans l'attente de l'envoi vers un laboratoire disposant d'une autorisation de détention et de mise en œuvre, les échantillons seront placés dans un biotainer fermé dans un congélateur -80°C fermé par cadenas à code.

Anne Lavergne (responsable du CNR hantavirus-LA) détient les autorisations de détention et de mise en œuvre délivrées par l'ANSM pour le virus Sin Nombre. Les réactifs (lysats de cellules infectées par SNV et inactivées) nécessaires à la réalisation de la sérologie IgM sont stockés à -20°C au sein du laboratoire. Ce congélateur est verrouillé en permanence et est entreposé dans un espace à accès restreint au personnel du laboratoire. Un système de surveillance de température permet un enregistrement continu et des reports d'alarme.

Conditions de mise à disposition de ces collections

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière d'hantavirus en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à

noter que la collection CNR est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNR Hantavirus fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2022. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, qui apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation

est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle pour maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

Le laboratoire coordonnateur du CNR Hantavirus est inscrit à un programme de contrôle de qualité externe en matière de sérologie virus Puumala depuis octobre 2013 (société Labquality en Finlande). Quatre lots de 3 sérums ont été reçus en 2022. Les résultats de détection des IgG anti-hantavirus ont été concordants avec ceux attendus dans 10 fois sur 12 (discordance : 1 résultat limite pour 1 résultat négatif attendu, sans incidence sur l'interprétation clinique finale du dossier et un résultat positif pour un résultat négatif avec une incidence sur l'interprétation clinique finale), ceux de détection des IgM anti-hantavirus dans 11 fois sur 12 (un résultat positif pour un résultat négatif avec une incidence sur l'interprétation clinique finale).

Le laboratoire coordonnateur n'a pas pu organiser en 2022 un essai inter-laboratoire avec le centre national de référence des Hantavirus belge faute de réponse de notre correspondant dans les temps.

L'année qualité 2022 du CNR s'est organisée comme suit:

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	Du 27 au 29 juin 2022 et du 6 au 9 juillet 2023
Revue qualité	25/04/2022
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	23/06/2023
Audits internes qualité et technique	09/11/2022 et 10/02/2023
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	/

Malgré le contexte sanitaire, Le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en octobre 2020 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour le maintien et la continuité des missions du CNR.

Perspectives 2023 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	mars - juin 2023
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2023
Revue de direction LRE-MS	4 juillet 2023
Audi de surveillance COFRAC	Novembre-décembre 2023

La prochaine évaluation par le COFRAC est prévue pour novembre ou décembre 2023.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

- **Laboratoire coordonnateur :**

- *Isolement viral :*

Il est effectué à partir des souches virales de référence, d'isolats ou d'échantillons biologiques sur la lignée cellulaire Vero E6 ou RK13. Les manipulations se déroulent en laboratoire NSB2 (virus Puumala par exemple) ou laboratoire NSB3 (virus Seoul par exemple). L'identification s'effectue par immunofluorescence ou par technique moléculaire. Les isolats obtenus sur cultures cellulaires peuvent être titrés (révélation des foyers infectieux par immunomarquage).

- *Sérologie :*

Trois techniques sont actuellement utilisées dans le cadre des activités de diagnostic du CNR :

+ ELISA pour la détection des IgM et IgG anti-hantavirus en utilisant des antigènes (Ag) produits à partir de cellules infectées et des immuno-ascites de souris, ou des sérums immuns de hamster, lapin, etc. produits par le CNR. Cette technique est disponible en routine pour rechercher des IgM et IgG anti-virus Puumala, Seoul, Thailand, Laguna Negra et Sin Nombre. Certains réactifs sont fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA, la souche virale n'étant pas disponible (virus Laguna Negra et Sin Nombre) ou ne pouvant pas être produite actuellement (sérum ou ascite hyper-immuns).

+ Immunofluorescence sur cellules Vero E6 infectées par une souche de référence pour la détection des Ig anti-hantavirus. Cette technique est disponible en routine pour rechercher des anticorps anti-virus Puumala ou Thailand, représentatif des hantavirus zoonotiques de l'Ancien-Monde.

Les hantavirus zoonotiques ont pour réservoir des rongeurs de la sous-famille des Arvicolinae, des Neotominae et des Sigmodontinae (famille des *Cricetidae*) et de la sous-famille des Murinae (famille des *Muridae*). Il existe des relations antigéniques très fortes parmi les hantavirus associés à des rongeurs de la même-sous-famille. En conséquence, une technique sérologique utilisant des antigènes d'un hantavirus A hébergé par une espèce de rongeur permet de détecter des anticorps induits par un autre hantavirus B associé à une autre espèce de rongeur de la même sous famille (et à un titre similaire à celui obtenu avec les antigènes du virus B). Il existe également des réponses sérologiques croisées "inter sous-familles" et même "inter-famille" mais les titres seront plus faibles avec l'antigène hétérologue et au final une perte de sensibilité de la technique sera observée plus les virus sont éloignés.

- *Détection de l'ARN viral :*

Elle est effectuée par RT-PCR nichée conventionnelle et par RT-PCR en temps réel. Les techniques disponibles pour les activités de diagnostic sont les suivantes :

- RT-PCR temps réel segment S virus Puumala (*Kramski M et al. Clinical Chemistry 2007*),
- RT-PCR nichée segment S des virus associés aux rongeurs de la sous-famille des Arvicolinae (*Bowen MD et al. J Med Virol, 1997, Tatjana Avšič-Županc, pers. comm.*),

- RT-PCR nichée segment L pour les hantavirus connus jusqu'à présent et associés aux ordres Chiroptera, Rodentia, et Eulipotyphla (*Klempa B et al. Emerg Infect Dis, 2006*).

Le laboratoire coordonnateur dispose de **l'accréditation COFRAC pour les trois techniques de détection moléculaire** dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie – Sous-famille Virologie spécialisée (VIROH) code BM VB01 et pour **les trois techniques sérologiques** dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous-domaine Microbiologie – Sous-famille Microbiologie générale (MICROBIOBM) code BM MG01. L'ensemble des examens de diagnostic sont actuellement effectués sous accréditation.

L'identification des espèces/sous-espèces virales est effectuée par analyse de séquences partielles obtenues des produits amplifiés lors des RT-PCR nichées conventionnelles. Le séquençage de type Sanger est effectué par le Pôle de Génotypage des Pathogènes dirigé par Valérie Caro au sein de l'unité ERI (résultat disponible au plus tard dans les 3 jours ouvrables).

- **Laboratoire associé :**

Il dispose d'outils sérologiques et moléculaires permettant le diagnostic de première intention des hantavirus du Nouveau Monde. Des techniques sérologiques permettent de détecter des IgM anti-hantavirus par MAC-ELISA et des IgG anti-hantavirus par ELISA indirect (Tableau 15). Les antigènes Sin Nombre et les protéines recombinantes utilisées lors de la réalisation de ces tests sérologiques ont été fournis par la Special Pathogens Branch du CDC à Atlanta, USA.

La recherche de génome viral (ARN) dans un prélèvement précoce se fait RT-PCR temps réel pour la recherche spécifique du virus Maripa (Matheus et al. 2018). Le laboratoire dispose également d'une RT-PCR nichée conventionnelle pour la recherche d'hantavirus du Nouveau Monde (Johnson AM et al. Virology 1997). Pour les deux techniques de PCR, nous disposons d'un témoin positif (plasmide contenant les amorces et sonde de RT-PCR temps réel et les amorces de RT-PCR nichée conventionnelle).

Tableau 15: Liste des techniques validées et mises en œuvre par le laboratoire associé

Genre	Virus	Sérologie	Sérologie	Biologie moléculaire	
		(Homme)	(Rongeur)*	RT-PCR	RT-PCR classique
		ELISA (IgM/IgG)	ELISA (IgG)	temps réel	
<i>Hantavirus</i>	Sin Nombre	■	■	-	■
	Maripa	-	-	■	■

* Technique utilisée dans le cadre des activités de recherche visant à identifier le réservoir rongeur des hantavirus en Guyane.

Le laboratoire associé dispose de **l'accréditation COFRAC pour la technique d'amplification RT-PCR temps réel pour la recherche spécifique du virus Maripa** (Matheus et al. 2018) dans la ligne de portée Domaine Biologie Médicale – Sous domaine Microbiologie – Sous-famille Virologie spécialisée (VIROH) code BM VB01.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Les techniques utilisées par le laboratoire coordonnateur ou le laboratoire associé sont recommandées.

Les techniques de sérologie commercialisées sont en cours d'évaluation par le laboratoire coordonnateur. Il n'y a pas encore de technique de diagnostic moléculaire avec marquages CE et IVD commercialisée.