

AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 12 Janvier 2012

Par NOUGAIREDE Antoine

Né le 21 Février 1981 à Villeneuve Saint Georges

Pour obtenir le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
Spécialité : Maladies transmissibles et pathologies tropicales

**Pandémie grippale A/H1N1 2009/2010 : Diagnostic et épidémiologie au
laboratoire hospitalier de microbiologie clinique à Marseille.**

Membres du Jury de la Thèse :

Madame le Professeur Astrid VABRET

Rapporteur

Monsieur le Professeur Laurent ANDREOLETTI

Rapporteur

Monsieur le Professeur Xavier DE LAMBALLERIE

Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Jean-Louis MEGE

Examineur

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Astrid VABRET et le Professeur Laurent ANDREOLETTI d'avoir accepté de juger mon travail. Je vous en suis très reconnaissant et je vous pris d'accepter mes remerciements les plus sincères.

Je remercie le Professeur Jean-Louis MEGE de m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury. Je vous assure de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

Je remercie toute l'équipe de l'UMR190 EPV pour m'avoir supporté depuis 5 ans. Xavier, merci de m'avoir conseillé et guidé durant toutes ces années. Rémi, merci pour tes conseils et ta bienveillance. Christine, merci de me faire partager ton savoir et ton expérience à l'hôpital. Fabien et Lauriane, merci d'avoir corrigé les nombreuses fautes glissées dans la première version du manuscrit. Nico, merci de n'avoir pas corrigé ma thèse. Boris, merci pour ta légèreté. Karine, merci pour ta discrétion. Cécile, ne désespère pas, le lyophilisateur fonctionnera un jour... Et à tous ceux que je n'ai pas cités.

Merci à mon épouse, Daphné et à mes fils, Paul et Louis, de me supporter durant ces périodes difficiles (pandémie, rédaction de thèse...). Vous êtes ma vie.

Merci à mon grand père qui m'a transmis sa passion pour la médecine et m'a fait découvrir la recherche.

Merci à mes parents, mes frère et sœur, ma famille, ma belle famille et mes amis pour leur patience et leur soutien.

I. Table des matières

I.	Table des matières.....	1
II.	INTRODUCTION.....	7
A.	LE VIRUS DE LA GRIPPE.....	8
1.	Nomenclature.....	8
2.	Morphologie du Virion	10
3.	Organisation du Génome et Protéines Virales	12
4.	Cycle de Réplication Virale	14
5.	Ecologie.....	15
6.	Epidémiologie	18
7.	Manifestations cliniques et complications.....	34
8.	Diagnostic	38
9.	Prévention et traitement.....	44
B.	PANDEMIE GRIPPALE 2009/2010.....	47
III.	RESULTATS.....	55
A.	Article 1: Novel virus influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009.....	56
1.	Avant propos	56

2. Article.....	58
3. Discussion	60
B. Article 2: Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April-November 2009.	62
1. Avant propos	62
2. Article.....	63
3. Discussion	64
C. Article 3: Point of care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.	66
1. Avant propos	66
2. Article.....	67
3. Discussion	69
IV. DISCUSSION GENERALE	70
V. CONCLUSION.....	78
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	80
VII. ANNEXES.....	98
A. Article 4: A simple method for molecular detection of Swine-origin and human-origin influenza A virus.	99
1. Avant propos	99
2. Article.....	101
3. Discussion	102

B. Article 5: Serological study of the 2009 pandemic due to influenza A H1N1 in the metropolitan French population.	103
1. Avant propos	103
2. Article.....	104
3. Discussion	106
C. Bulletin grippe hebdomadaire du 23 mars 2010	107
D. Point of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.	108

Table des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents genres de la famille des <i>Orthomyxoviridae</i> (Kawaoka et al., 1996).	8
Figure 2 : Nomenclature des virus de la grippe (CIDRAP, 2011).....	9
Figure 3 : Structure du virus de la grippe (microscopie électronique) (Murphy & Webster, 1996).....	11
Figure 4 : Organisation du génome et des protéines virales dans le virion (McHardy & Adams, 2009).....	13
Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réplication du virus de la grippe (Lamb & Krug, 1996).	14
Figure 6 : Réservoir et hôtes du virus de la grippe A (Murphy & Webster, 1996).....	15
Figure 7 : Comparaison de l'évolution génétique des virus de grippe A/H3N2, A/H1N1 et B (Ferguson <i>et al.</i> , 2003).	20
Figure 8 : Comparaison de l'évolution antigénique et génétique des virus de la grippe A/H3N2 (Smith <i>et al.</i> , 2004).	21
Figure 9 : Modèle de l'évolution globale des virus de grippe A (Rambaut <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figure 10 : Comparaison de la saisonnalité des épidémies de grippe dans les régions tempérées et tropicales (Viboud <i>et al.</i> , 2006).	23
Figure 11 : Nombre moyen de syndromes grippaux par sexe et par âge. Tecumseh Michigan, USA 1976-81 (Monto & Sullivan, 1993).	25
Figure 12 : Répartition par âge et dans le temps des fièvres et syndromes respiratoires enregistrés entre 2001 et 2006 à New York (Olson <i>et al.</i> , 2007).....	27

Figure 13 : Photo des lames utilisées pour extraire l'ARN du virus pandémique de 1918 (McCook, 2011).	29
Figure 14 : Taux d'attaque clinique observés aux Etats-Unis en fonction de l'âge lors des pandémies grippales de 1918-1919, 1957-1958, 1968-1969 et lors de l'épidémie inter-pandémique de 1928-1929 (Chin <i>et al.</i> , 1960; Collins & Lehmann, 1951).	33
Figure 15 : Nombre de décès et d'excès de décès chaque mois causés par une pneumonie ou la grippe aux Etats-Unis de 1959 à 2001 (Nelson & Holmes, 2007).	36
Figure 16 : Milieu de transport pour les prélèvements virologiques (Virocult®).	39
Figure 17 : Isolement des virus grippaux. Tapis cellulaire de cellules MDCK avant (gauche) et après l'apparition d'un effet cytopathique (droite) (WHO, 2011a).	40
Figure 18 : Origine du virus A/H1N1pdm. La figure permet de dater les différents réassortiments à l'origine de ce virus (Garten <i>et al.</i> , 2009; Smith <i>et al.</i> , 2009b).	49
Figure 19 : Profil des symptômes observés chez les patients infectés par le virus A/H1N1pdm dans le monde (Bautista <i>et al.</i> , 2010).	52
Figure 20 : Mortalité cumulative estimée au cours du temps aux Etats-Unis de 1962-1963 à 2009-2010 (Armstrong <i>et al.</i> , 2011).	54
Tableau 1 : Dérive antigénique des virus H3N2 entre 1968 et 1992 démontrée par les réactions croisées des test d'inhibition de l'hémagglutination (Murphy & Webster, 1996). .	18

Liste des abréviations

A/H1N1pdm	A/H1N1 pandémique de 2009/10
aa	Acide-aminé
ARN	Acide ribonucléique
CDC	Center for Disease Control and Prevention
HA	Hémagglutinine
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
InVS	Institut de veille sanitaire
Kb	Kilobase
M1	Protéine de matrice 1
M2	Protéine de matrice 2
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
NA	Neuraminidase
NP	Nucléoprotéine
NS1	Protéine non-structurale 1
NS2	Protéine non-structurale 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Protéine acide
PCR	Protein Chain Reaction
PB1	Protéine basique 1
PB2	Protéine basique 2
POC	Point of Care
RNP	Ribonucléoprotéine
VRS	Virus respiratoire syncytial

II. INTRODUCTION

A. LE VIRUS DE LA GRIPPE

1. Nomenclature

Les virus de la grippe (influenzaviruses) sont des virus enveloppés à ARN simple brin segmenté de polarité négative qui appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* (Kawaoka et al., 1996). Cette famille comprend cinq genres (Figure 1) : Trois d'entre eux formant le groupe des virus de la grippe : *Influenzavirus A* (grippe A), *Influenzavirus B* (grippe B) et *Influenzavirus C* (grippe C) ; et deux autres : *Thogotovirus* et *Isavirus*. Les thogotovirus sont des arbovirus transmis par les tiques retrouvés essentiellement en Afrique et dans le sud de l'Europe. Ils infectent le bétail, les chameaux et le gibier d'eau. Un cas de transmission accidentelle en laboratoire a montré qu'ils pouvaient infecter les humains (Clerx et al., 1983). Les isavirus infectent les saumons (Krossoy et al., 1999).

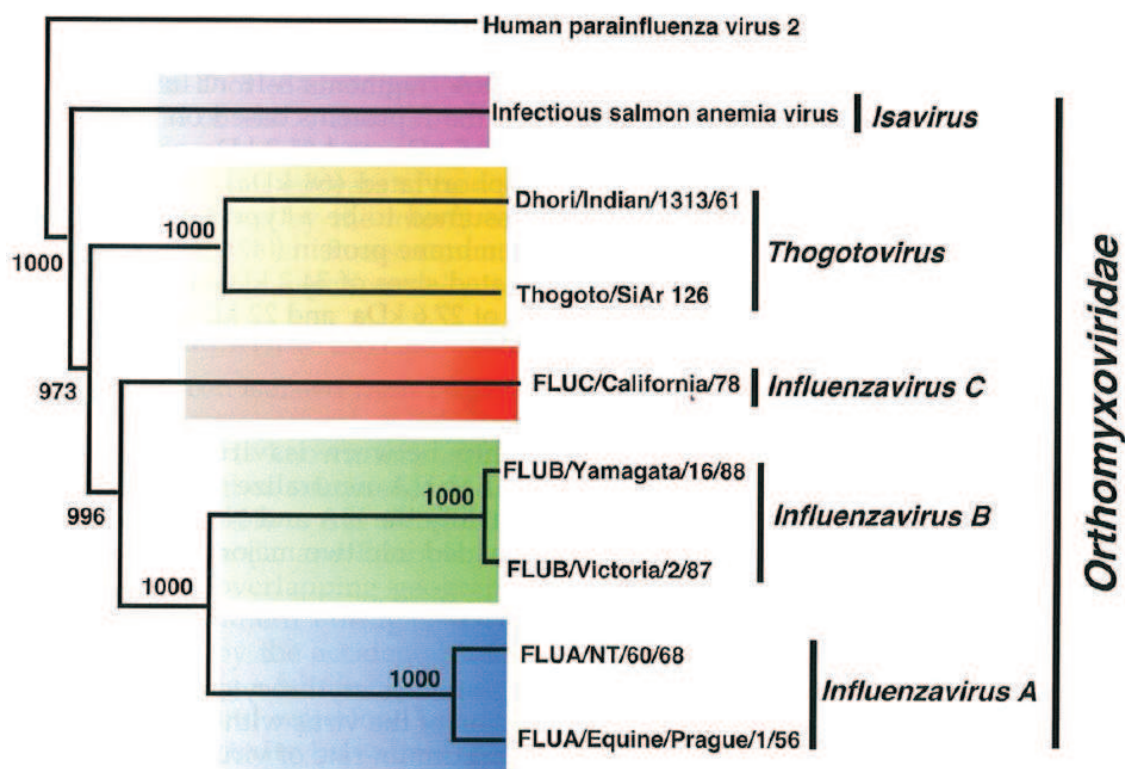


Figure 1 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents genres de la famille des *Orthomyxoviridae*. Arbre construit grâce à un alignement en acide-aminés (aa) du gène codant pour la protéine de nucléocapside et enraciné grâce au groupe externe 'Human parainfluenza virus 2' (Kawaoka et al., 1996).

La classification en sous-types des virus grippaux ne s'applique qu'aux virus de type A. Elle est basée sur les propriétés antigéniques des deux principales glycoprotéines de surface des virus : l'hémagglutinine (HA ou H) et la neuraminidase (NA ou N). Il existe : 16 sous-types HA, 9 sous-types NA, ce qui fait théoriquement 144 (16x9) sous-types possibles. Seuls les virus portant H1, H2 ou H3 et N1 ou N2 causent la grippe saisonnière et les pandémies du XX^{ième} et XXI^{ième} siècle (CIDRAP, 2011). La Figure 2 détaille les règles de nomenclature qui s'appliquent à tous les virus de la grippe.

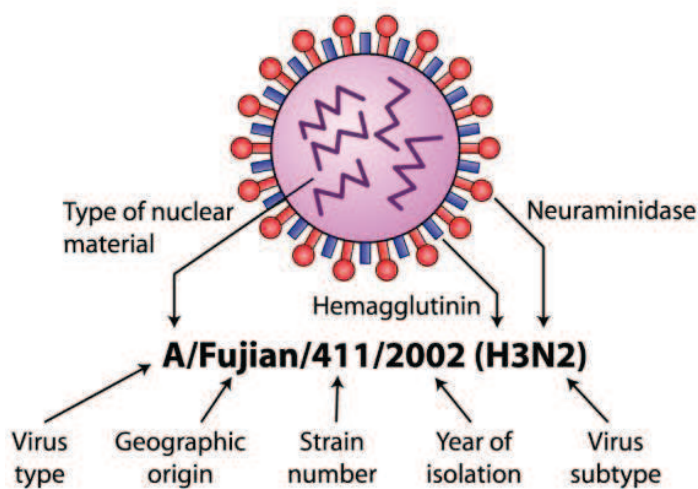


Figure 2 : Nomenclature des virus de la grippe (CIDRAP, 2011). Sont indiqués en premier le type de virus (A, B ou C), l'animal chez qui le virus a été isolé si ce n'est pas l'homme, la zone géographique d'isolement du virus, le numéro de la souche virale, l'année d'isolement et, uniquement pour les virus de la grippe A, le sous-type défini par le type d'HA et de NA.

2. Morphologie du Virion

Les virus sont composés de 0.8 à 1% d'ARN, environ 70% de protéines, 20% de lipides et 5 à 8% de glucides. La bicouche lipidique qui enveloppe les virus dérive de la membrane plasmatique de la cellule hôte à partir de laquelle le virus s'est répliqué. Les virus de la grippe A et B sont morphologiquement indistinguables alors que les virus de la grippe C se distinguent du fait de leurs spicules glycoprotéiques de surface qui sont organisés en réseaux hexagonaux.

Les particules virales font 80 à 120nm de diamètre et ont un aspect régulier après culture du virus sur cellules ou œufs embryonnés, alors qu'elles ont un aspect pléomorphe lorsqu'elles sont directement isolées chez l'animal ou l'homme ou après un seul passage en culture (Figure 3) (Kawaoka et al., 1996).

La caractéristique la plus remarquable des virions est la couche d'environ 500 spicules de surfaces qui tapissent la bicouche lipidique. Trois sortes de glycoprotéines de surface constituent cette couche : les spicules d'HA en forme de tige, ceux de NA en forme de champignons, et en moindre quantité et détectés uniquement par microscopie immuno-électronique, les canaux ioniques formés par la protéine membranaire M2 (Jackson *et al.*, 1991; Laver & Valentine, 1969). Les couches de glycoprotéines de surface des virions de grippe A, B et C sont respectivement constituées de trois (HA, NA et M2), deux (HA, NA) ou une seule (HA) glycoprotéine (Murphy & Webster, 1996).

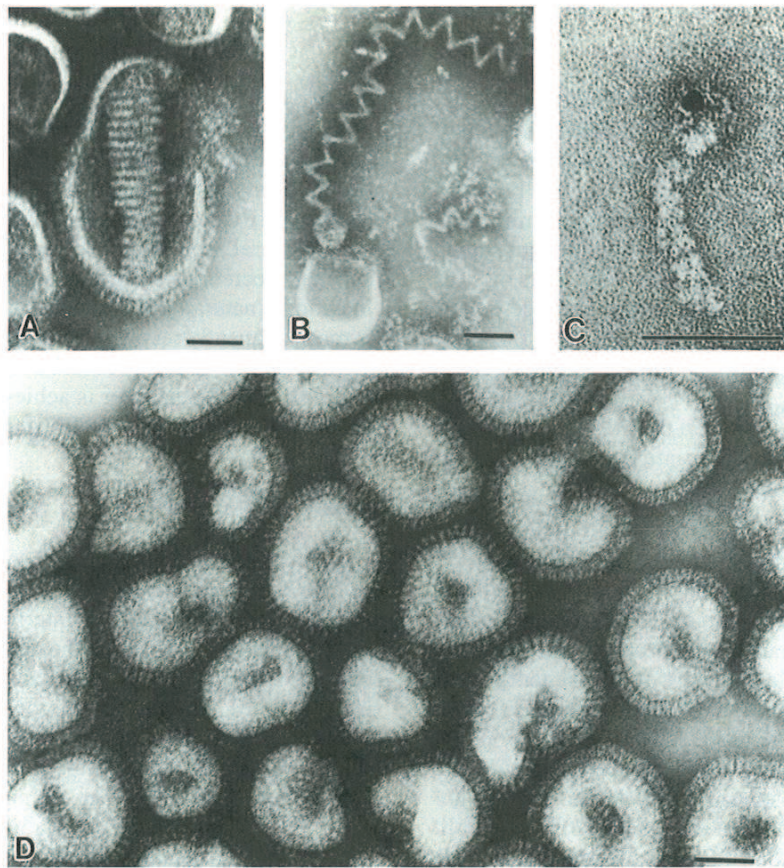


Figure 3 : Structure du virus de la grippe (microscopie électronique). (A-C) illustre la structure des composants internes : les complexes ribonucléoprotéiques observés individuellement (C) ou observés groupés et formant des structures hélicoïdales (A et B). (D) : vue d'ensemble des virions illustrant l'apparence pléomorphique des virions et les spicules de surface (Murphy & Webster, 1996).

3. Organisation du Génome et Protéines Virales

Les virions de grippe A et B contiennent 8 segments distincts d'ARN alors que ceux de grippe C n'en contiennent que 7 (pas de NA) (Figure 4). Le segment 1 d'ARN code pour la protéine basique 2 (PB2), le segment 2 pour la protéine basique 1 (PB1), le segment 3 pour la protéine acide (PA), le segment 4 pour l'HA, le segment 5 pour la nucléoprotéine (NP), le segment 6 pour la NA, le segment 7 pour les protéines de matrice 1 (M1) et 2 (M2), et le segment 8 pour la protéine non-structurale 1 (NS1) et 2 (NS2).

La taille des segments d'ARN varie d'environ 0.9 à 2.3 kb. Les 12 premiers (en 5') et 13 derniers nucléotides (en 3') de tous les segments d'ARN sont très conservés et jouent le rôle de promoteur pour leur transcription. Chaque segment viral est lié dans le virion aux NP, formant ainsi les ribonucléoprotéines (RNP). Ces dernières sont liées aux protéines PB1, PB2 et PA qui forment ainsi le 'polymerase complex' qui permet la transcription et la synthèse des ARN viraux. L'HA permet l'attachement du virion en se fixant aux récepteurs des cellules infectées (acides sialiques) et permet la pénétration du virus dans la cellule en fusionnant les membranes de l'enveloppe virale avec celles des endosomes. La NA permet la libération des virions (Lamb & Krug, 1996).

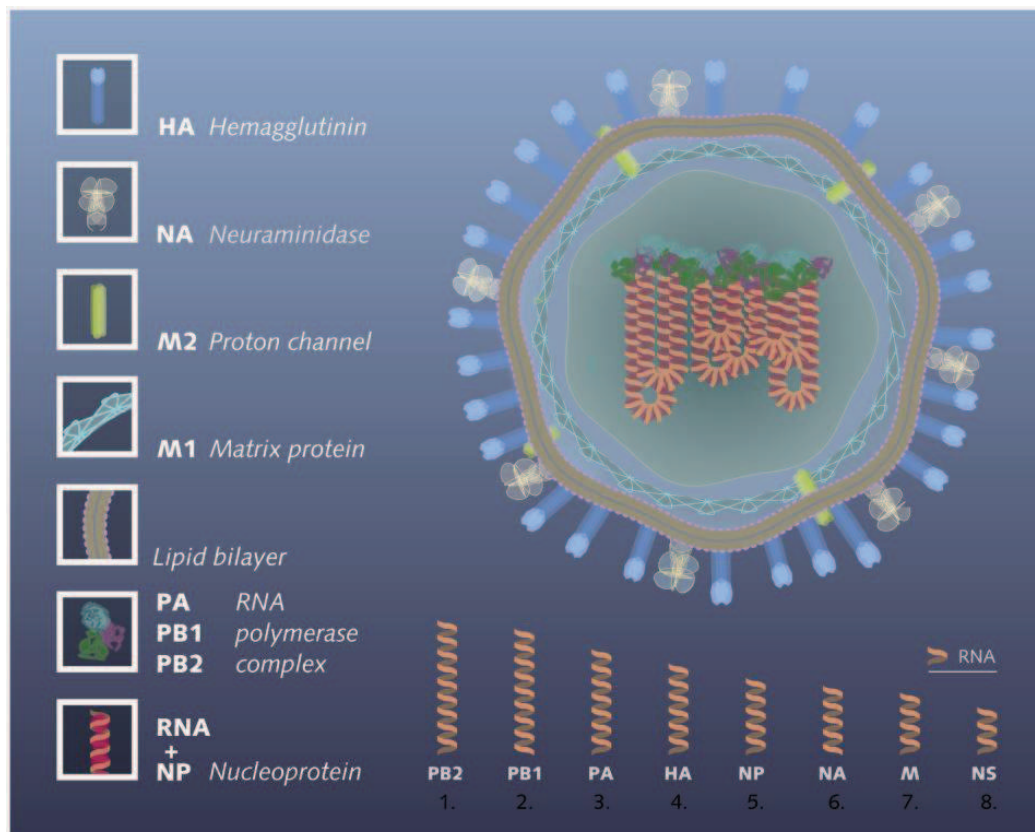


Figure 4 : Organisation du génome et des protéines virales dans le virion (McHardy & Adams, 2009).

4. Cycle de Réplication Virale

L'attachement du virion se fait grâce à l'HA qui se lie aux acides sialiques à la surface des cellules, puis le virion rentre dans la cellule par endocytose. La vésicule fusionne ensuite avec des endosomes de plus en plus matures, ce qui entraîne l'acidification de cette dernière. Pour les virus de la grippe A, les canaux ioniques M2 jouent également un rôle dans l'acidification des vésicules. La fusion des membranes opère à faible pH grâce à un changement de conformation des glycoprotéines d'HA. Après leur dissociation avec les NP, les segments d'ARN sont transcrits et synthétisés dans le noyau à l'aide, entre autres, du complexe formé par les protéines PB1, PB2 et PA. Suivant deux phases, une précoce et une tardive, les différentes protéines virales sont synthétisées soit dans le cytoplasme soit dans le réticulum endoplasmique, certaines subissent une maturation, puis elles permettent l'assemblage des virions. Enfin, la NA joue un rôle grâce à son activité catalytique dans la libération des virions (Lamb & Krug, 1996) (Figure 5).

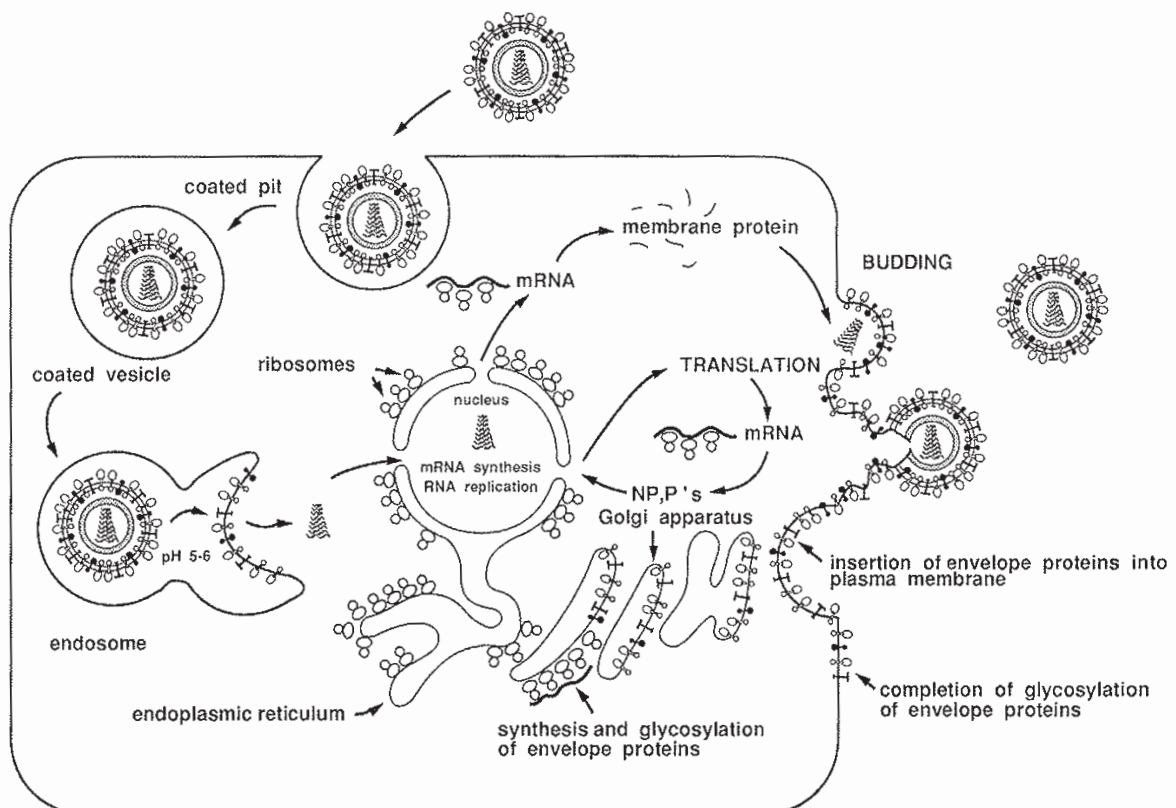


Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réplication du virus de la grippe (Lamb & Krug, 1996).

5. Ecologie

Les virus de la grippe sont présents sur l'ensemble du globe terrestre. Le virus de la grippe A infecte les oiseaux, l'homme, les chevaux, les porcs, les phoques, les baleines et d'autres espèces de mammifères semi-aquatiques. Les virus de la grippe B étaient connus pour être strictement humains jusqu'en 1999, date à laquelle un virus B a été isolé chez un phoque aux Pays-Bas, puis des études sérologiques ont montré qu'environ 2% de cette espèce avaient des anticorps dirigés contre ces virus (Osterhaus *et al.*, 2000). Les virus de la grippe C infectent les hommes et semblent infecter les porcs bien qu'aucun lignage spécifique pour ces derniers n'existe. Les études phylogénétiques des virus de la grippe A montrent que tous les lignages des gènes viraux sont apparentés à une espèce particulière. De plus, les échanges inter-espèces semblent toucher préférentiellement certaines espèces, comme par exemple la transmission de gènes d'origine porcine à l'homme ou l'inverse. Enfin, les oiseaux d'eau sont considérés comme étant le réservoir des virus grippaux A et sont donc capables de les transmettre à tous les autres hôtes (Murphy & Webster, 1996) (Figure 6).

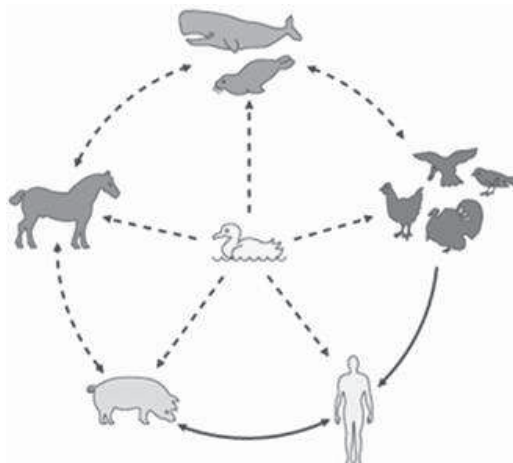


Figure 6 : Réservoir et hôtes du virus de la grippe A (Murphy & Webster, 1996).

Tous les représentants des sous-types de grippe A ont été isolés chez les oiseaux d'eau, le plus souvent sauvages, incluant les canards, les oies, les sternes (hirondelles de mer), les mouettes et les goélands, mais aussi domestiques, incluant les dindes, les poulets, les cailles, les faisans, les oies et les canards (WHO, 1981). La plupart des infections chez les oiseaux sont asymptomatiques (Webster *et al.*, 1978). Cependant, certains virus provoquent des infections parfois mortelles chez certaines espèces aviaires entraînant

occasionnellement des pertes importantes chez les éleveurs de volailles (Shortridge *et al.*, 1998). Des titres élevés de virus sont excrétés par le tractus gastro-intestinal des oiseaux et les virus excrétés peuvent survivre plusieurs semaines dans l'eau. Des études ont également montré que chaque année plus de 20% des jeunes oiseaux sont infectés. Ce taux élevé d'oiseaux infectés, couplé au fait que certains oiseaux d'eau peuvent excréter du virus jusqu'à 30 jours après infection montre que la perpétuation des virus grippaux dans le réservoir aviaire est due à une circulation continue des souches virales et à une adaptation à ces hôtes qui perdure probablement depuis des siècles (Cox & Subbarao, 2000).

Les porcs sont également susceptibles aux virus de la grippe A/H1N1 et A/H3N2. La grippe a été pour la première fois observée chez le porc aux Etats-Unis durant la pandémie de 1918-1919, causée par un virus A/H1N1 (Shope, 1931). Des études montrèrent que les souches étaient antigéniquement apparentées aux souches humaines, soulignant la capacité de ces virus à circuler entre le porc et l'homme (Shope, 1938). Depuis, des souches porcines dérivant de ces dernières (A/H1N1 de 1918-19) circulent et sont responsables de la majorité des pathologies respiratoires du porc chaque année en Amérique du Nord. En 1976, des recrues militaires à Fort Dix aux Etats-Unis furent infectées par des souches porcines A/H1N1, ce qui déclencha une forte inquiétude à propos d'une probable pandémie de grippe porcine qui finalement n'eut pas lieu (Hinshaw *et al.*, 1978). D'autres cas, dont certains mortels, furent décrits depuis, notamment chez les personnes en contact avec les porcs (Adiego Sancho *et al.*, 2009; Gregory *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2008; Wentworth *et al.*, 1994). Des virus grippaux A/H3N2 circulent également chez les porcs depuis la pandémie de 1968-1969. Il a été montré que les variants humains A/H3N2 circulent chez le porc et peuvent même persister chez ces derniers alors qu'ils ont disparus chez l'homme (Shortridge *et al.*, 1977). Ainsi, le porc fût rapidement considéré comme l'incubateur parfait permettant le réassortiment génétique des virus grippaux humains entre eux ou avec des virus porcins ou aviaires (il sert également d'hôte à ces derniers) (Murphy & Webster, 1996).

Les chevaux sont affectés par deux sous-types de grippe A : H7N7 et H3N8. Les virus H7N7, isolés pour la première fois en 1956 semblent éteints depuis 20 ans (Murcia *et al.*, 2011; Webster, 1993). Les virus H3N8 circulent depuis plus de cinquante ans et évoluent en causant des pandémies mondiales entrecoupées d'épidémies localisées. Actuellement,

plusieurs lignages de virus H3N8 co-circulent dans le monde (Lewis *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2011). En 2000, un variant H3N8 équin passa la barrière d'espèces et émergea comme nouveau virus respiratoire canin (Crawford *et al.*, 2005). Clairement, le passage du cheval au chien a eu lieu plusieurs fois indépendamment, mettant en évidence la complexité du passage de la barrière d'espèces. En effet, des chiens vivants en Australie dans 6 localités distantes de 20-60 kilomètres les unes des autres furent infectés au contact des chevaux fin 2007 (Kirkland *et al.*, 2010). L'infection chez le cheval est parfois mortelle et les épidémies sont souvent très couteuses, d'où la mise au point de vaccins efficaces mais dont la protection reste très brève (Mumford *et al.*, 1983; Wood *et al.*, 1983).

Enfin, la transmission des virus de grippe A semble fréquente chez les mammifères semi-aquatiques probablement du fait de leur promiscuité avec de nombreux oiseaux d'eau. De nombreux virus grippaux ont été isolés lors d'excès de mortalité chez les populations de phoques aux Etats-Unis : H7N7 (1979-1980), H4N5 (1983), H4N6 (1991), H3N2 (1992) (Geraci *et al.*, 1982; Murphy & Webster, 1996). Des virus de la grippe A ont également été isolés chez la baleine (Hinshaw *et al.*, 1986; Lvov *et al.*, 1978).

6. Epidémiologie

Les virus grippaux sont singuliers parmi les virus respiratoires humains du fait de leur capacité à moduler significativement leurs antigènes. Les deux antigènes de surface, l'HA et la NA, qui entraînent après une infection la production d'anticorps protecteurs, peuvent ainsi subir deux types de variations antigéniques. Premièrement, le glissement antigénique, phénomène progressif, induit des modifications des antigènes de surface grâce à l'apparition de mutations ponctuelles peu nombreuses ne modifiant pas le sous-type viral. D'un autre côté, le saut antigénique est un changement radical puisque les gènes codant pour un ou deux des antigènes de surface sont remplacés par des nouveaux (Murphy & Webster, 1996). Les sauts antigéniques sont à l'origine des virus de grippe A qui ont provoqué les pandémies grippales. Durant le XX^{ème} siècle, trois nouveaux virus ont émergé : en 1918 (A/H1N1 grippe espagnole), 1957 (A/H2N2 grippe asiatique) et 1968 (A/H3N2 grippe de Hong Kong) (Hsieh *et al.*, 2006).

Le glissement antigénique peut être détecté sur la base de quelques années en utilisant des antisérums produits chez le furet (Tableau 1). Il se manifeste par l'accumulation progressive de mutations non synonymes au niveau des sites antigéniques de l'HA et de la NA. Ces substitutions préviennent la fixation d'anticorps acquis précédemment lors d'infections. Ainsi, en modulant constamment ces antigènes de surface, les virus échappent à la protection conférée lors d'infections anciennes et deviennent capables d'infecter à nouveau une partie de la population humaine (Both *et al.*, 1983; Colman *et al.*, 1983; Wiley *et al.*, 1981).

Strain designation	Reference ferret antisera									
	HK/68 1.	ENG/72 2.	VIC/75 3.	TEX/77 4.	BANG/79 5.	PHIL/82 6.	MISS/85 7.	SHN/87 8.	BEI/89 9.	BEI/92 10.
1. A/Hong Kong/08/68	2560	1280	40	5	5	5	10	10	5	5
2. A/England/42/72	320	1280	80	20	5	5	5	5	5	5
3. A/Victoria/03/75	5	80	320	40	10	20	10	5	5	5
4. A/Texas/01/77	5	80	160	1280	160	320	320	10	10	5
5. A/Bangkok/01/79	5	5	80	640	640	640	640	20	10	5
6. A/Philippines/02/82	5	5	10	40	40	320	160	10	10	5
7. A/Mississippi/01/85	5	5	40	160	80	640	640	40	20	20
8. A/Shanghai/11/87	5	5	5	5	5	5	80	320	160	20
9. A/Beijing/353/89	5	5	5	5	5	5	5	160	320	40
10. A/Beijing/32/92	5	5	5	5	5	5	10	20	80	640

Data courtesy of H. Regnery and N.J. Cox, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.

Tableau 1 : Dérive antigénique des virus H3N2 entre 1968 et 1992 démontrée par les réactions croisées des test d'inhibition de l'hémagglutination (Murphy & Webster, 1996).

Cette sélection induite par la réponse immunitaire de l'hôte du virus n'est observée que chez les virus grippe A humains et des autres mammifères alors que les virus A aviaires, B et C semblent évoluer différemment. Chez les oiseaux d'eau, considérés comme le réservoir des virus de la grippe A, les virus évoluent très lentement. Ils sont probablement déjà très adaptés à ces hôtes. Ainsi, la plupart des mutations qui apparaissent leur seraient délétères. Chez les virus isolés chez le canard, le taux de substitution d'un acide aminé par un autre au niveau de l'HA au cours d'une année est estimé à 3.2×10^{-4} par site alors qu'il est de l'ordre de 10^{-3} [$0.6-2.0 \times 10^{-3}$] par site pour les virus A humains et porcins (Suzuki & Nei, 2002). Des résultats similaires ont été trouvés au niveau du gène codant pour la NP ou PB2, renforçant ainsi l'idée que chez les oiseaux d'eau, ces virus ont atteint un niveau d'adaptation optimum (Gorman *et al.*, 1990a; Gorman *et al.*, 1990b). Cette lutte perpétuelle pour échapper au système immunitaire de leur hôte n'est pas non plus observée chez les virus de la grippe C. Leur évolution est généralement reliée à celle des autres virus à ARN avec des vitesses d'évolution moindres (taux de substitution dans les gènes codant pour les protéines NS1/NS2 très inférieurs à ceux des virus grippaux A) et la co-circulation de multiples lignages (Buonagurio *et al.*, 1986; Yamashita *et al.*, 1988). Les virus de la grippe B semblent évoluer de façon intermédiaire entre les virus A et C : deux lignages distincts circulent depuis les années 70 (B/Victoria/2/87-like et B/Yamagata/16/88-like) et le glissement antigénique, d'abord exclu, semble quand même guider en partie l'évolution de ces virus (Air *et al.*, 1990; Chen & Holmes, 2008; Rota *et al.*, 1990). Finalement, des études ont montré que le glissement antigénique est très marqué pour les virus A/H3N2 depuis leur émergence en 1968, un peu moins pour les virus A/H1N1 (depuis 1977) et très peu pour les virus B (Figure 7) (Ferguson *et al.*, 2003; Rambaut *et al.*, 2008).

La diversité génétique des populations de virus grippaux est maintenue en permanence dans les cellules infectées par les erreurs induites par la RNA polymérase (introduisant des mutations durant la réplication du génome) et par l'échange de segments de génome (réassortiment) : le réassortiment des huit segments génomiques entre deux virus présents simultanément dans une même cellule peut donner naissance à des virus hybrides contenant des segments venant des deux virus (Desselberger *et al.*, 1978; Holland & Domingo, 1998; Young & Palese, 1979). L'amélioration de la connaissance des sites antigéniques des glycoprotéines de surface a permis de mettre en évidence chez les virus de

la grippe A que la relation entre modification antigénique et génétique n'est pas linéaire : l'évolution de la variabilité génétique des virus est constante dans le temps, mais seulement certaines de ces mutations entraînent des modifications antigéniques significatives (Figure 8) (Smith *et al.*, 2004). Ainsi, le glissement antigénique n'est pas continu mais ponctué : des lignages antigéniquement homogènes co-circulent durant 2-3 ans généralement. Durant cette période, la variabilité génétique observée est la résultante de la dérive génétique et de fréquents réassortiments inter-lignages. Puis un lignage est rapidement sélectionné (sélection positive) grâce le plus souvent à une ou plusieurs mutations au niveau des glycoprotéines de surface (surtout l'HA). Il s'en suit une diminution brutale de la diversité génétique puisque les autres lignages s'éteignent (Rambaut *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2006).

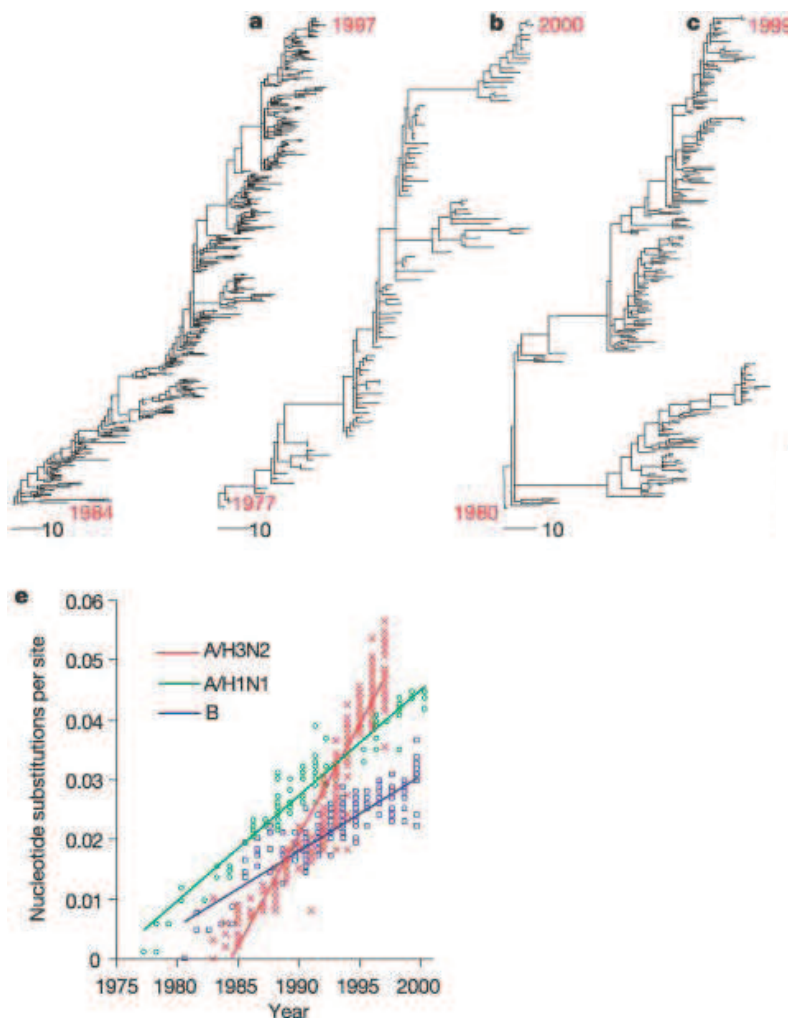


Figure 7 : Comparaison de l'évolution génétique des virus de grippe A/H3N2, A/H1N1 et B. (a), (b) et (c) représentent des arbres phylogénétiques obtenus à partir des séquences du gène codant pour l'HA des virus A/H3N2, A/N1N1 et B respectivement. (e) représente la distance génétique par rapport à la racine de l'arbre (Ferguson *et al.*, 2003).

Chaque année, les virus grippaux sont responsables d'épidémies hivernales dans les deux hémisphères (Simonsen, 1999). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la circulation globale des souches de grippe A : il a été montré que les différents lignages détectés chaque année ne sont pas associés à un lieu géographique particulier. Au contraire, ils circulent dans le monde entier, et la plupart d'entre eux sont présents durant le pic épidémique dans les deux hémisphères (Nelson *et al.*, 2007; Rambaut *et al.*, 2008). Cette circulation globale montre la capacité qu'ont ces virus à rapidement parcourir le monde.

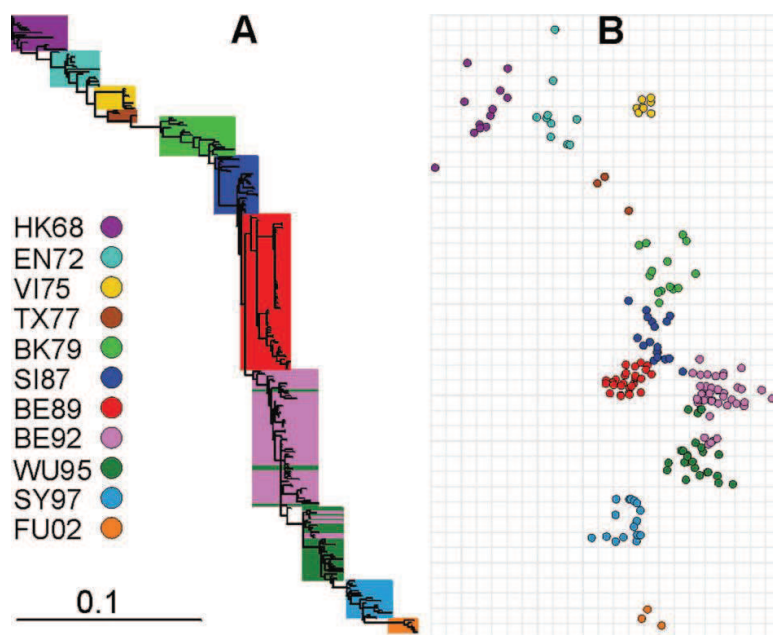


Figure 8 : Comparaison de l'évolution antigénique et génétique des virus de la grippe A/H3N2. (A) représente un arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène codant pour l'HA, où chaque cluster antigénique est représenté par une couleur. (B) représente une carte génétique des HA où les deux axes correspondent à la distance génétique basée sur la séquence en aa (Smith *et al.*, 2004).

Par ailleurs, dans les régions tempérées, les épidémies hivernales sont entrecoupées de périodes durant lesquelles aucun virus n'est détecté. Cette évolution globale est donc maintenue en dehors des épidémies hivernales et cette circulation de virus inter-épidémie est difficile à mettre en évidence : le maintien de la diversité génétique durant ces périodes suppose qu'une large population est infectée et écarte l'hypothèse d'une circulation à bas bruit dans les régions tempérées (Rambaut *et al.*, 2008). L'hypothèse la plus plausible reste que cette population source se situe dans les tropiques (Figure 9) où il a été montré que les virus grippaux pouvaient circuler toute l'année (Figure 10) (Viboud *et al.*, 2006). Cependant,

à cause du peu de données disponibles dans la majorité des pays situés en zone tropicale, elle n'a toujours pas été démontrée. De plus, d'autres études montrent qu'il existe une certaine saisonnalité des épidémies de grippe dans les régions tropicales où les épidémies sont souvent concomitantes de la saison des pluies (Shek & Lee, 2003). Ainsi, plus d'études épidémiologiques doivent être menées dans les pays tropicaux et subtropicaux afin de comprendre les mécanismes de cette circulation globale des virus grippaux. Un autre point important qui semble influencer la circulation de ces virus est l'interaction qu'exercent les virus entre eux : par exemple, il a été montré qu'entre 1994 et 2006, les virus H1N1 étaient plus présents lorsque les virus H3N2 ne provoquaient qu'une épidémie modérée (Rambaut *et al.*, 2008). A l'inverse, les grandes épidémies causées par les virus H3N2, et notamment en 1993-1994, 1997-1998, 1999-2000 et 2003-2004, étaient associées à des épidémies de grippe B moins marquées que les autres années (Chen & Holmes, 2008).

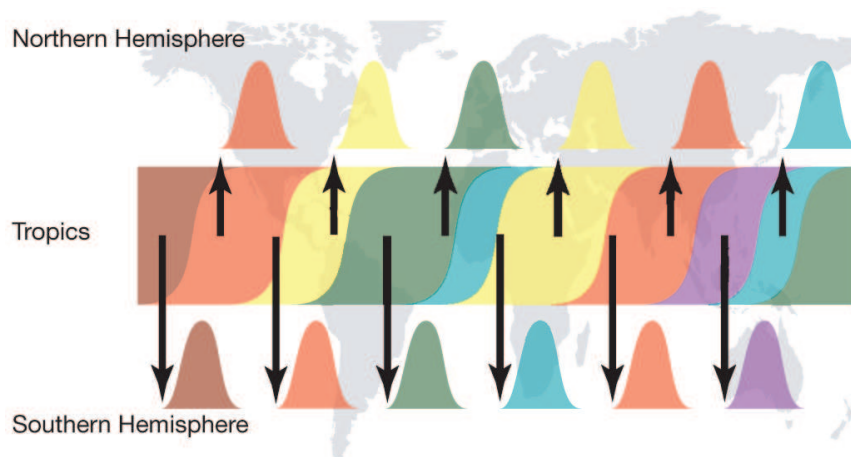


Figure 9 : Modèle de l'évolution globale des virus de grippe A. La diversité génétique et antigénique (ici représentée par différentes couleurs) est continuellement générée à partir d'une population source, peut-être située dans les tropiques puis exportée vers les deux hémisphères (flèches) (Rambaut *et al.*, 2008).

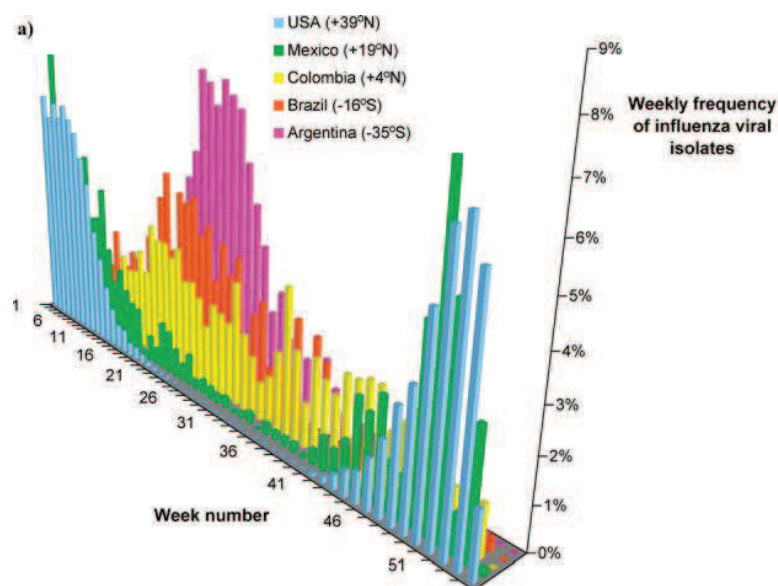


Figure 10 : Comparaison de la saisonnalité des épidémies de grippe dans les régions tempérées et tropicales. Distribution hebdomadaire du nombre total (rapporté à 100%) de prélèvements testés positifs pour la grippe (Viboud *et al.*, 2006).

La saisonnalité des épidémies dans les régions tempérées est un phénomène indiscutable et mis en évidence bien avant la découverte du virus de la grippe. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette saisonnalité, on peut les classer en trois catégories (Lipsitch & Viboud, 2009). La première comprend des facteurs propres à l'hôte qui rythment les infections : des fluctuations saisonnières des taux circulants de vitamine D ou de mélatonine pourraient jouer un rôle sur la réponse immunitaire (Cannell *et al.*, 2006; Dowell, 2001). La deuxième catégorie regroupe les facteurs extérieurs qui affectent la survie du virus dans l'environnement comme la température et l'humidité relative ou absolue (Lowen *et al.*, 2007; Shaman & Kohn, 2009). La dernière catégorie de facteurs qui pourraient expliquer cette saisonnalité est liée aux comportements humains : en hiver, on reste plus souvent à l'intérieur, ce qui favorise les contacts rapprochés et notamment entre les enfants à l'école. L'école semble jouer un rôle particulier dans la dynamique des épidémies : les vacances scolaires peuvent réduire significativement la transmission de la grippe chez les enfants (Cauchemez *et al.*, 2008). Pris individuellement, l'ensemble de ces facteurs jouent un rôle dans la saisonnalité de la grippe, mais il est difficile de dire s'ils agissent de façon synergique ou pas et de déterminer le poids de chacun d'entre eux. Ainsi notre connaissance dans ce domaine se heurte à la complexité de l'environnement dans lequel évoluent ces virus.

Il existe quatre modes suspectés de transmission de la grippe : la transmission par contact physique direct avec une personne infectée, la transmission par un intermédiaire (objet, vomissure...), la transmission via des gouttes expulsées par une personne infectée (toux, éternuement) et la transmission aérienne via des particules $<5\mu\text{m}$ de diamètre qui forment des aérosols en suspension dans l'air durant de longues périodes. La part relative de chacun de ces modes de transmission reste toujours sujette à de nombreux débats dans la communauté scientifique (Brankston *et al.*, 2007; Lemieux *et al.*, 2007; Tellier, 2006).

Chaque année, l'épidémie de grippe hivernale n'affecte pas de la même façon toutes les catégories d'âge. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer l'impact des épidémies de grippe dans une population donnée comme par exemple la présence de sous-populations protégées (infection récente ou ancienne, présence d'anticorps maternels pour les nouveau-nés) ou les comportements humains (la vie en collectivité favorise la diffusion du virus, à l'école par exemple) (Glezen, 1980; Perrotta *et al.*, 1985). Il est difficile d'évaluer par catégories d'âge la morbidité induite chaque année par la grippe car elle se caractérise le plus souvent par des symptômes non-spécifiques, et rares sont les cas confirmés par les laboratoires de virologie. De plus, il est souvent difficile d'obtenir des données représentatives d'une population donnée (les données hospitalières par exemple le sont peu) (Glezen, 1996; Nicholson *et al.*, 2003). Les études de cohortes menées dans des familles ou des communautés sont probablement de très bons indicateurs pour évaluer l'incidence de la grippe chaque année dans les différentes classes d'âge (Fox *et al.*, 1982; Glezen & Couch, 1978; Monto *et al.*, 1985; Viboud *et al.*, 2004). Toutes ces études montrent clairement que les taux d'attaque sont beaucoup plus élevés chez les enfants (Figure 11). Chez ces derniers, et notamment ceux en âge d'être scolarisés à l'école maternelle ou élémentaire, on observe des taux d'attaque très élevés allant de 30% à presque 50% (en incluant les formes asymptomatiques qui représentent 20-35% des infections selon les études) (Glezen & Couch, 1978; Glezen *et al.*, 1997; Neuzil *et al.*, 2002). Ainsi, les enfants sont considérés comme les principaux vecteurs de la grippe durant les épidémies et plusieurs observations confirment cette théorie : les études de cohortes menées dans des familles aux Etats-Unis dans les années 70 montrent que les taux d'incidence sont plus élevés chez les femmes, qui traditionnellement s'occupent plus des enfants (Figure 11) (Monto & Sullivan, 1993). De plus, cette même étude montre que les femmes au foyer sont

plus souvent malades que les femmes qui travaillent, et les parents des familles avec des enfants en bas âge sont plus souvent malades que ceux avec des enfants plus âgés (Monto & Sullivan, 1993; Monto & Ullman, 1974). Le fait que les enfants sécrètent plus de virus et durant de plus longues périodes contribue probablement au fait qu'ils véhiculent plus la maladie (Fox *et al.*, 1982; Frank *et al.*, 1981; Glezen & Couch, 1978; Hall *et al.*, 1979; Longini *et al.*, 1982; Sato *et al.*, 2005; Wright, 2000).

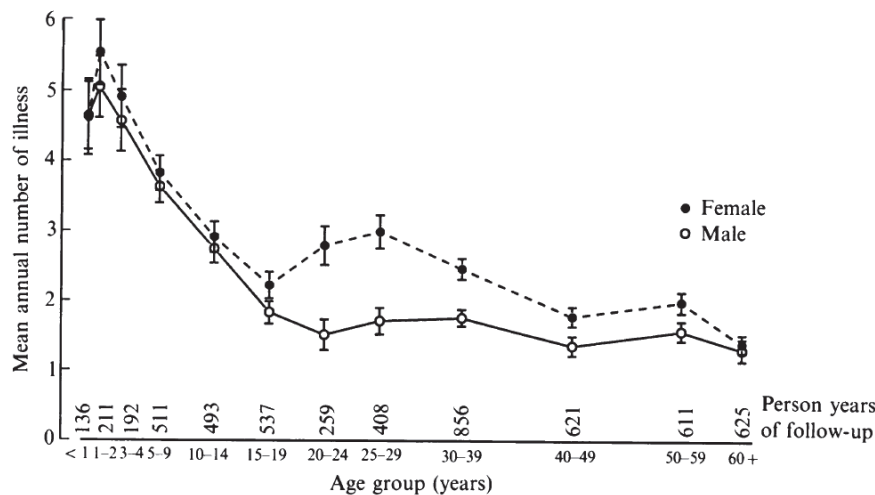


Figure 11 : Nombre moyen de syndromes grippaux par sexe et par âge. Tecumseh Michigan, USA 1976-81 (Monto & Sullivan, 1993).

Les forts taux d'incidence observés chez les enfants ont fait germer l'idée qu'en les vaccinant, on pourrait interrompre la transmission du virus et donc protéger les plus vulnérables face à la grippe : les âges extrêmes de la vie. Deux études en apportèrent la preuve : en 1968, durant l'épidémie de grippe au Michigan aux Etats-Unis, des taux de vaccination supérieurs à 90% furent obtenus dans certaines communautés, réduisant d'un tiers le taux d'incidence de la grippe dans toutes les classes d'âges par rapport aux communautés voisines très peu ou pas vaccinées (Monto *et al.*, 1970). Plus tard, une étude menée en Russie montra également que plus les enfants de 7 à 14 ans sont vaccinés (taux de vaccination allant de 40 à 70%), plus les personnes non vaccinées les entourant sont protégées du virus de la grippe (Rudenko *et al.*, 1993).

Les taux d'incidence observés dans les différentes classes d'âge sont également liés au type et sous type de virus prédominant circulant durant l'épidémie. Tous les virus infectent fortement les enfants, mais les virus A/H1N1 touchent très peu les adultes alors

que les virus A/H3N2 et un peu moins les virus de grippe B les infectent : l'étude menée dans le Michigan durant 11 ans à partir de 1976 montra que chez les personnes de 20 ans ou plus, on observe des taux d'isolement (taux annuel d'isolement du virus en culture ramené à 100 personnes) beaucoup plus bas pour les virus A/H1N1 (1.1% vs 9.5% et 7.1% pour les virus A/H3N2 et B respectivement) (Monto & Sullivan, 1993). Une autre étude menée sur plus de 6500 cas documentés de 1977 à 1989 à Houston au Etats-Unis montra que 20% et 16% des personnes infectées respectivement par les virus A/H3N2 et B avaient plus de 35 ans, alors que seulement 4% de celles infectés par les virus A/H1N1 étaient du même âge (Glezen *et al.*, 1991). Lorsque l'on ajoute à ces résultats le fait que les virus A/H1N1 circulaient jusqu'en 1956, il est probable que l'immunité acquise lors d'infections antérieures à cette date a participé à cette différence observée dans ces deux études. Plus tard, et grâce au développement des techniques de biologie moléculaire qui permettent de déterminer en plus du sous-type le lignage des souches circulantes, une étude menée grâce aux données des urgences hospitalières de New-York montra que la ré-émergence du lignage B/Victoria en 2001-2002 toucha quasi uniquement les enfants de moins de quinze ans qui n'avaient jamais été en contact avec ce lignage qui ne circulait plus depuis 1986. Au contraire, en 2003-2004, l'émergence d'un nouveau lignage de grippe A/H3N2 (Fujian) fut associée à un taux d'attaque élevé dans toutes les classes d'âge, concordant avec l'émergence d'un nouveau variant antigénique (Olson *et al.*, 2007). Cette même étude montre également que les données virologiques sont essentielles pour bien comprendre l'épidémiologie des épidémies de grippe, car elles sont causées par différentes types/sous-types de virus et elles surviennent souvent durant des épidémies causées par d'autres virus respiratoires comme le VRS (Figure 12).

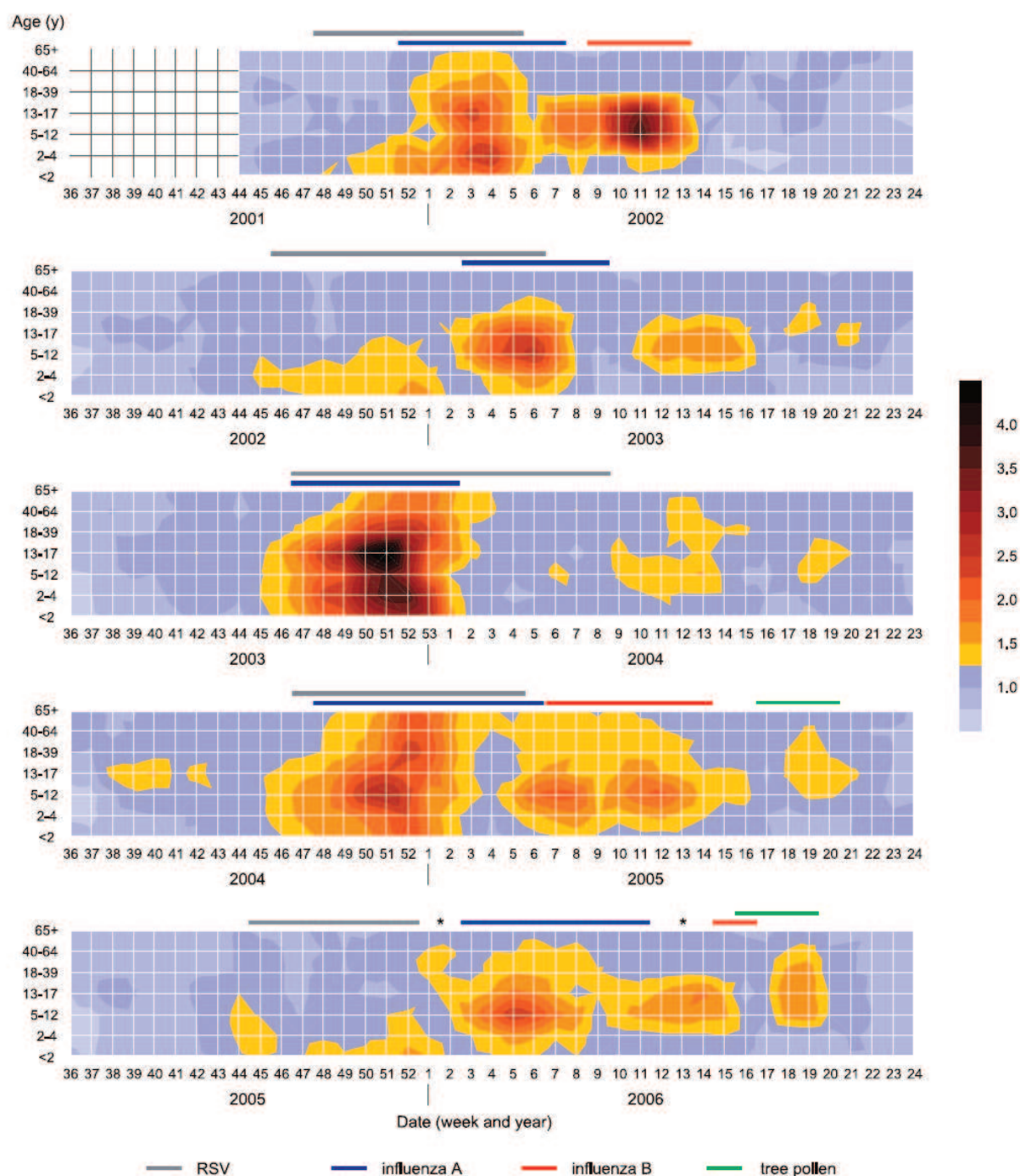


Figure 12 : Répartition par âge et dans le temps des fièvres et syndromes respiratoires enregistrés entre 2001 et 2006 à New York (données des urgences hospitalières). Les données virologiques (virus détectés de façon prédominante semaine par semaine) sont représentées schématiquement au dessus du graphique ainsi que les pics de pollens (Olson *et al.*, 2007).

Les sauts antigéniques sont des variations brutales qui conduisent à l'émergence ou à la ré-émergence de virus grippaux contre lesquels la population est peu ou pas immunisée. Durant le XX^{ième} siècle, 4 virus sont soudainement apparus puis ont rapidement atteints les populations aux quatre coins du monde : le virus A/H1N1 de la grippe espagnole en 1918, le virus A/H2N2 de la grippe asiatique en 1957, le virus A/H3N2 de la grippe de Hong Kong en 1968 et le virus A/H1N1 de la grippe russe en 1977. Tous ces virus issus de sauts antigéniques ont des caractéristiques communes : ils émergèrent en premier en Chine, ils furent tous antigéniquement distincts des souches grippales circulant à l'époque et ils appartiennent tous aux sous-types H1, H2 ou H3 (Murphy & Webster, 1996).

La pandémie la plus notoire fut celle de 1918, communément appelée la grippe espagnole. L'origine géographique du virus est très certainement la Chine, mais certains historiens suggèrent que le virus a d'abord émergé aux Etats-Unis. Pendant l'été 1918, une première vague toucha simultanément l'Amérique du Nord, l'Europe, l'Asie, l'Afrique et l'Océanie. Elle fût assez modérée en termes de mortalité. Durant l'automne 1918, une seconde vague particulièrement mortelle balaya de nouveau le globe. Elle fût quasiment immédiatement suivie par une troisième vague hivernale. Pour des raisons qui sont encore méconnues, la pandémie de grippe espagnole fut particulièrement sévère (Cox & Subbarao, 2000; Frost, 2006). De plus, l'origine du virus de 1918 est encore débattue par la communauté scientifique. Jusque dans les années 1990, les chercheurs ne disposaient que de données sérologiques, permettant uniquement de déterminer le sous-type viral. Dès 1951, des chercheurs s'intéressèrent au moyen d'isoler le virus qui causa cette pandémie afin d'étudier notamment sa pathogénicité. L'idée que des corps de patients décédés lors de la pandémie puissent avoir été conservés dans le permafrost des régions proches du pôle Nord germa et plusieurs expéditions furent menées en Alaska. Des corps furent trouvés, mais la résurrection attendue de virus grippaux échoua et tous les prélèvements furent détruits car inutiles à l'époque (Frost, 2006). Ce n'est que beaucoup plus tard, lors de l'essor de la biologie moléculaire dans les années 90, qu'une équipe menée par Jeffery K. Taubenberger aux Etats-Unis réussit à obtenir la séquence de trois gènes du virus A/H1N1 de 1918 (dont l'HA et la NA). Ils utilisèrent en premier des tissus issus d'autopsies réalisées sur des soldats américains en 1918 puis conservés dans de la paraffine après une fixation au formol (Figure 13). Plus tard, ils se servirent de tissus issus d'un corps retrouvé dans le

permafrost en Alaska (Fanning & Taubenberger, 1999; Taubenberger *et al.*, 1997). Depuis, la séquence des huit segments d'ARN est connue et la génétique inverse a permis de ressusciter ce virus (Wimmer *et al.*, 2009). Malgré cela, l'idée d'une origine aviaire pour ce virus reste fortement combattue par certains, et le manque de séquences virales datant de la même époque ne permettra probablement pas d'éclaircir cette question (Reid & Taubenberger, 2003).



Figure 13 : Photo des lames utilisées pour extraire l'ARN du virus pandémique de 1918. Réalisées à l'hôpital de Fort Hiley aux Etats-Unis, elles furent ensuite conservées au National Museum of Health and Medicine à Washington (McCook, 2011).

En 1957, un virus A/H2N2 (appelé virus de la grippe asiatique) causa une épidémie en février dans le sud de la Chine (province de Guizhou). Après avoir atteint en mars la province de Hunan, Singapour et Hong Kong furent touchés en avril. Ensuite, il fût détecté tour à tour dans les différents continents, et en novembre 1957, le monde entier était touché par ce nouveau virus. Le virus fût isolé pour la première fois quasiment simultanément aux Etats-Unis et en Angleterre en juin 1957 (Cox & Subbarao, 2000). Sa caractérisation montra que les gènes HA, NA et PB1 étaient d'origine aviaire et les cinq autres gènes dérivait des virus A/H1N1 humains circulant à l'époque. Ainsi, c'est le réassortiment entre les souches A/H1N1 humaines circulantes et des virus grippaux d'origine animale qui a donné naissance à ce nouveau virus (Murphy & Webster, 1996). Bien que détecté dès le printemps 1957, le pic épidémique de la première vague n'eut lieu qu'au mois d'octobre. Une deuxième vague se

produisit en janvier 1958, suivie de deux autres beaucoup plus tardives en 1959-1960 et 1962-1963 (basé sur les chiffres de surmortalité au Etats-Unis) (Miller *et al.*, 2009).

En 1968, un virus A/H3N2 (appelé virus de la grippe de Hong Kong) fut isolé pour la première fois à Hong Kong en juillet 1968. Ce virus, également issu d'un ou plusieurs réassortiments, contient 6 segments d'ARN issus des virus humains A/H2N2 (dont la NA), alors que l'HA et le gène PB1 sont d'origine aviaire (Murphy & Webster, 1996). L'épidémie progressa rapidement en Asie et de grandes variations furent observées en termes de morbidité et de mortalité : au Japon par exemple, l'épidémie fut modérée et discontinuée. La première vague toucha les différents continents durant l'hiver 1968-1969 et là encore, des différences furent observées. La plus frappante fut celle observée entre les Etats-Unis, durement touchés cet hiver là, et de nombreux autres pays comme l'Angleterre qui enregistrèrent des taux d'attaque importants mais associés à une faible mortalité. L'hiver suivant (1969-1970), de nombreux pays, comme l'Angleterre furent beaucoup plus durement touchés en termes de mortalité (Cox & Subbarao, 2000; Kilbourne, 2006).

La dernière pandémie du XX^{ième} siècle (ou pseudo-pandémie selon certains) eut lieu en 1977. C'est une épidémie de grippe A/H1N1 en Union Soviétique qui attira l'attention en novembre 1977 et donna le nom à cette pandémie : grippe russe puis grippe rouge. Des études montrèrent plus tard qu'une épidémie eut lieu en mai au Nord-est de la Chine, mais le nom donné initialement perdura (Kilbourne, 2006). Le virus se répandit ensuite rapidement en Europe, en Amérique du Nord et dans l'hémisphère Sud. Les scientifiques réalisèrent rapidement que cette souche émergente était singulière. En effet, elle était quasiment similaire (antigéniquement et génétiquement) aux souches A/H1N1 qui circulaient en 1950. La conséquence fut que cette pandémie toucha quasi uniquement les personnes âgées de moins de 25 ans puisque les personnes plus âgées avaient des anticorps contre ce virus qui circulait plus de vingt ans plus tôt. De ce fait, les conséquences en termes de mortalité furent très modérées (Cox & Subbarao, 2000). De plus, les virus A/H3N2 continuèrent de circuler après son émergence, alors que les virus pandémiques de 1957 et 1968 chassèrent les souches humaines précédentes. Rapidement, la communauté scientifique s'interrogea sur l'origine de ce virus. L'hypothèse, d'un virus resté dormant chez un hôte non humain, ou la conservation du virus chez un humain décédé pris dans les glaces

puis libéré à nouveau dans la nature furent rapidement écartées. Il est maintenant admis que ce virus provient d'un laboratoire non identifié qui conservait ce virus au fond d'un congélateur (Kilbourne, 2006; Wertheim, 2010).

Une des signatures des pandémies du XX^{ième} siècle est la grande transmissibilité des virus lors de l'émergence de ces nouveaux virus du fait d'une plus grande susceptibilité des populations (Miller *et al.*, 2009). Durant les premières vagues de pandémies, des taux d'attaque clinique allant de 40 à plus de 50% furent mesurés chez les enfants (généralement entre 5 et 15 ans) (Cox & Subbarao, 2000). Ces derniers, comme lors des épidémies de gripes inter-pandémiques, furent les principaux vecteurs. Des études sérologiques menées dans l'Ohio aux Etats-Unis durant la pandémie de 1957 parmi des familles non vaccinées montrèrent des taux de séroconversion autour de 70% chez les enfants âgés de 5 à 21 ans. Chez les adultes et les enfants de moins de cinq ans, des taux d'attaque clinique inférieurs furent mesurés, bien qu'ils soient supérieurs à ceux mesurés lors des épidémies inter-pandémiques (Figure 14) (Glezen, 1996). Lors de la pandémie de 1968-1969, des taux d'attaque clinique similaires furent mesurés pour toutes les catégories d'âge, avec quand même un petit pic chez les enfants. Cette répartition par catégorie d'âges s'apparente plus à celle mesurée lors des épidémies inter-pandémiques (1928-1929 par exemple ; Figure 14). L'existence d'une immunité contre le virus A/H2N2 qui partage la même NA avec le virus émergeant en 1968, et notamment chez les jeunes adultes et les enfants de plus de 10 ans très largement infectés en 1957-1958, pourrait expliquer cette différence (Glezen, 1996).

Alors que les virus pandémiques émergent puis envahissent rapidement le monde, certains virus infectant l'humain émergent parfois dans des régions du globe sans pour autant causer une pandémie. Un problème majeur se pose alors : lorsque ces virus apparaissent, il est impossible d'infirmer s'ils vont causer ou non une pandémie. Ce fut le cas en 1976, lorsque plusieurs cas d'infections par un nouveau virus A/H1N1 d'origine porcine furent décrits à Fort Dix aux Etats-Unis chez des militaires (Hinshaw *et al.*, 1978). Rapidement, les autorités américaines mirent au point un vaccin qui fut administré dans l'urgence à 43 millions de personnes. Cependant, cette épidémie fut mineure et très localisée. De plus, une polémique sur d'éventuels effets secondaires neurologiques induits par la vaccination a éclaté, ce qui conduisit à l'arrêt du programme national d'immunisation.

L'autre exemple plus récent est l'apparition du virus A/H5N1 aviaire hautement pathogène en 1997 à Hong Kong. Un enfant de trois ans décéda d'un syndrome de détresse respiratoire aigu accompagné d'un syndrome de Reye. Un virus de grippe A fut isolé mais n'était pas détecté avec les techniques habituellement utilisées pour rechercher les souches humaines. Transmis au National Influenza of Rotterdam, il fût typé comme A/H5N1. La caractérisation moléculaire du virus montra que les huit segments d'ARN étaient d'origine aviaire (Claas *et al.*, 1998a; Claas *et al.*, 1998b; Subbarao *et al.*, 1998). Durant la même période, des épizooties furent décrites dans des élevages de volailles sur des marchés d'animaux à Hong Kong. Six mois plus tard, 17 nouveaux cas dont 5 fatals furent décrits à nouveau à Hong Kong. Ce virus ne fut plus détecté jusqu'en 2003, date à laquelle il ré-émergea à nouveau en Asie (un cas humain fatal et des zoonoses en Corée du Sud, Thaïlande et Vietnam). Depuis, des épizooties sont régulièrement détectées en Asie, associées parfois à l'apparition de cas humains (Cambodge, Chine, Indonésie, Laos, Pakistan, Thaïlande et Vietnam). Depuis fin 2005, des épizooties sont décrites en Afrique (notamment en Egypte), au Moyen Orient et en Europe (cas humains uniquement en Azerbaïdjan et en Turquie à la limite de l'Asie, mais épizooties partout en Europe). Les épizooties affectent les élevages de volailles et les oiseaux sauvages. Le transport des volailles ainsi que la migration des oiseaux sauvages semblent jouer un rôle dans la propagation du virus. Depuis 1997, 566 cas humains ont été recensés parmi lesquels 332 furent fatals (59%). Tous les patients infectés furent en contact avec des animaux infectés ou en contact étroit avec des patients infectés. La transmission interhumaine est assez faible. Rapidement, la forte mortalité induite par ce virus, entraîna la crainte de l'émergence d'un virus H5N1 pandémique. Cependant, à ce jour, l'infection par le virus A/H5N1 doit être considérée plutôt comme une anthroponose et l'émergence du virus A/H1N1 pandémique en 2009 montra comme il est difficile de prévoir quels virus causeront les futures pandémies (FAO-ECTAD, 2011; WHO, 2011b).

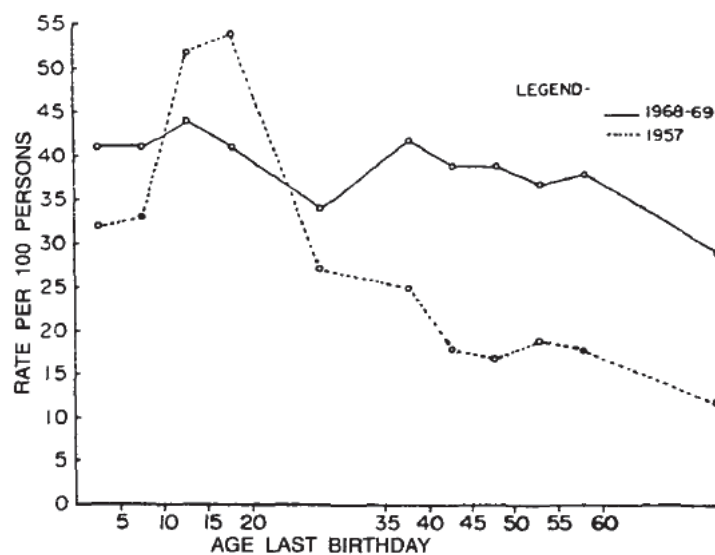
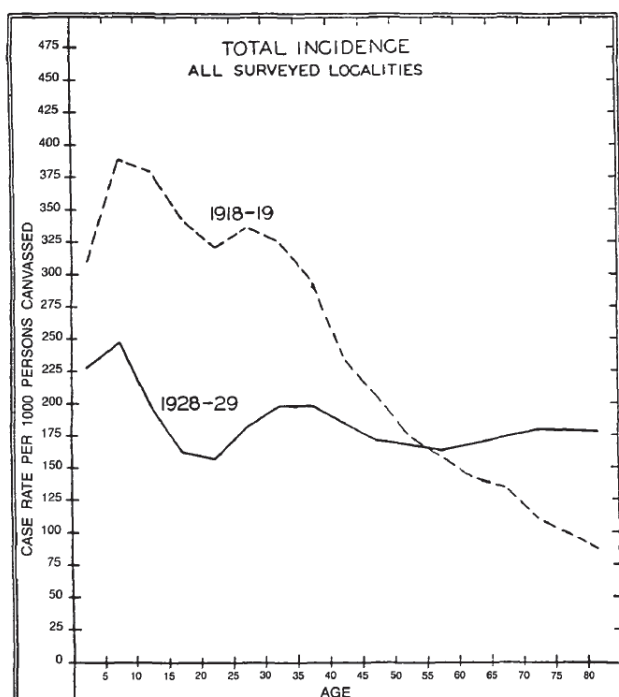


Figure 14 : Taux d'attaque clinique observés aux Etats-Unis en fonction de l'âge lors des pandémies grippales de 1918-1919, 1957-1958, 1968-1969 et lors de l'épidémie inter-pandémique de 1928-1929 (Chin *et al.*, 1960; Collins & Lehmann, 1951).

7. Manifestations cliniques et complications

L'incubation typique pour la grippe est de 1 à 4 jours (moyenne : 2 jours) (Cox & Subbarao, 1999). Les adultes sécrètent du virus généralement la veille du jour de l'apparition de symptômes et ce durant environ 6-10 jours (Leekha *et al.*, 2007; Treanor, 2005). Des études ont également montré que les enfants sécrètent généralement plus de virus et durant des périodes plus longues (Fox *et al.*, 1982; Frank *et al.*, 1981; Glezen & Couch, 1978; Hall *et al.*, 1979; Longini *et al.*, 1982; Sato *et al.*, 2005; Wright, 2000).

La forme commune de la grippe se caractérise par l'apparition brutale de signes respiratoires et généraux : fièvre, myalgies, céphalées, asthénie, toux non productive, maux de gorge et congestion nasale (Nicholson, 1992). Chez les enfants et les personnes âgées, ces signes sont souvent associés à des nausées/vomissements et/ou à une diarrhée (Neuzil *et al.*, 2002; Peltola *et al.*, 2003). La grippe non compliquée dure généralement 3-7 jours, la toux et la fatigue peuvent durer parfois plus de deux semaines. De plus, l'infection par le virus de la grippe peut parfois entraîner l'exacerbation de pathologies sous-jacentes : pulmonaires (l'asthme, la mucoviscidose ou les broncho-pneumopathies chroniques obstructives), cardiaques (l'insuffisance cardiaque) ou métaboliques (le diabète). La complication la plus fréquente de la grippe est la bronchite (surinfection bactérienne), son incidence varie de 10 à 20% chez l'adulte. Chez l'enfant, la complication la plus fréquente est l'otite moyenne aigue suivie par la sinusite (surinfection bactérienne) (Schrag *et al.*, 2006; Treanor, 2005).

D'autres complications plus rares et plus graves peuvent survenir lors de l'infection par le virus de la grippe. Tout d'abord, des complications pulmonaires virales, bactériennes ou mixtes. La pneumonie virale primaire, essentiellement associée aux virus grippaux A, survient généralement 2 ou 3 jours après l'apparition des symptômes. Souvent associée à un syndrome de détresse respiratoire aigu et à un œdème pulmonaire lésionnel, elle fait partie des gripes malignes au pronostic souvent réservé. Un nombre anormalement élevé de pneumonies virales primaires est décrit durant la pandémie de 1918-1919 et chez les personnes infectées par le virus aviaire A/H5N1 (Bauer *et al.*, 2006). L'évolution des pneumonies bactériennes peut être parfois redoutable malgré un traitement antibiotique adapté. Enfin, d'autres complications plus rares peuvent survenir : encéphalite,

encéphalopathie, syndrome de Guillain-Barré, myosite, myocardite, péricardite, syndrome de Reye (Treanor, 2005).

Il a également été montré que la grippe chez la femme enceinte est plus souvent compliquée (pneumonies le plus souvent) que chez l'adulte jeune. Ainsi, les formes sévères et les hospitalisations sont plus fréquentes chez les femmes enceintes et il convient donc de les traiter comme des sujets à risque. Excepté lors de la pandémie de 1918-1919, la grippe chez la femme enceinte n'est pas associée à une mortalité plus importante ni à une augmentation du nombre de fausses couches (Treanor, 2005).

Les symptômes respiratoires lors d'une infection par un virus grippal sont souvent difficiles à distinguer des symptômes induits par les autres pathogènes respiratoires et notamment les virus. La sensibilité et la valeur prédictive d'une grippe 'clinique' est variable, dépendant surtout de la prévalence des autres pathogènes respiratoires et du niveau de circulation de la grippe (Orenstein *et al.*, 1988). Parmi des adolescents et des adultes en bonne santé et en pleine épidémie de grippe, la valeur prédictive positive d'une grippe 'clinique' (apparition rapide de fièvre et de toux) atteint seulement des valeurs de l'ordre de 80-85% (variant de 79% à 88%) (Boivin *et al.*, 2000; Monto *et al.*, 2000).

Le nombre de patients hospitalisés et décédés à cause de la grippe est un bon indicateur de la sévérité induite par chaque épidémie. Dans l'hémisphère Sud et Nord, l'épidémie de grippe est assez facile à détecter car elle s'accompagne d'une augmentation du nombre des consultations pour syndrome grippal concomitante avec la détection de virus grippaux par les laboratoires de virologie. Cependant, chiffrer le nombre réel de décès et d'hospitalisations liés à la grippe est difficile car un syndrome grippal peut être causé par d'autres pathogènes, certaines présentations cliniques sont atypiques notamment chez les jeunes enfants et les complications de la grippe sont très variées puisqu'elles incluent la décompensation de nombreuses pathologies chroniques (Nicholson *et al.*, 2003). Cependant, il semble clair que les infections par les virus A/H3N2 causent plus de complications, d'hospitalisations et de morts que celles induites par les virus A/H1N1 et B (Frank *et al.*, 1985; Monto *et al.*, 1985; Simonsen *et al.*, 1997; Simonsen *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1980).

Durant les épidémies de grippe, les réseaux sentinelles (de médecins généralistes ou de médecins urgentistes) rapportent une augmentation du nombre de syndromes grippaux qui est associée à un excès de mortalité dans la population. Des modèles permettent d'estimer cet excès de mortalité : en Angleterre et au Pays de Galles, on estime que 6200 à 29600 personnes décédèrent chaque année entre 1976 et 1990 (Nicholson, 1996). Ces estimations sont environ 10 fois supérieures au nombre de certificats de décès pour grippe car la grippe est une cause très importante de mortalité indirecte. Aux Etats-Unis, de 1976 à 1999, les épidémies de grippe furent associées en moyenne par an à 8097 morts par pneumonie/grippe et 51 203 morts toutes causes confondues (le chiffre exact se situant probablement entre ces deux estimations) (illustré Figure 15) (Thompson *et al.*, 2003). Environ 90% des personnes décédées ont plus de 65 ans. Bien qu'avoir plus de 65 ans est un facteur de risque en soit, les décès et les hospitalisations sont plus fréquentes chez les patients atteints de pathologies chroniques cardiaques et/ou respiratoires (Nicholson *et al.*, 2003). Chez les jeunes enfants, les taux d'hospitalisation aux Etats-Unis vont de 5/1000 pour ceux ayant des facteurs de risque à 1/10000 pour ceux sans facteur de risque. Des taux supérieurs ont été décrits chez les enfants de moins de 1 an et sont comparables à ceux de personnes âgées de plus de 65 ans (Glezen *et al.*, 1987; Izurieta *et al.*, 2000; Neuzil *et al.*, 2000a; Neuzil *et al.*, 2000b).

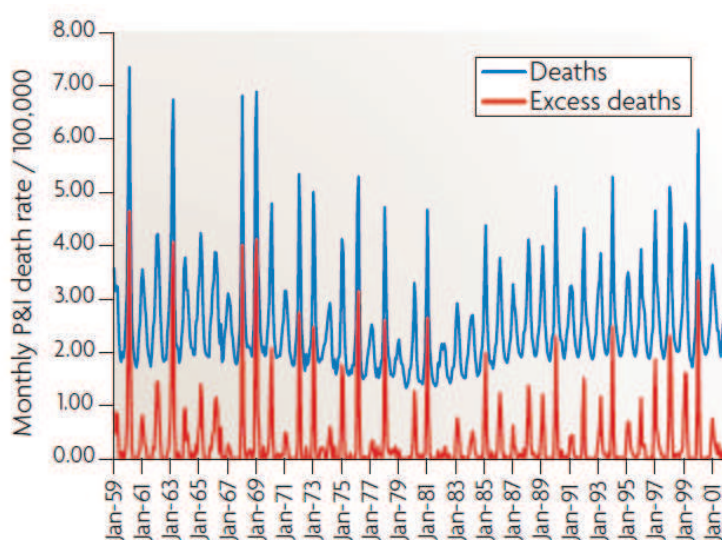


Figure 15 : Nombre de décès et d'excès de décès chaque mois causés par une pneumonie ou la grippe aux Etats-Unis de 1959 à 2001 (Nelson & Holmes, 2007).

Comparés aux périodes interpandémiques, les niveaux de mortalité peuvent considérablement augmenter durant les pandémies. Durant la pandémie de 1918-19, on estime que 20 millions de personnes sont décédées dans le monde, ce fut de loin la pandémie la plus meurtrière. De plus, en tenant compte du fait que de nombreux pays ne disposaient pas des moyens adéquats pour apprécier cette mortalité, il est probable que le nombre réel de morts soit plus aux alentours de 40-50 millions (Nguyen-Van-Tam & Hampson, 2003). La pandémie de 1957-1958 causa probablement environ 1 million de morts dans le monde. La mortalité induite par la pandémie de 1967-1968 fut inférieure à celle de 1957-1958 (estimée à environ 500 000 morts). Cependant, certaines épidémies de virus A/H3N2 causèrent plus tard un grand nombre de décès (1976-1977, 1989-1990) (Nguyen-Van-Tam & Hampson, 2003). Toutes ces pandémies furent également associées à un excès de mortalité chez les jeunes adultes et les enfants. Cette différence fut très marquée lors de la pandémie de 1918-1919 et beaucoup moins lors des deux pandémies suivantes. Cela est probablement dû au fait qu'une partie des personnes âgées étaient partiellement immunisées contre ces virus. Cependant, la courbe de mortalité en W de 1918-1919 reste encore une énigme (Glezen, 1996).

8. Diagnostic

Une prise en charge appropriée des patients présentant un syndrome grippal dépend en partie de la fiabilité et de la rapidité du diagnostic. La valeur prédictive pour le diagnostic clinique de la grippe varie en fonction de la prévalence des autres pathogènes respiratoires et du niveau de circulation de la grippe (Orenstein *et al.*, 1988). Le diagnostic par le laboratoire de virologie reste donc un outil de choix, notamment pour les patients à risques et hospitalisés. Un diagnostic rapide réalisé au laboratoire permet de mettre en place un traitement antiviral curatif (ou à visée prophylactique chez les contacts étroits du cas confirmé), d'éviter un usage inapproprié des antibiotiques et de prendre des mesures d'isolement à l'hôpital ou dans les institutions pour personnes âgées. De plus, le recueil des données de laboratoire permet aux réseaux de surveillance de la grippe d'avoir des informations sur la nature des virus qui circulent (grippe, VRS par exemple) (CDC, 2011).

Deux types de méthodes permettent de poser le diagnostic de la grippe. Le diagnostic virologique direct et le diagnostic sérologique indirect. Ce dernier n'est plus utilisé en routine (sauf exception) et sert uniquement à obtenir des données épidémiologiques.

Le succès du diagnostic direct dépend en grande partie de la qualité du prélèvement et des conditions de transport et de conservation avant la réalisation du ou des tests. Les prélèvements doivent être réalisés idéalement dans les trois jours suivant l'apparition des symptômes (durant la phase aiguë de la maladie) (Johnson, 1990). Une large gamme de prélèvements respiratoires peut être utilisée pour le diagnostic direct de la grippe. Les prélèvements réalisés au niveau des voies respiratoires supérieures sont classiquement les écouvillons nasals et les aspirations naso-pharyngées. On peut également utiliser des écouvillons de gorge et des lavages nasals ou de gorge. Les prélèvements réalisés au niveau des voies respiratoires inférieures sont les aspirations trachéales, les lavages broncho-alvéolaires les crachats et les biopsies pulmonaires. Les écouvillons doivent contenir un milieu de transport qui permet la conservation du virus. De nombreux systèmes commercialisés existent comme les Virocult® par exemple (Figure 16). Pour les autres prélèvements, l'ajout d'un milieu de transport dans le prélèvement et une conservation à 4°C permet de différer la réalisation des analyses (WHO, 2011a).



Figure 16 : Milieu de transport pour les prélèvements virologiques combinant l'écouvillon servant à réaliser le prélèvement et le milieu de transport (Virocult®).

L'isolement du virus à partir du prélèvement fut longtemps le gold standard pour le diagnostic de la grippe. De plus, cette technique permet de conserver la souche virale en cause en vue d'examen complémentaires comme le typage, le sous-typage, le séquençage d'un ou plusieurs segments ou la mise en évidence de la sensibilité à une molécule antivirale. La viabilité des virus dans les prélèvements est fonction de la température de transport, du temps qui sépare le prélèvement de l'inoculation et la congélation/décongélation est à éviter. Lorsque les conditions optimales sont réunies, l'isolement est une technique très sensible, cependant, elle nécessite d'avoir du personnel qualifié et des installations importantes (laboratoire BSL2 ou BSL3), hottes à flux laminaire, microscopes, incubateurs à CO₂, centrifugeuses, etc.). Ainsi, la plupart des laboratoires ne pratiquent plus l'isolement de nos jours. L'isolement se réalisait historiquement sur des œufs embryonnés, mais cette technique n'est plus utilisée en routine. On utilise aujourd'hui des cultures cellulaires, et la lignée continue MDCK (Madin-Darby canine Kidney) est de loin la plus utilisée (Treanor, 2005; WHO, 2011a). L'utilisation des MDCK est possible grâce à l'ajout de trypsine dans le milieu de culture qui clive l'HA et permet la multiplication du virus (Tobita *et al.*, 1975). Le milieu de culture doit également contenir un 'cocktail' d'antibiotiques et antifongiques pour empêcher la croissance des bactéries et champignons présents dans le prélèvement. Comme de nombreux virus respiratoires, les virus grippaux poussent mieux à 34-35°C. Le virus induit classiquement un effet cytopathique en 3 jours

(environ 90% des positifs) (Figure 17), parfois plus (7 jours) (Newton *et al.*, 2002). Certains virus produisent un effet cytopathique uniquement après un ou deux passages 'aveugles'. La présence de virus grippal est ensuite vérifiée grâce à des anticorps monoclonaux (IF directe) ou à la mise en évidence du génome viral (PCR) (classiquement, on réalisait une hémagglutination).

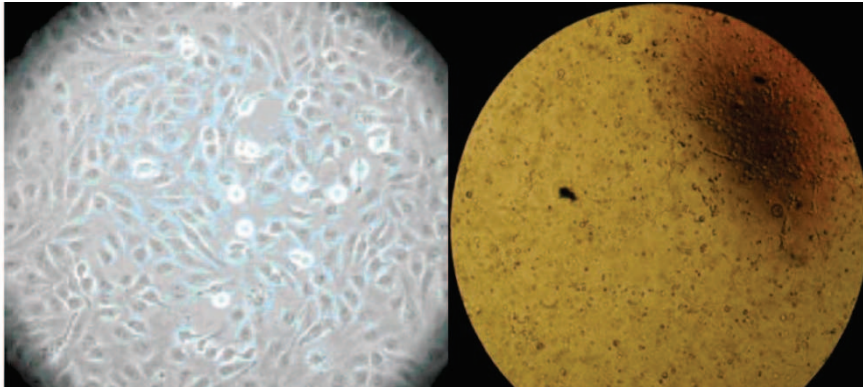


Figure 17 : Isolement des virus grippaux. Tapis cellulaire de cellules MDCK avant (gauche) et après l'apparition d'un effet cytopathique (droite) (Grossissement x40) (WHO, 2011a).

La mise au point d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les virus grippaux a permis d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement (McQuillin *et al.*, 1985). Ces anticorps ont permis tout d'abord de réaliser des tests d'immunofluorescence (IF) directe sur les prélèvements (en 2-3 heures), de réaliser des tests d'IF sur des cellules inoculées (plus rapide que l'isolement, 24-72h), de typer les virus (espèce, sous type). Il existe aujourd'hui une grande gamme d'anticorps monoclonaux marqués par des fluorochromes (ou pool d'anticorps monoclonaux) pour détecter les virus grippaux. La sensibilité de ces tests (IF directe sur le prélèvement) est fonction de la qualité des prélèvements (ils doivent contenir suffisamment de cellules épithéliales respiratoires), de la température de transport, du temps qui sépare le prélèvement de la réalisation du test. Selon les études, qui comparent ce test au gold standard (isolement) et/ou aux techniques de biologie moléculaire très sensibles, la sensibilité de ce test varie d'environ 80% à 100%

(Habib-Bein *et al.*, 2003; Landry *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2008; Shetty *et al.*, 2003; Spada *et al.*, 1991; Uyeki, 2003).

Depuis les années 90, des tests rapides pour la détection des virus grippaux A ou A+B sont commercialisés (Waris *et al.*, 1990). Ils contiennent des anticorps monoclonaux qui permettent la détection des antigènes viraux ; ce sont pour la plupart des tests immunochromatographiques permettant d'obtenir un résultat en moins de 30 minutes. Ces tests sont idéaux pour les petits laboratoires qui ne peuvent réaliser les tests d'IF directe, l'isolement et les tests de biologie moléculaire. Certains d'entre eux sont même réalisables 'au lit du patient' (Treanor, 2005). Plusieurs études ont montré la capacité de ces tests à détecter une large gamme de souches de virus grippaux A (incluant des souches A/H5N1, A/H2N2 et A/H9N2 humaines et des souches animales), leur spécificité est très bonne (proche de 100%), et leur sensibilité sur des échantillons cliniques (comparée à l'isolement en culture et/ou à la PCR) varie de 40 à 85% pour la majeure partie des études (dans ces études, seuls les virus A/H1N1, A/H3N2 et B circulants avant 2009 sont présents). En général, leur sensibilité semble être moins importante chez les adultes que celle reportée chez les enfants (Boivin *et al.*, 2001; Cazacu *et al.*, 2003; Covalciuc *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 2001; Hurt *et al.*, 2007; Landry *et al.*, 2008; Landry & Ferguson, 2003; Liao *et al.*, 2009; Noyola *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2008).

La dernière approche développée pour permettre de détecter les virus grippaux a été la détection des acides nucléiques dans les prélèvements respiratoires. Les techniques d'hybridation des acides nucléiques ont été rapidement remplacées par la PCR qui est largement utilisée aujourd'hui (Treanor, 2005). De nombreux systèmes ont été décrits, certains permettant d'amplifier tous les virus grippaux A ou B humains et d'autres amplifiant uniquement certains sous-types. Aujourd'hui également, plusieurs tests de PCR en temps réel sont commercialisés. Les premières méthodes de PCR décrites et utilisées étaient des méthodes de RT-PCR conventionnelles avec analyse des produits de PCR sur gel d'agarose. Durant les années 90 et surtout dans les années 2000, de plus en plus de laboratoires ont utilisé des techniques de PCR en temps réel qui utilisent pour la plupart des sondes d'hydrolyse. La PCR en temps réel a plusieurs avantages : son excellente sensibilité, son temps de réalisation et de lecture rapide et le fait de ne pas avoir à manipuler les produits

de PCR. De plus, durant ces 15 dernières années, l'évolution des techniques d'extraction des réactifs de biologie moléculaire ont permis d'améliorer la sensibilité de ces méthodes. Ainsi, la sensibilité des tests de biologie moléculaire décrits dans la littérature a augmenté au fil des années : les premières études décrivaient une sensibilité comparable à celle de l'isolement en culture, considéré alors comme le gold standard, alors que les études récentes montrent que la sensibilité de la culture est d'environ 60-90% (comparée à la PCR en temps réel) (Chan *et al.*, 2002; Gharabaghi *et al.*, 2008; Habib-Bein *et al.*, 2003; Landry *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2009; Mackay *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2004). Les systèmes détectant une large gamme de virus voire tous les virus grippaux A ou B ciblent généralement les segments codant pour les protéines M1 ou NS1 qui sont très conservés. Au contraire, les PCR spécifiques d'un sous-type particulier ciblent généralement les segments codant pour les protéines HA ou NA. Les techniques de biologie moléculaire doivent être réalisées par du personnel expérimenté et dans des locaux qui permettent de séparer physiquement les différentes étapes (extraction, réalisation des mix, ajout des acides nucléiques, amplification) afin de limiter au maximum les contaminations. Il convient également d'utiliser, en plus du témoin externe (témoin positif), un témoin interne qui permet la mise en évidence : d'inhibiteurs de PCR, d'une mauvaise extraction, l'oubli de l'ajout d'acides nucléiques (uniquement si système multiplexé) et la mauvaise qualité du prélèvement (uniquement si le système cible l'ARN cellulaire) (Mackay *et al.*, 2002; WHO, 2011a).

Enfin, la nature du prélèvement peut influencer le résultat des différents tests décrits ci-dessus. Plusieurs types de prélèvements peuvent être réalisés au niveau des voies respiratoires supérieures : écouvillons nasals, les aspirations naso-pharyngées, les écouvillons de gorge et les lavages nasals ou de gorge. De nombreuses études ont été réalisées pour le VRS montrant clairement que l'aspiration naso-pharyngée et le lavage nasal sont les prélèvements de choix comparés aux écouvillons (Ahluwalia *et al.*, 1987; Hall & Douglas, 1975; Masters *et al.*, 1987; McIntosh *et al.*, 1982; Treuhaft *et al.*, 1985). Pour la grippe, moins d'études existent et trois échantillons semblent être plus sensibles : l'écouvillon nasal, l'aspiration naso-pharyngée et le crachat (pour ce dernier une seule étude a montré sa bonne sensibilité car il est peu utilisé) (Covalciuc *et al.*, 1999). Selon les études, l'aspiration naso-pharyngée est soit plus sensible, soit équivalente à l'écouvillon nasal. Il faut

cependant noter que la nature de l'examen réalisé pour détecter le virus grippal peut influencer ces résultats. Alors que les tests d'IF directe et, dans une moindre mesure, l'isolement viral semblent sensibles au type de prélèvement, la PCR l'est beaucoup moins (Heikkinen *et al.*, 2002; Heikkinen *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2008).

Les méthodes de diagnostic indirect sont la fixation du complément, l'ELISA, l'inhibition de l'héماغglutination et les tests de microneutralisation. Ces deux dernières sont de loin les plus utilisées. Le diagnostic d'une infection par le virus de la grippe en utilisant ces techniques est exceptionnel de nos jours. Cela nécessite de prélever deux sérums (un en phase aigue et un 14 jours plus tard), et une augmentation significative du titre des anticorps (4 fois ou plus) permet d'affirmer l'infection. Ces tests sont surtout utilisés aujourd'hui pour réaliser des études épidémiologiques : déterminer le taux d'attaque lors d'une épidémie, déterminer le niveau de protection d'une population vis à vis d'un virus particulier (Treanor, 2005; WHO, 2011a).

9. Prévention et traitement

Il existe quatre médicaments qui sont utilisés pour le traitement et la prévention de la grippe : l'amantadine, la rimantadine, le zanamivir et l'oseltamivir. Il est important de noter qu'un individu immunocompétent va sans aucun traitement rapidement limiter la réplication de ces virus. Ainsi, l'opportunité d'avoir un impact significatif sur la réplication virale est restreint et aucune étude n'a pu montrer l'efficacité du traitement lorsqu'il fut mis en place après 48h suivant l'apparition des symptômes. Typiquement, le traitement doit être mis en place dans les 24h qui suivent l'apparition des symptômes (Treanor, 2005).

L'amantadine et la rimantadine sont des inhibiteurs des protéines M2 (canaux ioniques) qui permettent la décapsulation du virus grâce à l'acidification de l'intérieur du virion. Ils ne sont actifs que sur les virus grippaux A. Ces deux molécules, mais surtout l'amantadine peuvent induire des troubles du système nerveux central mineurs (insomnies, vertiges et troubles de la concentration) voire plus graves (confusion, crises d'épilepsie chez les individus ayant des antécédents de crises d'épilepsie). L'administration de ces molécules chez des sujets malades sans complication induit une diminution de la durée des symptômes (fièvre, toux, etc.) et une diminution de la durée d'excrétion du virus. Le plus gros problème de ces deux antiviraux est qu'ils induisent très rapidement l'émergence de mutants résistants transmissibles (leur capacité répliquative semble identique). Une seule mutation confère une résistance simultanée à ces deux traitements. Cet inconvénient majeur a fortement limité l'usage de ces molécules (Treanor, 2005).

Le zanamivir et l'oseltamivir sont des inhibiteurs de la NA désignés grâce à la découverte de la structure cristalline de cette protéine. Ils sont actifs sur les virus grippaux A et B. Ces deux molécules sont bien tolérées et leur effet indésirable le plus fréquent est la survenue de troubles gastro-intestinaux. L'administration de ces molécules permet également une diminution de la durée des symptômes et de la durée d'excrétion du virus. Un traitement précoce permet également un retour au travail (ou autre activité normale) plus précoce. Plusieurs études ont également montré que les patients avec ou sans facteurs de risque ont un risque diminué de déclarer une pneumonie, d'être traités par des antibiotiques ou d'être hospitalisés (Dutkowski, 2010; Treanor, 2005). Jusqu'en 2007, toutes les études menées sur ces molécules donnaient des niveaux de résistance très bas dans les

populations, surtout avec le zanamivir, notamment à cause du fait que les mutations induisant la résistance à ces deux molécules diminuaient la capacité répliquative des virus et donc empêchaient leur émergence. Cependant, durant l'épidémie de 2007-2008, la proportion de virus A/H1N1 résistant à l'oseltamivir augmenta brusquement et en 2008-2009, la quasi-totalité des souches A/H1N1 circulantes étaient résistantes à cet antiviral. Toutes ces souches portaient la même mutation induisant la résistance au niveau de la NA (H274Y). Il a été montré que c'est l'apparition successive de deux mutations permissives (V234M puis R22Q) qui a conduit à l'émergence de ces virus résistants, ces deux mutations compensant la diminution de capacité répliquative induit par la mutation H274Y. Le plus frappant est peut être le fait que les deux mutations permissives ne sont pas apparues à cause de la pression de sélection provoquée par l'usage de l'oseltamivir : elles ont en fait émergé progressivement durant l'évolution des souches (dérive génétique, sélection positive car donne un autre avantage sélectif etc.) (Bloom *et al.*, 2010).

Toutes les molécules antivirales sont efficaces lorsqu'administrées en prophylaxie. Plusieurs stratégies de prophylaxie ont été étudiées : une prophylaxie saisonnière durant toute l'épidémie hivernale de grippe, une prophylaxie dans les familles lorsqu'un cas se déclare dans le foyer et une prophylaxie dans les maisons de retraite lorsqu'un cas se déclare. Pour les inhibiteurs des protéines M2, lorsque le cas index est traité par la même molécule, il doit être isolé des personnes traitées en préventif pour éviter la transmission de virus résistants (Treanor, 2005).

La façon la plus efficace pour contrôler chaque année l'épidémie de grippe reste l'administration annuelle du vaccin antigrippal. Les premiers vaccins inactivés furent mis au point dans les années 40. Depuis ce temps, de nombreuses améliorations dans le protocole de fabrication de ces vaccins ont permis de réduire significativement les effets indésirables et notamment les réactions d'hypersensibilité. Pour améliorer les titres infectieux lors de la production des souches sur œufs embryonnés, les virus sont réassortis avec des souches de laboratoire adaptées. Les vaccins vivants atténués furent mis au point beaucoup plus tard à la fin des années 80. Des souches adaptées aux basses températures dans les années 60 furent réassorties avec les virus circulants. L'avantage de ces vaccins est d'induire une réaction immunitaire au niveau des muqueuses des voies aériennes supérieures avec

production locale d'IgA, ce qui permet de limiter la transmission des virus puisqu'ils sont administrés de façon locale (spray nasal). Il semblerait également qu'ils protègent mieux lorsque des glissements antigéniques ne sont pas pris en compte dans la préparation des vaccins. En effet, chaque année et en fonction des virus qui circulent durant l'été dans l'hémisphère opposé et l'hiver précédent, trois souches (A/H3N2, A/H1N1 et B) sont choisies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et rentrent dans la composition des deux types de vaccins antigrippaux trivalents. L'inconvénient majeur des vaccins vivants atténués est qu'ils sont parfois (rarement) transmissibles et qu'ils peuvent entraîner chez les patients immunodéprimés une excrétion prolongée de virus. Les deux types de vaccins entraînent une augmentation du titre des anticorps (IHA) chez environ 90% des sujets vaccinés. Les personnes immunodéprimées (ce qui inclut celles de plus de 65 ans) répondent moins bien. La vaccination chez les jeunes adultes et les enfants protège 70% à 90% des sujets lorsque les souches vaccinales correspondent aux souches circulantes. Les personnes chez qui la vaccination est fortement recommandée peuvent être classées en 3 groupes : les personnes à risque (enfants de 6 mois à 2 ans, personnes âgées, résidents en institution fermée, malades chroniques [pathologie pulmonaire, cardiovasculaire, métabolique, rénale, hémoglobinopathie, immunodépression], les personnes traitées au long cours par de l'aspirine, les femmes enceintes au deuxième ou troisième trimestre de grossesse), les personnes qui peuvent transmettre la grippe aux personnes à risque (dont le personnel soignant) et les personnes âgées de 50 à 64 ans (Treanor, 2005).

B. PANDEMIE GRIPPALE 2009/2010

Fin avril 2009, le CDC d'Atlanta annonce qu'un nouveau virus grippal A/H1N1 d'origine porcine (A/H1N1pdm) a été détecté chez deux enfants aux Etats-Unis et sur de nombreux prélèvements en provenance du Mexique où sévit depuis mars une épidémie d'infections respiratoires parfois sévères. L'épidémie est importante à Mexico, et les autorités locales décident le 23 avril de fermer les écoles et de suspendre toutes les manifestations comme les matchs de football. L'épidémie au Mexique commence à décliner début mai mais de nombreux patients ont été hospitalisés et certains sont décédés. Les premiers chiffres obtenus grâce à l'analyse par RT-PCR en temps réel de plus de 25000 prélèvements révèlent que dans 21% d'entre eux ce nouveau virus a été détecté et plus de 70% des patients infectés ont moins de 30 ans. La nature du virus (NA et l'HA d'origine animale) et le nombre de décès rapportés chez les jeunes adultes, notamment au Mexique, rappellent la pandémie de 1918-1919. Cependant, très peu de données sont disponibles à ce moment-là. En mai, de nombreux cas sont détectés aux Etats-Unis mais plus inquiétant encore est la vitesse à laquelle se propage le virus dans le monde, faisant craindre une nouvelle pandémie de grippe : le 27 avril, quatre pays ont détecté le virus sur leurs terres (Mexique, Etats-Unis, Canada, Espagne), le 28 avril sept pays, le 29 avril neuf pays, le premier mai 13 pays, le 9 mai 29 pays répartis sur l'ensemble du monde (CDC, 2009c; d). Dès le 29 avril 2009, l'OMS relève le niveau d'alerte pandémique au niveau cinq (pandémie imminente) puis au niveau 6 (le plus élevé) le 11 juin 2009. Le virus continue de se répandre et semble infecter plus particulièrement les enfants et les jeunes adultes ainsi que ceux atteints de pathologies chroniques pulmonaires et cardiovasculaires. Le développement d'un vaccin par la collaboration de l'OMS et des laboratoires pharmaceutiques commence alors (anonymous, 2009; Butler, 2009).

La transmission interhumaine de ce virus pandémique a commencé bien avant sa détection en avril 2009 selon plusieurs études, au moins plusieurs mois. Certains suggèrent même que ce virus a pu circuler plusieurs années auparavant (Cohen, 2009; Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009a; Smith *et al.*, 2009b). Les analyses phylogénétiques ont révélé une grande homogénéité des séquences durant toute la pandémie. Ce virus est antigéniquement

assez distinct des souches saisonnières humaines A/H1N1 (issues de la pseudopandémie de 1977) mais génétiquement relié à 3 virus circulants chez les porcs auparavant (Figure 18) (Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009b). Les gènes codant pour HA, NP et NS dérivent du lignage A/H1N1 porcin classique. L'HA de ce lignage porcin provient de la grippe A/H1N1 de 1918-1919 qui devint endémique chez le porc et circula en Asie, en Amérique du Nord et en Europe jusqu'en 1979 (Garten *et al.*, 2009; Peiris *et al.*, 2009; Tumpey *et al.*, 2004). Cette année-là, un nouveau lignage A/H1N1 porcin émergea en Europe (lignage eurasien) puis fut détecté en Asie et remplaça rapidement le lignage A/H1N1 porcin classique dans les années 80s (uniquement en Europe). Ce lignage eurasien est le fruit du réassortiment entre un virus aviaire A/H1N1 et un virus du lignage A/H1N1 porcin classique (Brown, 2000; Guan *et al.*, 1996; Pensaert *et al.*, 1981). Ce lignage est à l'origine des gènes codant pour NA et M chez le virus A/H1N1pdm. Enfin les gènes codant pour PA, PB1 et PB2 du virus proviennent du lignage nord américain A/H3N2 'triple-réassortant' qui fut isolé pour la première fois chez le porc en 1998 et qui causa quelques cas d'infections chez l'homme (Newman *et al.*, 2008; Olsen, 2002; Webby *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1999). Le nom de ce lignage est issu de l'héritage de segments du lignage porcin classique, d'un virus aviaire et du virus humains saisonnier A/H3N2. Ainsi, le virus A/H1N1pdm a des gènes issus de virus porcins (deux lignages), humains (A/H3N2) et aviaires. Il est cependant difficile d'évaluer où et quand et entre quels virus le réassortiment à l'origine de ce virus a eu lieu. De plus, on ne sait pas si ce réassortiment a eu lieu une fois ou plusieurs fois (Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2009a).

Le 30 décembre 2009, 208 pays ont déclaré des cas confirmés au laboratoire. La plupart des pays de l'hémisphère Sud détecte durant la vague de grippe hivernale une grande majorité de virus A/H1N1pdm. Dans l'hémisphère Nord, deux vagues se sont succédées. L'intensité de la première fut plus importante dans certains pays comme les Etats-Unis, l'Espagne, la Grande-Bretagne, le Japon et l'Allemagne alors que d'autres pays comme la France n'ont quasiment pas subi cette vague initiale. Dans les tropiques, les taux d'infection ont rapidement augmenté en Amérique centrale et du Sud et en Asie. Très peu de données épidémiologiques sont disponibles sur la dissémination du virus en Afrique (Girard *et al.*, 2010).

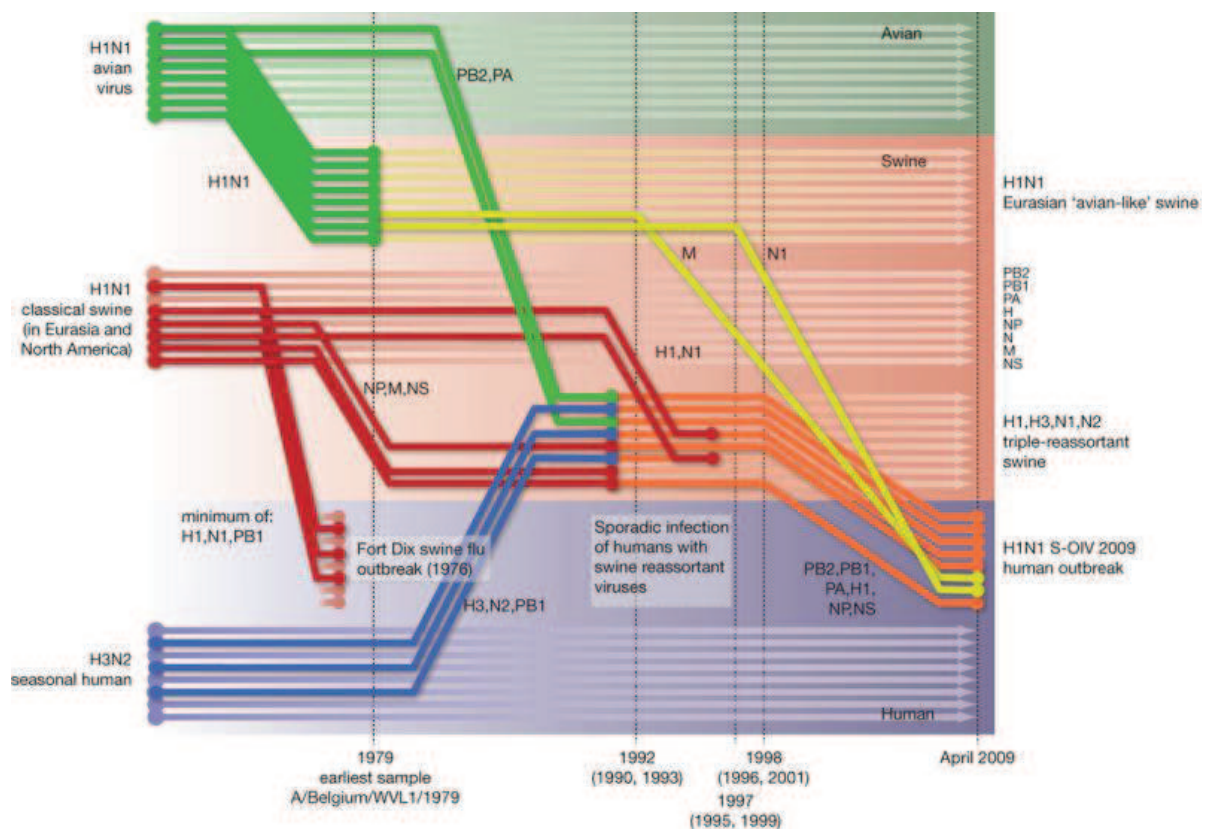
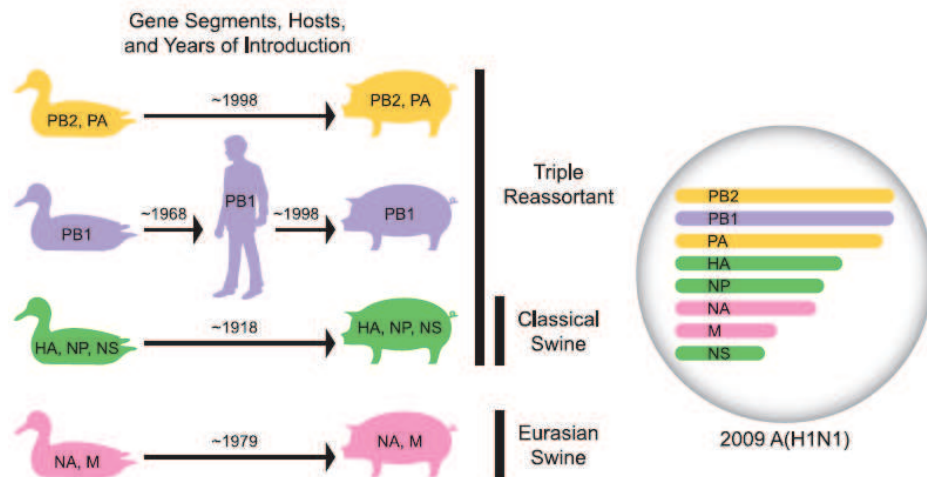


Figure 18 : Origine du virus A/H1N1pdm. La figure permet de dater les différents réassortiments à l'origine de ce virus (Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009b).

La transmission de la grippe A/H1N1pdm dans les foyers fut maximale chez les enfants et minimale chez les adultes de plus de 50 ans. Les taux d'attaque clinique secondaires dans les foyers ont été de 10% (20 à 40% chez les enfants), ce qui est faible comparé aux pandémies précédentes (Bautista *et al.*, 2010; Cauchemez *et al.*, 2009). Les taux de reproduction (nombre moyen de cas secondaires infectés par un cas index) ont été

estimés à 1.3-1.7 selon les données et les méthodes et sont similaires ou très légèrement supérieures à ceux mesurés lors des épidémies de grippe saisonnière et beaucoup plus élevés lors d'épidémies dans les écoles/collèges (3.0-3.6) (Fraser *et al.*, 2009; Lessler *et al.*, 2009; White *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

Une des caractéristiques de cette pandémie est que le virus a infecté essentiellement les enfants et les jeunes adultes chez qui les taux d'attaque les plus élevés ont été mesurés. La protection des personnes de plus de 60 ans est probablement due au fait que ces personnes avaient des anticorps les protégeant de ce nouveau virus pandémique (Bautista *et al.*, 2010). La première étude de séroprévalence menée avec des sérums pré-épidémiques montre qu'environ 33% des personnes de plus de 60 ans ont des anticorps contre le virus A/H1N1pdm (en IHA et microneutralisation), bien que les titres d'anticorps n'augmentent pas significativement après la vaccination contre la grippe saisonnière (CDC, 2009b). Dans une autre étude, une absence d'anticorps neutralisants a été retrouvée chez les personnes nées après 1920 (Itoh *et al.*, 2009).

La grande majorité des personnes contaminées par le virus A/H1N1pdm a présenté une infection respiratoire haute non compliquée. La durée d'incubation a été d'environ 1.5 à 3 jours comme pour la grippe saisonnière. Une infection modérée sans fièvre a été rapportée chez 8% à 32% des personnes infectées. La plupart des patients avait une forme commune de la grippe avec fièvre et toux, les deux signes les plus fréquemment retrouvés. Les signes généraux comme l'asthénie et les myalgies sont également assez fréquemment notés. La seule différence notable avec la grippe saisonnière a été la présence de diarrhée (jusqu'à 25%) et les douleurs abdominales/vomissements chez les adultes (Figure 19) (Bautista *et al.*, 2010).

Les caractéristiques des formes sévères (hospitalisation, hospitalisation en unité de soins intensifs/continus ou en réanimation) observées au cours de cette pandémie sont très proches de celles observées lors des épidémies de grippe saisonnière. Il faut cependant noter que 2/3 des personnes hospitalisées et 40% des patients décédés n'avaient aucune pathologie chronique préexistante. Classiquement, les personnes atteintes de pathologies chroniques (pulmonaires, métaboliques cardiovasculaires, métaboliques, rénales, hépatiques, neurologiques, immunodépression) ont plus de risque d'être hospitalisées et

encore plus de décéder suite à l'infection par les virus A/H1N1pdm. Ainsi, la proportion de personnes ayant une ou plusieurs pathologies chroniques parmi les personnes hospitalisées, hospitalisées en réanimation (soins intensifs/continus ou en réanimation) et décédées est de 31.1% [19.0-47.1%], 52.3% [41.1-57.8%] et 61.8% [48.5-67.9%] respectivement. Les nombreuses études sur les formes sévères ont également mis en évidence que l'obésité morbide était un facteur de risque important d'être hospitalisé, hospitalisé en réanimation (soins intensifs/continus ou en réanimation) et de décéder durant cette pandémie. Ce facteur de risque n'avait jamais été décrit auparavant. De plus, durant cette pandémie, ce sont les enfants de moins de 14 ans et surtout de moins de 5 ans qui étaient le plus à risque d'être hospitalisés (comparé à la population générale), probablement à cause du fait que les adultes et surtout les personnes âgées étaient partiellement protégés contre ce nouveau virus et donc ont été beaucoup moins infectés. Par contre, les personnes de plus de 65 ans et un peu moins de 50 à 64 ans sont les plus à risque (risque relatif 3.3 et 3.1 par rapport à la population générale) de décéder. La grossesse (notamment troisième trimestre de grossesse) a été un facteur de risque important d'hospitalisation (risque relatif 6.8 par rapport aux femmes en âge de procréer). Les études sur le risque de décéder durant la grossesse sont très disparates. L'analyse de l'ensemble des données de plusieurs pays montre qu'il n'est pas plus élevé que chez les femmes en âge de procréer. Cependant, ce risque doit être réévalué et le comité d'experts de l'OMS préconise de considérer pour l'instant ces dernières comme ayant des facteurs de risque pour toutes les formes sévères (Van Kerkhove *et al.*, 2011).

Symptom	Mexico ¹⁴	Japan ¹⁵	United States ²⁴		Mexico ²	China ¹³	Argentina ¹⁴	United Kingdom ¹⁶	
	All Inpatients and Outpatients (N=6376)†	Critically Ill Patients (N=255)	Laboratory-Confirmed Cases (N=217)	Hospitalized Patients <18 Yr Old (N=122)	Hospitalized Patients ≥18 Yr Old (N=150)	Critically Ill Patients (N=18)	Mildly Ill and Isolated Patients (N=426)	Hospitalized Patients <18 Yr Old (N=204)	Hospitalized Patients <17 Yr Old (N=78)
				number (percent)					
Temperature >38°C	2716 (43)	218 (85)	206 (95)	115 (94)	143 (95)	18 (100)	153 (36)	181 (89)	52 (81)
Myalgias	1900 (30)	80 (31)	41 (19)	22 (18)	76 (51)	8 (44)	43 (10)	6 (3)	20‡
Cough	2550 (40)	220 (86)	128 (59)	100 (82)	139 (93)	18 (100)	296 (70)	141 (69)	49 (73)
Headache	2480 (39)	75 (29)	28 (13)	24 (20)	68 (45)	4 (22)	83 (20)	6 (3)	19‡
Nasal congestion	1390 (22)	21 (8)	72 (33)	NA	NA	NA	68 (16)	NA	NA
Rhinorrhea	2104 (33)	63 (25)	72 (33)	55 (45)	48 (32)	5 (28)	101 (24)	63 (31)	45 (62)
Sore throat	1384 (22)	40 (16)	85 (39)	38 (31)	46 (31)	NA	156 (37)	8 (4)	26‡
Dyspnea	472 (7)	176 (69)	NA	52 (43)	110 (73)	18 (100)	NA	163 (80)§	30‡¶
Wheezing	NA	NA	NA	31 (25)	41 (27)	2 (11)	NA	24 (12)	20‡
Diarrhea	261 (4)	22 (9)	13 (6)	28 (23)	38 (25)	4 (22)	12 (3)	17 (8)	20‡
Abdominal pain or vomiting	625 (10)	26 (10)	5 (2)	39 (32)	39 (26)	NA	8 (2)	20 (10)	NA

Figure 19 : Profil des symptômes observés chez les patients infectés par le virus A/H1N1pdm dans le monde (Bautista *et al.*, 2010).

La principale forme clinique conduisant à l'hospitalisation des patients en réanimation (soins intensifs/continus ou en réanimation) fut la pneumonie virale primaire diffuse associée à une sévère hypoxémie, un syndrome de détresse respiratoire aigue et parfois à un syndrome de choc et de défaillance rénale. Ce syndrome a été retrouvé chez 49% à 72% des patients infectés par A/H1N1pdm admis dans ces services de réanimation. L'installation de la pneumonie virale primaire et de ces symptômes est généralement brutale et survient 4 à 5 jours après l'apparition des symptômes de la grippe. L'intubation des patients a souvent été nécessaire dans les 24 heures suivant l'admission des patients (Bautista *et al.*, 2010). Les services de réanimation ont eu souvent recours à l'oxygénation extracorporelle (ECMO) pour traiter ces patients (Noah *et al.*, 2011). La mortalité des patients admis en réanimation a été d'environ 20%-50% (Davies *et al.*, 2009; Gauzere *et al.*, 2011; Skarbinski *et al.*, 2011).

Le nombre officiel de morts parmi les patients infectés par le virus A/H1N1pdm dans le monde est de 17483 selon les chiffres de l'OMS au 28 mars 2010 (www.who.int). Cependant et comme pour la grippe saisonnière chaque année, on sait que le nombre réel de morts dépasse généralement largement le nombre de morts déclarés (patients diagnostiqués positifs pour le virus A/H1N1pdm). En effet, de nombreuses morts ne sont pas

ou sont mal déclarées. De plus, la grippe n'est pas toujours recherchée quand les symptômes sont atypiques ou lorsque les symptômes ont cessé, et pour ces derniers, le test de recherche peut s'avérer négatif alors que le patient a bien été infecté par le virus grippal. Enfin, dans de nombreux pays, les systèmes de surveillance et de veille sanitaire ne fonctionnent pas toujours de façon efficiente (Girard *et al.*, 2010). Le nombre de patients hospitalisés et décédés est souvent extrapolé à partir des données obtenues (incidence, nombre déclarés d'hospitalisations et de décès etc.). Au tout début de la pandémie, lorsque très peu de données étaient alors disponibles, le taux de mortalité chez les personnes infectées a été estimé à moins de 0.5% (valeurs allant de 0.0004% à 1.47%) reflétant bien l'incertitude de ces différentes estimations. Avec les données de la première vague aux Etats-Unis et en Angleterre, les taux de mortalité ont été estimés à 0.048% (1 pour 2100) (Presanis *et al.*, 2009) et 0.026% (1 pour 3850) respectivement (Donaldson *et al.*, 2009). Ces valeurs sont comparables à celles de la grippe saisonnière, mais ce qui caractérise cette mortalité est qu'elle touche essentiellement les enfants et les jeunes adultes. Ainsi, approximativement 90% des décès sont survenus chez des personnes de moins de 65 ans, alors qu'elles représentent la majorité des personnes décédées lors des épidémies de grippe saisonnière (Bautista *et al.*, 2010). Deux autres études qui utilisent les données des deux vagues successives aux Etats Unis estiment que 12000 à 15000 personnes infectées sont décédées et qu'environ 70% à 90% d'entre elles avaient moins de 65 ans (dont environ 9000 décès soit 60% chez les 24-64 ans). Une de ces deux études estime également que plus de 60 millions d'américains ont été infectés durant cette période (environ 20% de la population) et que plus de 270000 d'entre eux ont été hospitalisés (environ une pour 220 infections). La mortalité estimée aux Etats-Unis est ainsi très proche de celle causée par les épidémies de grippe saisonnière (proche des valeurs moyennes de la grippe A/H3N2) (Figure 20) (Armstrong *et al.*, 2011; Shrestha *et al.*, 2011).

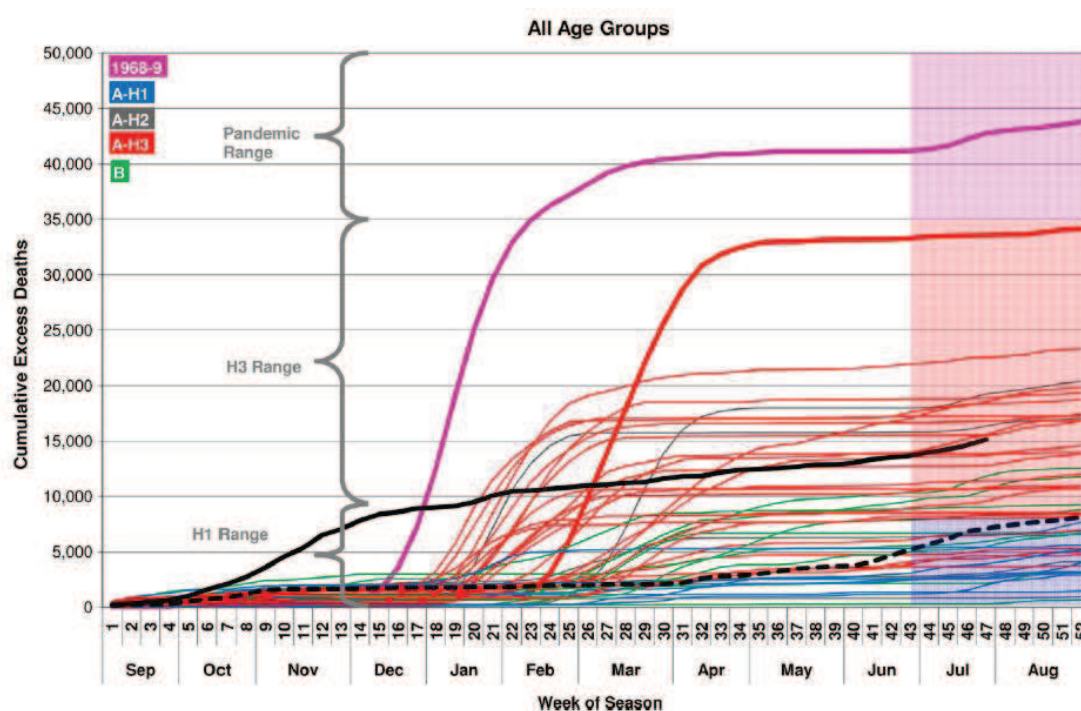


Figure 20 : Mortalité cumulative estimée au cours du temps aux Etats-Unis de 1962-1963 à 2009-2010. En rouge : A/H3N2 saisonniers (rouge gras : 1975-76). En bleu : A/H1N1 saisonniers. En vert : gripes B. En violet gras : vague pandémique de 1968-69. En noir gras : A/H1N1pdm. En pointillés noirs : A/H1N1 en 2008-09 (Armstrong *et al.*, 2011).

En France, le réseau sentinelles (gripes cliniques chez les médecins généralistes) estime que 3.5 millions de personnes infectées sont allées consulter dont parmi elles seulement 2% étaient âgées de plus de 65 ans. L'InVS (Institut de veille sanitaire) estime quand à lui que 5.1 millions de personnes ont été malade durant la pandémie de 2009-10 (environ 8% de la population). On estime à 35000, le nombre de personnes hospitalisées en France durant la pandémie et seulement 4% d'entre elles avaient plus de 65 ans. Le nombre de décès déclarés chez les personnes infectées était de 312 au 20 avril 2010 (Bonmarin *et al.*, 2010). Cependant, si l'on extrapole les données des Etats-Unis à la France en se basant sur 5.1 millions de personnes infectées ou 35000 hospitalisations, on trouve que environ 1000 ou 1600 personnes infectées par le nouveau virus A/H1N1pdm sont décédées au cours de la pandémie de 2009-10.

III. RESULTATS

A. Article 1: Novel virus influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009.

Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, Salez N, Mantey K, Resseguier N, Gazin C, Raoult D, Charrel RN, de Lamballerie X.

1. Avant propos

Le 21 avril 2009, le CDC d'Atlanta annonce la détection d'un nouveau variant de grippe A d'origine porcine qui cause une large épidémie au Mexique. Deux cas d'infection par ce nouveau variant ont également été détectés aux Etats-Unis. Le 27 avril, l'OMS déclare : "Le Directeur général a décidé de faire passer le niveau d'alerte à la pandémie de grippe de la phase 3 actuellement en vigueur (à cause du virus A/H5N1 hautement pathogène) à la phase 4. Le passage à une phase d'alerte pandémique supérieure signifie que la probabilité d'une pandémie a augmenté, mais non qu'une pandémie est inévitable." (http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090427/fr/index.html).

En France, la définition des cas probables et les recommandations pour leur prise en charge sont données par les autorités sanitaires le 26 avril (InVS & CNR-grippe, 2009). Ce dispositif prévoit entre autres le dépistage systématique des cas probables uniquement par les différents laboratoires de niveau A des 7 zones de défense du territoire national (cf. figure 1, article 5) afin de limiter au plus la diffusion du virus dans la population grâce à la mise en place de mesures d'isolement des patients notamment. Le laboratoire de virologie des Hôpitaux de Marseille (Fédération de Microbiologie Clinique, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, service du Pr. Didier Raoult) est le laboratoire de niveau A de la zone sud qui compte environ 8 millions d'habitants. A cet instant, très peu d'informations sont disponibles sur la transmissibilité et la dangerosité de ce nouveau virus et les prélèvements sont traités au laboratoire sécurisé de niveau P3 (Biosafety Level 3 laboratory).

Début juillet, la multiplication du nombre de cas secondaires et les informations disponibles sur la pathogénicité du virus A/H1N1pdm ont conduit à l'abandon du dépistage systématique de tous les cas probables. Durant cette seconde période qui commença réellement à Marseille le 14 juillet, les critères pour décider de tester ou non les cas

probables étaient beaucoup moins clairs et la décision était donc médecin/service dépendant. Jusqu'au 31 août 2009, le laboratoire de virologie des hôpitaux de Marseille a traité plus de 1800 prélèvements parmi lesquels 236 étaient positifs pour le nouveau virus A/H1N1pdm. Durant cette même période, nous avons également isolé puis caractérisé deux souches A/H1N1pdm, recherché un panel de virus respiratoires dans les 99 premiers échantillons traités, évalué la prévalence des anticorps dirigés contre le virus A/H1N1pdm avant la pandémie sur des sérums conservés au laboratoire et investigué avec la cellule interrégionale d'épidémiologie (Cire) Sud des cas groupés survenus dans une colonie de vacances en juillet 2009. En septembre 2009, nous avons décidé de publier l'ensemble de nos résultats de laboratoire et toutes ces investigations menées en parallèle durant cette même période. L'article a été soumis le 12 novembre 2009 et a été publié en février 2010 dans PLoS One.

2. Article

Novel virus influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009.

Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, Salez N, Mantey K, Resseguier N, Gazin C, Raoult D, Charrel RN, de Lamballerie X.

Unité Mixte de Recherche 190: Unité des Virus Emergents, Université de la Méditerranée et Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France.

PLoS One. 2010 Feb 17;5(2):e9214.

Résumé:

BACKGROUND: In April 2009, the first cases of pandemic (H1N1)-2009 influenza [H1N1sw] virus were detected in France. Virological surveillance was undertaken in reference laboratories of the seven French Defence Zones.

METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS: We report results of virological analyses performed in the Public Hospitals of Marseille during the first months of the outbreak. (i) Nasal swabs were tested using rapid influenza diagnostic test (RIDT) and two RT-PCR assays. Epidemiological characteristics of the 99 first suspected cases were analyzed, including detection of influenza virus and 18 other respiratory viruses. During three months, a total of 1,815 patients were tested (including 236 patients infected H1N1sw virus) and distribution in age groups and results of RIDT were analyzed. (ii) 600 sera received before April 2009 and randomly selected from in-patients were tested by a standard hemagglutination inhibition assay for antibody to the novel H1N1sw virus. (iii) One early (May 2009) and one late (July 2009) viral isolates were characterized by sequencing the complete hemagglutinine and neuraminidase genes. (iiii) Epidemiological characteristics of a cluster of cases that occurred in July 2009 in a summer camp were analyzed.

CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE: This study presents new virological and epidemiological data regarding infection by the pandemic A/H1N1 virus in Europe. Distribution in age groups was found to be similar to that previously reported for seasonal H1N1. The first seroprevalence data made available for a European population suggest a previous exposure of individuals over 40 years old to influenza viruses antigenically related to the pandemic (H1N1)-2009 virus. Genomic analysis indicates that strains harbouring a new amino-acid pattern in the neuraminidase gene appeared secondarily and tended to supplant the first strains. Finally, in contrast with previous reports, our data support the use of RIDT for the detection of infection in children, especially in the context of the investigation of grouped cases.

Novel Virus Influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009

Antoine Nougairède^{1,2,3}, Laetitia Ninove^{1,2,3}, Christine Zandotti², Nicolas Salez¹, Karine Mantey³, Noémie Resseguier³, Céline Gazin², Didier Raoult², Rémi N. Charrel^{1,2}, Xavier de Lamballerie^{1,2*}

1 Unité Mixte de Recherche 190: Unité des Virus Emergents, Université de la Méditerranée et Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France, **2** Laboratoire de Virologie, Pôle Hospitalier de Microbiologie et Maladies Infectieuses (Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille), Marseille, France, **3** South Interregional Epidemiology Unit, French Institute for Public Health Surveillance, Marseille, France

Abstract

Background: In April 2009, the first cases of pandemic (H1N1)-2009 influenza [H1N1sw] virus were detected in France. Virological surveillance was undertaken in reference laboratories of the seven French Defence Zones.

Methodology/Principal Findings: We report results of virological analyses performed in the Public Hospitals of Marseille during the first months of the outbreak. (i) Nasal swabs were tested using rapid influenza diagnostic test (RIDT) and two RT-PCR assays. Epidemiological characteristics of the 99 first suspected cases were analyzed, including detection of influenza virus and 18 other respiratory viruses. During three months, a total of 1,815 patients were tested (including 236 patients infected H1N1sw virus) and distribution in age groups and results of RIDT were analyzed. (ii) 600 sera received before April 2009 and randomly selected from in-patients were tested by a standard hemagglutination inhibition assay for antibody to the novel H1N1sw virus. (iii) One early (May 2009) and one late (July 2009) viral isolates were characterized by sequencing the complete hemagglutinine and neuraminidase genes. (iiii) Epidemiological characteristics of a cluster of cases that occurred in July 2009 in a summer camp were analyzed.

Conclusions/Significance: This study presents new virological and epidemiological data regarding infection by the pandemic A/H1N1 virus in Europe. Distribution in age groups was found to be similar to that previously reported for seasonal H1N1. The first seroprevalence data made available for a European population suggest a previous exposure of individuals over 40 years old to influenza viruses antigenically related to the pandemic (H1N1)-2009 virus. Genomic analysis indicates that strains harbouring a new amino-acid pattern in the neuraminidase gene appeared secondarily and tended to supplant the first strains. Finally, in contrast with previous reports, our data support the use of RIDT for the detection of infection in children, especially in the context of the investigation of grouped cases.

Citation: Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, Salez N, Mantey K, et al. (2010) Novel Virus Influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009. PLoS ONE 5(2): e9214. doi:10.1371/journal.pone.0009214

Editor: Ding Xiang Liu, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore

Received: November 12, 2009; **Accepted:** January 25, 2010; **Published:** February 17, 2010

Copyright: © 2010 Nougairède et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study has been partly funded by AP-HM Public Hospital system and by Université de la Méditerranée. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: xavier.de-lamballerie@univmed.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The first cases of the new H1N1 pandemic influenza virus (H1N1sw), in metropolitan France, were detected in April 2009 in patients returning from Mexico. Systematic analysis of suspected cases [1] was undertaken and the virus was identified, using molecular methods, in the Public Hospital virology “Level A” laboratories of the seven French Defence Zones. Accordingly, samples from the Southern Defence Zone (a large geographical region encompassing Corsica and the Mediterranean coastal zone from the Spanish border to the Italian border with approximately 8 million inhabitants), were received and analysed in our department, at the Virology Level A laboratory of the Public Hospitals of Marseille.

The current study refers to samples received between the end of April and the end of August 2009. During the first period (until

mid-July), samples were systematically collected using strict and identical criteria, mainly based either on the presence of an acute respiratory illness and recent travel history in an affected area, or on contact with a confirmed or suspected case. During the second period, biological confirmation of suspected cases was no longer required and criteria used for requesting biological diagnosis (grouped cases, severe or atypical presentations, pre-existing condition etc.) were more heterogeneous.

Here, we present the results of virological analyses performed during the first three months that followed the introduction of the novel H1N1sw pandemic influenza variant in metropolitan France. This included the detection and characterization of influenza viruses, the evaluation of rapid Influenza detection tests (RIDTs) detection of the H1N1sw pandemic variant, the detection of other respiratory viruses and the investigation of grouped cases. In addition, the distribution of specific antibody to the new virus

was investigated according to age groups in a sample of 600 individuals. Altogether, these data shed new light on the determinants of the epidemiological distribution of viral infection in the French population.

Methods

Samples Collected between April 25th, 2009 and August 31st, 2009

The biological material studied here was used only for standard diagnostic procedures following physicians' prescriptions (no specific sampling, no modification of the sampling protocol). Analysis of data was performed using an anonymized database. Following local regulations, this procedure did not require a specific consent from patients.

Nasal swabs received between April 25th, 2009 and August 31st, 2009 were included in the study (see figure 1). Until mid-July 2009, criteria used for sample collection were strict and identical for all patients: a possible case was defined as a person with acute respiratory illness (defined as the occurrence of fever ($>38^{\circ}\text{C}$) or myalgia or asthenia and at least one respiratory symptom (cough or dyspnoea) and a history of travel in an affected area or a history of close contact with a confirmed or possible case one day to seven days before the onset of symptoms. In order to capture cases from previously undetected chains of transmission, clusters of acute respiratory illness defined as at least three cases in a week in closed communities were also to be notified [1]. During the subsequent period, criteria used for requesting biological diagnosis were modified. The biological confirmation of suspected cases was no longer systematic, an increasing number of patients with influenza-like presentation and no history of travel abroad or contact with documented cases was tested, including grouped cases, severe or atypical presentations, patients with pre-existing condition etc. In addition, a Point Of Care (POC) strategy was applied from June 23rd for the Public Hospitals of Marseilles [2] (see figure 1).

Accordingly, three different panels were studied: (i) The first 99 samples collected until June 15th, 2009 using the systematic criteria for suspected cases reported above in the Southern Defence Zone (Panel A). (ii) All 280 samples collected from April 25th, 2009 to July 13th, 2009 using the systematic criteria for suspected cases reported above in the Southern Defence Zone (Panel B). (iii) The total of all 1,815 samples collected by our group during the study period (Panel C, see figure 1).

All samples were tested for the presence of Influenza A virus using a pan-influenza A real time PCR technique as described elsewhere [3] and a second real time PCR specific for the new

H1N1 variant [1]. In addition, the first 99 samples collected (Panel A) were also tested by real time PCR techniques for the presence of a panel of 18 different respiratory viral pathogens [3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16] (see table 1).

Viral Loads, RIDTs

During the period of study, 1808 samples received in our department were tested using the Directigen "BD EZ A+B" (Becton Dickinson & company) RIDT for the detection of influenza A and B antigens.

The H1N1sw viral load was investigated in 41 positive samples by re-extracting samples and amplifying them simultaneously using a probe-based real time RT-PCR technique [1], and quantified by serial dilutions of a positive control based on synthetic RNA. The relationship between viral load and RIDT result was then analysed.

Investigation of Virus Infection in a Summer Camp

The investigation protocol presented here was elaborated by the French "Institut National de Veille Sanitaire" and validated by the Ethic Committee "CPP Ile-de-France IX".

In July 2009, a cluster of cases in a summer camp in Barcelonnette (Alpes-de-Haute-Provence, France) was investigated. Case definition for analysis was as follows: possible cases were individuals with acute respiratory syndrome (coughing or dyspnoea) + a general presentation of viral infection (fever $>38^{\circ}\text{C}$, or asthenia or myalgia); probable cases were possible cases who had a close contact with a confirmed case (in the period encompassing 2 days before and 7 days after the onset of the first symptom of this confirmed case; confirmed cases were possible or probable cases with microbiological confirmation (positive RT-PCR from nasal swab).

All 94 children (6 to 14 years old, median: 10) had arrived in the summer camp on July 20th. They were supervised by 28 adults (16 counsellors or members of the management team and 12 technical agents, *i.e.* kitchen and cleaning staff).

During the investigation process, one nasal swab could be sampled from 95% of probable cases and 85% of "non-cases". Samples were submitted to H1N1sw detection using the same RT-PCR methods as reported above.

Prevalence of Antibodies to the New H1N1 Variant

This research protocol was approved by the Departmental (IFR48) Ethic Committee and did not require patient consent. Only biological archival material was used (no specific sampling, no modification of sampling procedures). All information contained in databases was de-identified.

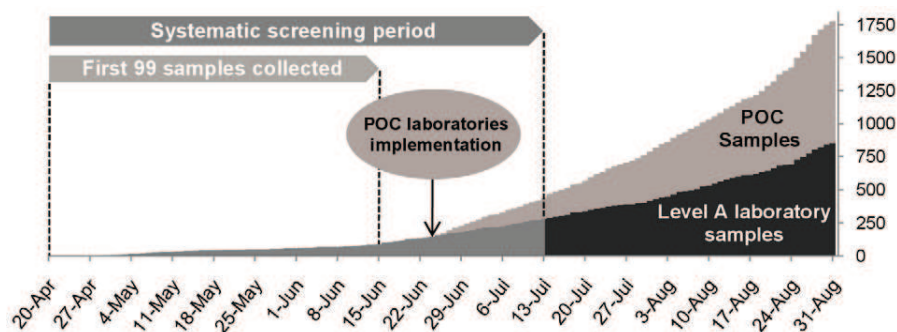


Figure 1. Samples tested from April to August 2009. Panel A corresponds to Level A laboratory samples (N=99) tested between April 25th 2009 and June 15th 2009. Panel B corresponds to Level A laboratory samples (N=280) tested between April 25th 2009 and July 13th 2009. Panel C corresponds to all samples (N=1,815) tested between April 25th 2009 and August 31st 2009, including Point of Care (POC) samples. doi:10.1371/journal.pone.0009214.g001

Table 1. Etiology of viral respiratory infections in Panel A.

Viral etiology	Number	Country	Detection protocol
Influenza virus A virus H1N1sw 2009	15	UK (1), USA (4), Spain (1), Canada (3), Mexico (2), France (4)	Ninove L, Vector Borne Zoonotic Dis. 2009
Influenza virus A virus H3N2	2	UK (1), USA (1)	Van Elden L.J.R, J Clin Microbiol. 2001
Influenza virus B virus	0	/	Van Elden L.J.R, J Clin Microbiol. 2001
Influenza virus C virus	0	/	Gouarin S, J Med Virol. 2008
Rhinovirus	5*	USA (1), France (3), Japan (1)	Garbino J, Am J Respir Crit Care Med. 2004
Metapneumovirus	2*	UK (1), France (1)	Mackay IM, J Clin Microbiol. 2003
Respiratory Syncytial Virus A/B	0	/	Van Elden L.J.R, J Clin Microbiol. 2003
Human Coronavirus 229E	1*	Canada (1)	Van Elden L.J.R, J Infect Dis 2004
Human Coronavirus OC43	2	USA (2)	Van Elden L.J.R, J Infect Dis 2004
Human Coronavirus NL63	0*	/	Tiveljung-Lindell A, J Med Virol. 2009
Human Coronavirus KU1	0	/	Tiveljung-Lindell A, J Med Virol. 2009
Enterovirus	1	France (1)	Dierssen U, J Clin Virol. 2008
Parechovirus	0	/	Benschop K, J Clin Virol 2008
Polyomavirus KI	0	/	Lindau C, J Clin Virol. 2009
Polyomavirus WU	1*	USA (1)	Lindau C, J Clin Virol. 2009
Parainfluenza virus 1/2/3/4	5	USA (2), Mexico (2), Unknow (1)	Tong S, J Clin Microbiol. 2008
Bocavirus	4	France (2), Australia (1), Unknow (1)	Allander T, Clin Infect Dis. 2007
Cytomegalovirus	0	/	Griscelli F, J Clin Microbiol. 2001
Human Coronavirus 229E + Polyomavirus WU	1	USA (1)	/
Human Coronavirus NL63 + Rhinovirus	1	Mexico (1)	/
Metapneumovirus + Polyomavirus WU	1	Mexico (1)	/
Negative samples	58	UK (2), USA (15), Spain (3), Canada (4), Mexico (14), France (15), Unknown (5)	/
Total number	99	/	/

The etiological agent, the number of cases, the geographical origin of patients returning from abroad and the references for the methods used for molecular diagnosis are indicated.

*: see also multiple infections.

doi:10.1371/journal.pone.0009214.t001

A collection of 3,000 sera received between January 2009 and March 2009 (before the detection of the first cases of H1N1sw infections on the French territory) in our laboratory for performing a variety of serological investigations was established. Six hundred sera distributed in 4 age groups (0–19, 20–39, 40–59 and >60) were randomly selected in this collection, until an equal number of 150 sera in each age group was reached.

Antibodies to the new H1N1sw virus were detected and quantified by the standard hemagglutination inhibition (HI) technique. The antigen was prepared from cell culture supernatant medium obtained following a seven-day propagation of strain OPYFLU-1 at high m.o.i. onto MDCK cells. Serial dilutions of heat-decomplemented serum (1/20–1/5,120), four viral hemagglutinating units and a suspension of human erythrocytes (group O, final concentration: 0.5%) were used in a final volume of 50 µL. In addition, a subgroup of 300 randomly selected human serum samples was tested using antigens from seasonal influenza viruses, *i.e.* one strain of seasonal H1N1 (Marseille-2007), and one strain of seasonal H3N2 (Marseille-2008).

Sequence Analysis

The complete sequence of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of two different H1N1sw strains were analysed. Strain OPYFLU-1 was isolated from nasal swabs sampled from a young adult male patient returning from

Mexico in early May 2009, following inoculation onto MDCK cells. Strain OPYFLU-58 was isolated from a case of autochthonous viral transmission (teenager, male) in late July. After RNA extraction from infected cell culture supernatant medium using the EZ1 Biorobot and the virus mini kit (both from Qiagen), one-step RT-PCR reactions were performed using the Access RT-PCR Core Reagents Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) on TProfessional Standard Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH Goettingen Germany) and H1N1sw specific primers available upon request to the corresponding author [17] (WHO Genome Primers). PCR-fragments of 1,809 (HA gene) and 1,362 nucleotides (NA gene) were obtained and sequenced (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data from sequencing reactions were combined for analysis and edited using the Sequencer 4.7 software (Gene Codes Corporation).

Sequences were analysed and compared with H1N1sw 2009 HA and NA sequences available in databases at mid-October 2009. Complete HA and NA amino-acid sequences were aligned with ClustalX [18] and phylogenetic trees were built using nucleotide or amino-acids alignments with MEGA version 4.1 [19] using various methods (Neighbor-Joining, Maximum Parsimony and UPGMA) with 1,000 bootstrap replicates.

Results

First 99 Samples Collected from Suspected Cases in the Southern Defence Zone (Panel A)

All 99 samples were collected from symptomatic patients returning from abroad (Mexico (n = 20), USA (n = 27), Canada (n = 8), Japan (n = 1), Australia (n = 1), UK (n = 5), Spain (n = 4), unknown (n = 7), see table 1) or who had close contact with a patient returning from abroad (26 patients). The median age was 33 (range: 0–76 years) and the m/f sex ratio was 0.94. The distribution in age groups (see figure 2A) demonstrates that the majority of travellers were in the 20–60 years old age group with a limited number of patients under 20 and above 60. Most of the children tested were less than 5 years old.

Results are detailed in table 1 and show that in 41% of cases, one or several possible viral etiologic agents were identified. The pandemic influenza virus was found in 15% of cases but rhinoviruses, pneumoviruses, coronaviruses, enteroviruses, poly-

omaviruses, and parainfluenza viruses could also be identified. No case of multiple infection implicating influenza and another agent was detected. Among H1N1sw positive patients, the median age was 32 and the sex ratio was 0.75.

The distribution of respiratory viral pathogens detected in age groups is detailed in figure 2B. The percentage of etiological identification (including the percentage of H1N1sw detection) was similar in all age groups. Most of the cases of H1N1sw infection (11 out of 15, *i.e.* 73%) were found in the 20–60 age group (which included 70% of the samples studied), while 20% of cases were identified in the group of patients less than 20 years old (which included 18% of the samples studied).

Samples Collected for the Documentation of Suspected Cases (Panels B and C).

Panel B included 280 samples collected between April 25th, 2009 and July 13th, 2009 using the systematic criteria for suspected

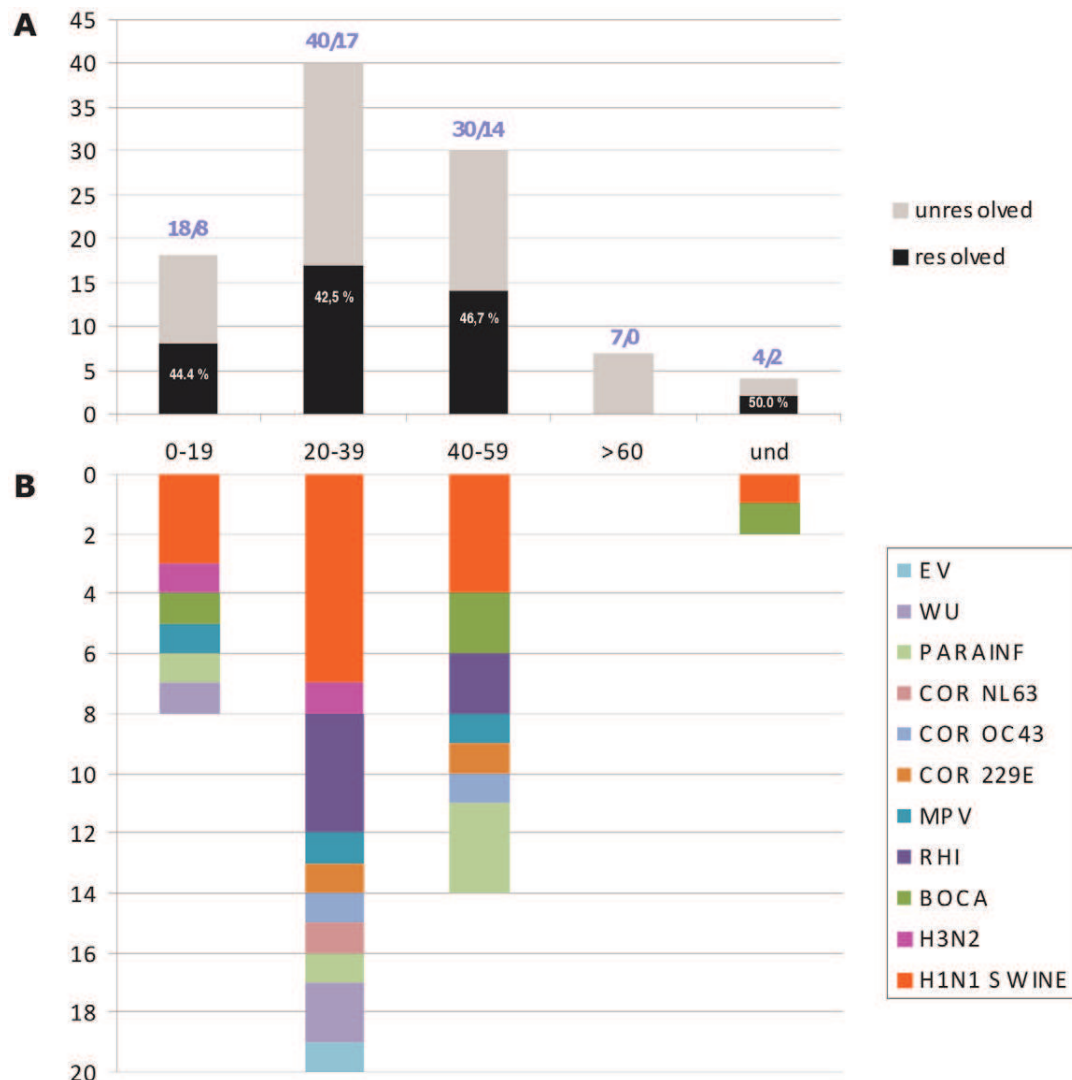


Figure 2. Etiology of viral respiratory infections in Panel A by age groups. Figure 2A shows the distribution in age groups of suspected cases tested/positive for H1N1sw. Figure 2B details the different etiologies in each age group. *: includes 3 co-infections. EV: enteroviruses; WU: WU polyomavirus; PARAINF: parainfluenza viruses 1/2/3/4; COR NL63: human coronavirus NL63; COR OC43: human coronavirus OC43; COR 229E: human coronavirus 229E; MPV: human metapneumovirus; RH: rhinoviruses; BOCA: bocaviruses; H3N2: influenza A virus H3N2; H1N1: influenza A virus H1N1sw. Und: undetermined. doi:10.1371/journal.pone.0009214.g002

cases reported above. The sex ratio was 1.06 and the median age was 33 (range: 0–90 years), *i.e.* similar to that of panel A. The distribution in age groups is reported in figure 3A for 270 patients of known age and shows the lowest numbers under 10 years of age (10%) and over 60 (10%), and also a first readjustment compared with panel A: the number of samples tested in the 10–19 age group increased (13%) and the highest rate of positive H1N1sw diagnosis (above 30%) was observed in this group. Overall, 65% of H1N1sw cases were identified in patients 10–39 years old, explaining the

decreased observed median age (25.5) amongst H1N1sw positive patients. The sex ratio in H1N1sw patients was 0.96.

Panel C included all 1,815 nasal swabs tested between April 25th 2009 and August 31st 2009 in our laboratory, received either from the general survey of the population within the Southern Defence Zone or from patients hospitalised in the Public Hospitals of Marseilles. The sex ratio was 1.03 and the median age was 24 (range: 0–98 years), *i.e.* lower than in panels A and B. The distribution in age groups (see figure 3B which includes 1,779

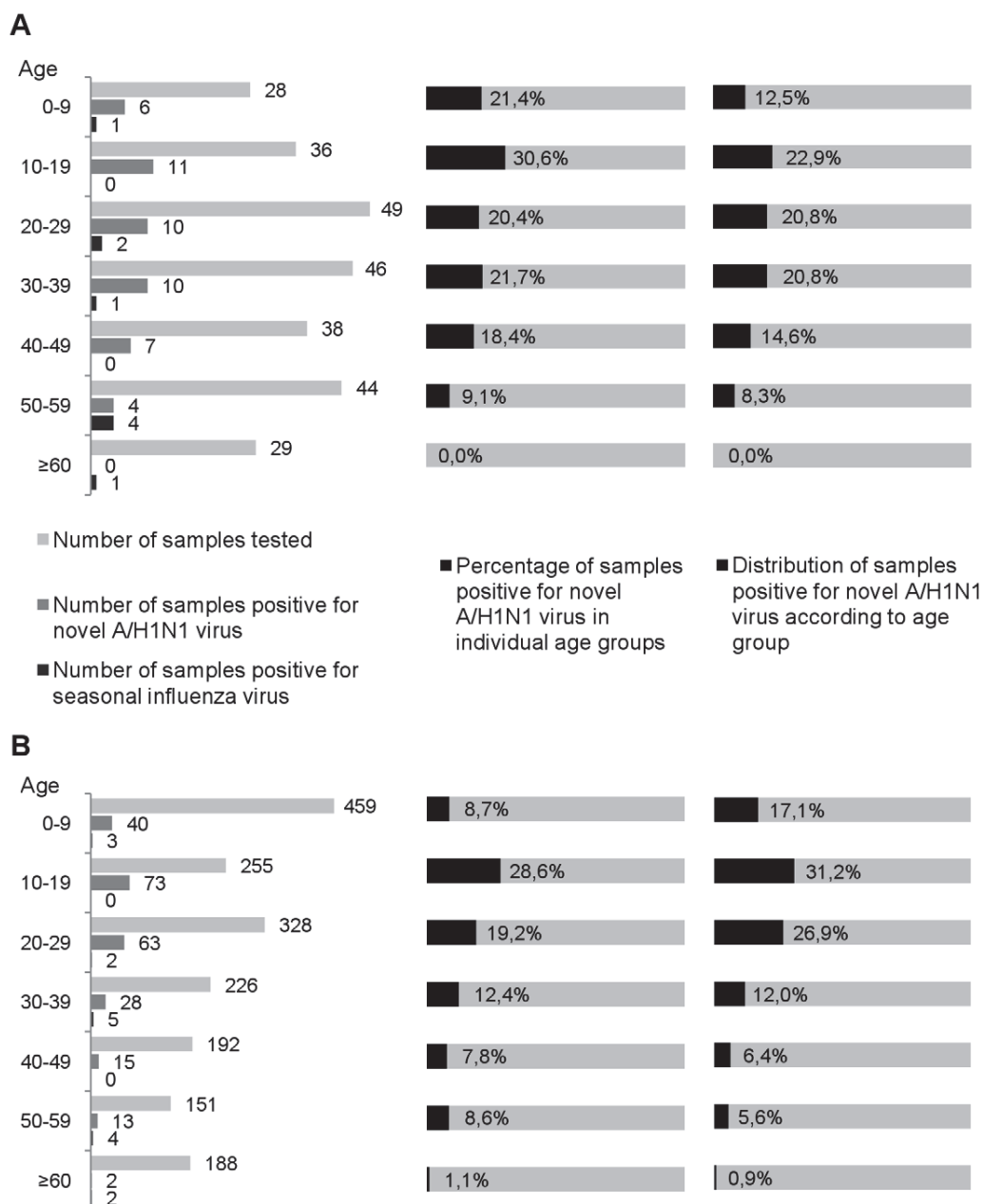


Figure 3. Distribution of cases in age groups for Panel B and C. Figure 3A and 3B show the distribution of cases in age groups for the Panel B and C respectively. The figure includes only patients whose age was known (270 patients from Panel B and 1799 in Panel C). The column on the left shows the number of samples tested, positive for H1N1sw or positive for seasonal H3N2 virus in each age group. The column in the middle shows the percentage of samples testing positive for H1N1sw in each age group. The column on the right shows the distribution of positives in the different age groups.

doi:10.1371/journal.pone.0009214.g003

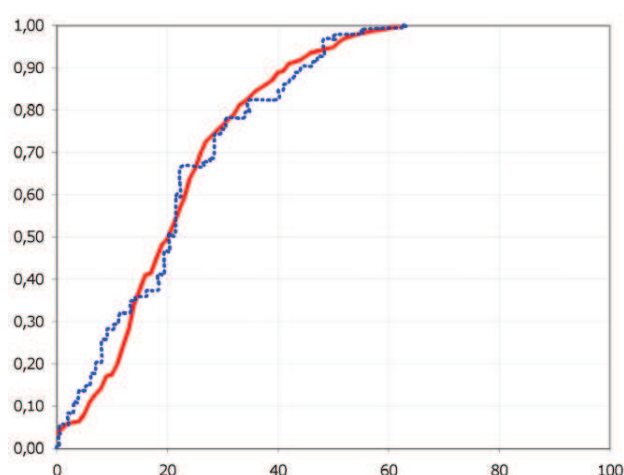


Figure 4. Empirical cumulative distribution of ages for patients with seasonal H1N1 or novel H1N1sw virus. We show the empirical cumulative distribution of ages for patients with seasonal H1N1 (blue) in New York State during the 2006–2007 and 2007–2008 influenza seasons and for H1N1sw (red) in Panel C.
doi:10.1371/journal.pone.0009214.g004

patients of known age) reveals that the number of tests performed for children under the age of 10 increased sharply (25%), and remained limited for patients over 60 years old (10%). Again, the highest rate of positive H1N1sw diagnosis was observed in the age group 10–19 years old. Approximately 50% of all infections were found in patients under the age of 20 (median age of H1N1sw positive patients: 21; sex ratio: 1.07) and very few cases (less than 1%) were identified in patients over 60 years old. This distribution is strikingly similar (see figure 4) to the picture of the distribution of H1N1 seasonal influenza reported by [20] in various geographical locations and periods of time, but also very different from the distribution reported by the same authors for H3N2 viruses (which included a significantly higher number of cases in the elderly).

Statistical analysis showed a different distribution of positives in different age groups: the number of cases was significantly lower in patients over 40 years old (Panel B, $p = 0.005$; Panel C, $p < 0.0001$) compared with younger patients.

Figure 5 shows the evolution of the situation over time in Panel C. Interestingly, the proportion of influenza infections caused by seasonal H3N2 constantly decreased during the period of the study (final value $< 5\%$), but the absolute number of cases observed weekly remained roughly constant, suggesting that seasonal influenza circulated at low rate during this summer period (a phenomenon never observed previously and which may reflect the previous poor performance of the routine surveillance systems implemented for respiratory infections) and that this circulation was not markedly modified by the increasing number of cases of H1N1sw infections.

Viral Loads, Results of RIDTs

Analysis of the results of RIDT for the detection of influenza A and B antigens showed that no false positive was identified (Specificity and Positive Predictive Value = 100%), but false negative results were encountered. Accordingly, the relationship between age, viral load and result of RIDTs was investigated. First, amongst 233 samples positive for H1N1sw based on RT-PCR techniques, the distribution of positive RIDTs in age groups was examined (see figure 6A). This revealed an optimal sensitivity ($\sim 75\%$) in patients younger than 15 ($p < 0.001$, compared with other age groups) and a poor sensitivity in patients over 45 ($< 25\%$).

The relationship between viral load and RIDT result was then analysed (see figure 6B). This revealed that samples with high viral loads (> 10 million copies/mL) could be constantly detected by the BD RIDT. The sensitivity of the RIDT test decreased with viral load and no positive result was obtained for samples with viral loads < 0.11 million copies/mL. The relationship between viral load and results of RIDT was supported by statistical tests.

Overall the strong relationship between positive RIDTs and high viral loads on the one hand, and the group of patients in the age group 0–15 on the other hand, strongly suggests that viral excretion is more pronounced in children, in accordance with previous results obtained for seasonal influenza [21,22].

Investigation of Virus Infection in a Summer Camp

45 persons met the definition of probable or confirmed cases. They all reported coughing and 82% reported fever $> 38^\circ\text{C}$ (see table 2). Thirty six cases were children (median age: 11; extremes: 8–13) and 9 were adults (median age: 22; extremes: 19–50). There

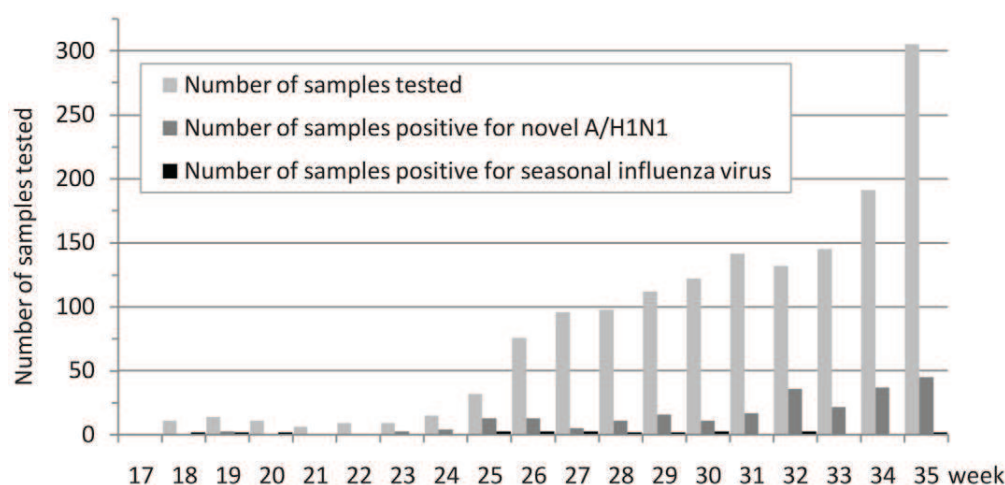


Figure 5. Weekly distribution of samples tested and samples positive for H1N1sw or seasonal H3N2 virus.
doi:10.1371/journal.pone.0009214.g005

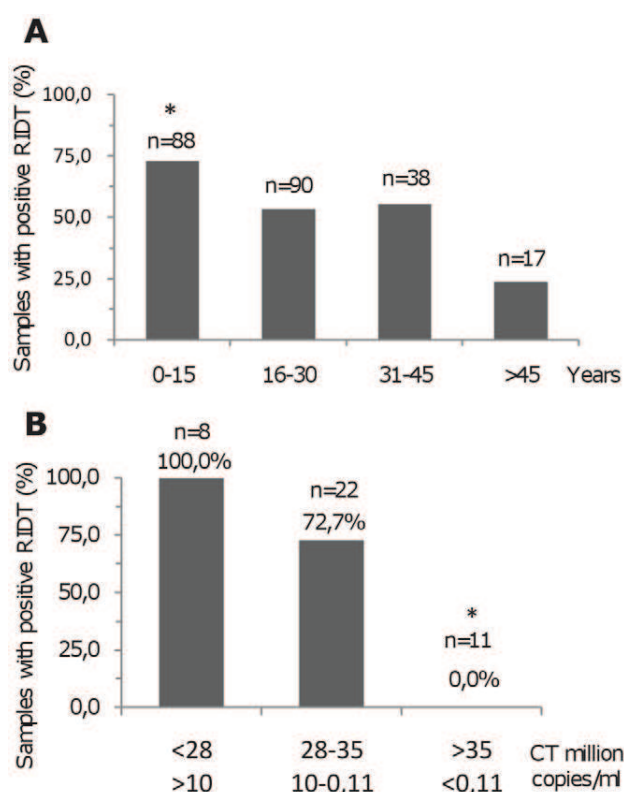


Figure 6. Results of RIDTs according to age groups and viral load. Figure 6A shows the distribution of positive RIDTs in age groups amongst 233 samples positive for H1N1sw based on RT-PCR techniques. Figure 6B shows the distribution of positive RIDTs according to viral load amongst 41 samples. *: $p < 0.001$ (chi-square test); compared with all other samples. doi:10.1371/journal.pone.0009214.g006

was no significant difference in terms of age and sex between ill and non-ill children. The chronological onset of cases is represented in the epidemic curve (see figure 7). Children and counsellors had been distributed in different groups (A, B, C, D, E). All individuals in a given group were sharing daytime activities and were sleeping at night on the same floor in the main building

Table 2. Clinical symptoms observed in 45 probable and confirmed cases in a summer camp, July 2009.

Symptoms	N	%
Coughing	45	100
Fever	37	82
Asthenia	34	76
Headache	27	60
Myalgia	27	60
Sore throat	27	60
Shivering	17	38
Rhinitis	15	33
Nausea	6	13
Dyspnoea	5	11

doi:10.1371/journal.pone.0009214.t002

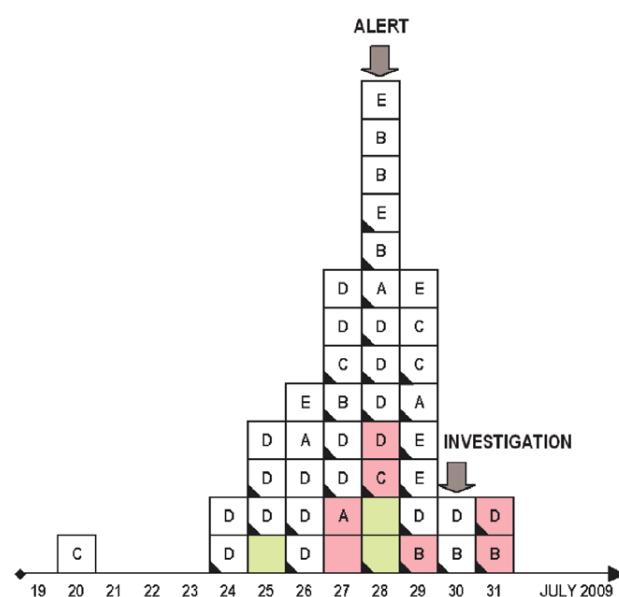


Figure 7. Probable and confirmed cases in a summer camp, July 2009. White cubes figure children; pink cubes figure counsellors/management team; yellow cubes figure technical staff. Letters indicate the group (see main text) and the cubes with a black corner indicate microbiological confirmation. doi:10.1371/journal.pone.0009214.g007

of the camp, with the exception of few children from group C, including the index case, who shared the floor of teenagers of group D. The index case was retrospectively identified and occurred on the day of arrival of the children in the camp. No history of travel or previous contact with a suspected case could be identified for this child. The outbreak peak was reached eight days after the onset of the index case. An alert was then issued, and a case-management procedure was implemented, with physical separation between symptomatic and asymptomatic children (and adults). The investigation was performed 2 days after the alert in a period characterized by the rapid decline of the outbreak.

The global attack rate was 38% in children, 37.5% in adults managing children, and 25% in technical agents. It was therefore similar in children and adults in close contact with them. However, this attack rate was different in the different groups varying from 19% in group A to 57.5% in group D. The latter group was constituted by teenagers (10–14 years old) which represented the majority of the secondary cases observed during the first days of the outbreak (see figure 7).

During the investigation process, one nasal swab could be sampled from 95% of probable cases and 85% of “non-cases”. Samples were submitted to H1N1sw detection using the same RT-PCR methods as reported above. Interestingly, the virus was detected in 7 of the 67 “non-cases” tested (10.4%). One was a child with fever and asthenia but without any respiratory symptoms. A telephone follow-up of the 6 remaining asymptomatic persons was organised. One child and one counsellor experienced coughing and fever by July 31st and were included in data analysis (see figure 7). One week after sampling, two children had experienced isolated rhinitis, but two others remained totally asymptomatic. Finally, amongst the 7 “non-cases” tested, 2 became typical influenza cases, 3 had atypical presentations, and 2 remained completely asymptomatic.

Prevalence of Antibodies to the New H1N1 Variant

The prevalence of antibodies to the new H1N1sw variant in patients under and above the age of 40 is shown in figure 8. The prevalence at different titres ($\geq 1/40$, $\geq 1/80$, $\geq 1/160$) is significantly lower in patients under the age of 40 ($p < 0.0001$). This distribution is different from that observed for antibodies to H1N1 and H3N2 seasonal viruses. In the case of seasonal H1N1, the prevalence of HI titre $\geq 1/40$ is similar to that observed for H1N1sw amongst patients under the age of 40, but slightly lower in patients over 40. However, no statistical relationship could be identified between individual titres of antibodies to H1N1sw and seasonal H1N1. For seasonal H3N2, the prevalence of HI titre ≥ 40 is higher in both groups (with an important difference for patients under the age of 40). Again, no statistical relationship could be identified between individual titres of antibodies to H1N1sw and seasonal H3N2.

Figure 9 shows a more detailed distribution of antibodies to H1N1sw in age groups. A similar age-dependent fluctuation of prevalence was observed for all HI titres, but it should be noted that the prevalence of titres $\geq 1/160$ remains globally modest at all ages.

Sequence Analysis

Comparative analysis of genetic amino acid distances amongst H1N1sw 2009 HA and NA sequences available in databases at mid-October 2009 revealed that the genetic diversity of protein sequences was minor, but slightly more notable in the NA gene ($\sim 2\%$ vs $\sim 1\%$ in HA gene). OPYFLU-1 and OPYFLU-58 HA protein sequences were identical (with 3 synonymous substitutions) but 2 non-synonymous differences were detected in the NA gene (V106I, N248D) in addition to 3 non-synonymous mutations. There was no evidence of resistance to neuraminidase inhibitors in either strain. Interestingly, strains appeared to segregate according to the nature of residues 106 and 248. When using amino acid sequences, various methods used for tree building (including distance-based neighbor joining and maximum parsimony reconstructions) provided a similar topology, with VN strains appearing ancestral, separate clusters including VD and IN sequences and

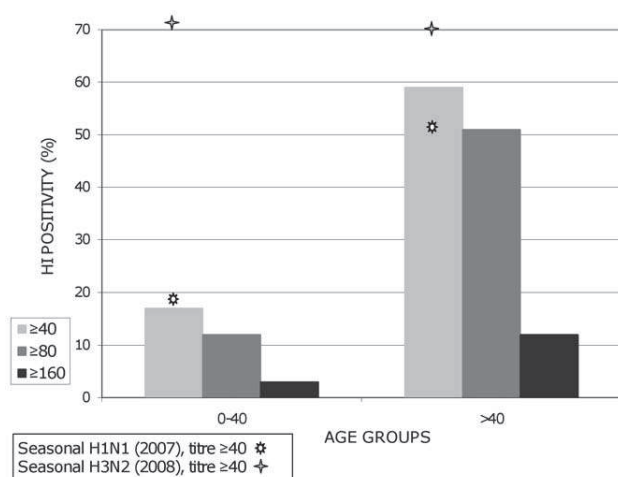


Figure 8. Prevalence of antibodies to H1N1sw and seasonal influenza viruses according to age. The prevalence of antibodies to H1N1sw is given for HI titres $\geq 1/40$, $\geq 1/80$ and $\geq 1/160$. The prevalence of antibody to seasonal H1N1 (using a strain isolated in Marseille in 2007), and to seasonal H3N2 (using a strain isolated in Marseille in 2008) is given for HI titres $\geq 1/40$.

doi:10.1371/journal.pone.0009214.g008

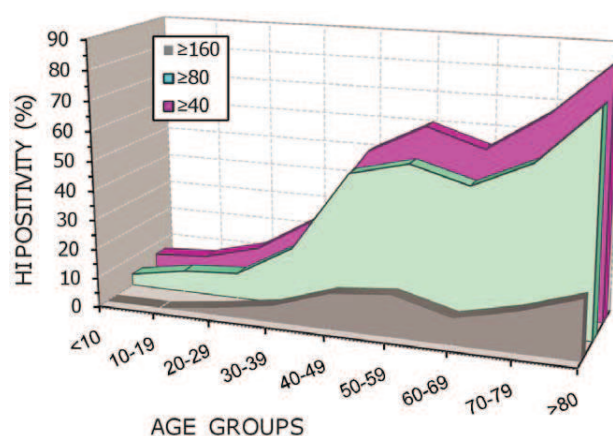


Figure 9. Prevalence of antibody to H1N1sw according to age groups. The prevalence is given for HI titres $\geq 1/40$, $\geq 1/80$ and $\geq 1/160$.

doi:10.1371/journal.pone.0009214.g009

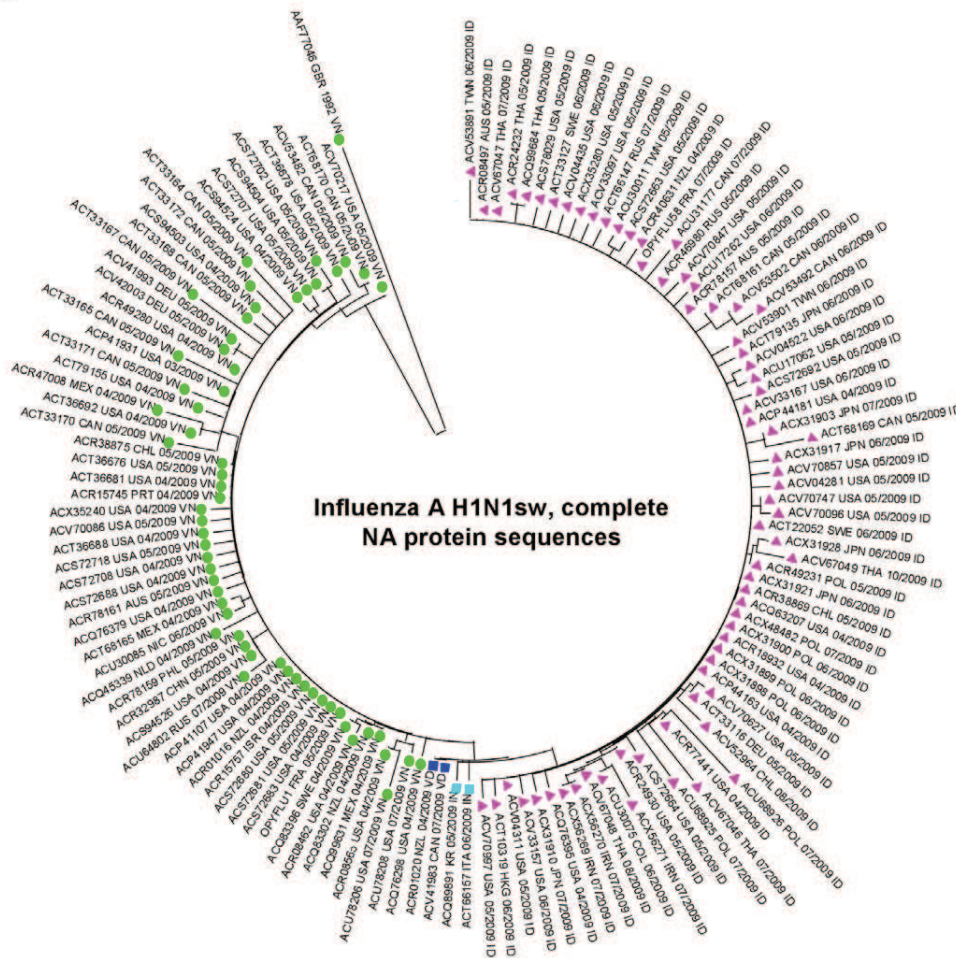
finally a large group of ID sequence that seemed to have emerged more recently from a common ancestor (see figure 10A). This chronology is globally validated by the analysis of dates at which the corresponding strains were collected (see figure 10B). However, bootstrap resampling values at forks delineating the main clusters are low (< 50), a possible consequence of the limited genetic distances between the different strains studied. Analysis performed using nucleotide sequences similarly provided phylogenetic inconclusive results with similar grouping of strains according to their VN, VD, IN or ID pattern.

Discussion

In a number of countries, the appearance of the H1N1sw pandemic resulted in reinforcement of the surveillance of influenza-like illnesses (ILIs). In countries located in the Northern hemisphere, this led to a follow up of ILIs during the spring and summer periods. Paradoxically, this revealed our limited knowledge concerning the epidemiology of viral respiratory diseases outside the winter epidemic season and contributed novel information regarding the new H1N1sw variant, but also seasonal influenza viruses, and other viral respiratory pathogens.

The study of the first 99 suspected cases identified in the French Southern Defence Zone showed that this population (mainly constituting adults 20–60 years old returning from abroad) was infected by a variety of respiratory viruses such as rhinoviruses, pneumoviruses, coronaviruses, enteroviruses, polyomaviruses, and parainfluenza viruses. Our analysis of this limited sample did not identify associations between age and specific pathogens. It provided results in agreement with those previously published by Follin and collaborators [23] and confirmed the difficult etiological identification of ILIs based on clinical presentation. One interesting aspect of this study was the identification of “seasonal” H3N2 influenza virus in June, July and August, which co-circulated at a low rate with the pandemic H1N1sw virus. This may appear to be an unusual feature in Southern France during summertime, but strongly suggests that such cases occur regularly and are just not detected by our standard surveillance system which focuses on investigations during the winter season. Therefore, the characteristics of the circulation of the influenza A virus may be much more complex than previously believed and our results suggest that the complete picture may include the circulation of “seasonal” virus during the April–August period in

A



B

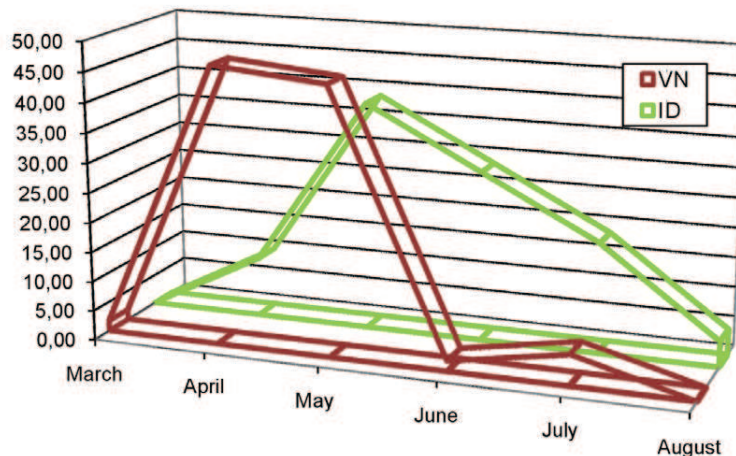


Figure 10. Phylogenetic and temporal distribution of H1N1sw isolates. Figure 10A shows the phylogenetic distribution of H1N1sw isolates based on complete amino acid neuraminidase sequences. The label of each strain includes the GenBank number, the country of origin, the time of collection and the amino acid pattern at residue positions 106 and 248 of the neuraminidase protein. Figure 10B shows the temporal distribution of strains harbouring the VN or ID amino acid pattern at residue positions 106 and 248 of the neuraminidase protein. Figure 10B: Green circle: strains with VN pattern. Pink triangle: strains with ID pattern. Dark blue square: strains with VD pattern. Light blue square: strains with IN pattern.

doi:10.1371/journal.pone.0009214.g010

the Southern hemisphere, but also, at a low rate, in the Northern hemisphere: in our series, patients with H3N2 infections returned from Australia, but also from the UK or the USA.

Regarding H1N1sw infection, it was identified originally in travellers returning from abroad (75% in Panel A, including a majority of adults) or in patients in close contact with them (25%). This pattern was progressively modified and, notably, the number of patients who did not travel and could not identify any link with suspected cases, as well as the number of patients under the age of 10 tested for H1N1sw infection, increased progressively. The final picture (see figures 3B and 4) is very similar to the epidemiological distribution of H1N1 seasonal virus usually observed in age groups, with ~50% of cases under the age of 20, a decreasing number of cases in age groups over the age of 20 and, notably, a very limited number of cases in patients over 60 years old. Superimposing the curves of empirical cumulative distribution of ages for patients with seasonal H1N1 in New York State during the 2006–2007 and 2007–2008 influenza seasons, and for H1N1sw in Panel C shows a striking similarity. Only one difference is observed in the 2–12 years old age group, in which the number of cases is slightly lower in our series. However, it must be noted that, in the current study, the investigation of clusters of cases (implicating a majority of children under the age of 15) was limited to sampling a few individuals *per* cluster. Therefore, the actual number of cases in children was underestimated and is most probably similar to that reported for seasonal H1N1 by [20] (in the latter study, 47% of the detected H1N1 cases were reported in patients younger than 20 years). The most remarkable difference observed by [20] between seasonal H1N1 (and thus H1N1sw) and H3N2 distribution, is the number of cases occurring in the elderly, (H1N1 does preferentially target a younger population). One reason that may underlie this difference is the weaker antigenic drift in H1N1, associated with co-circulation of multiple H1N1 lineages and weaker H1N1 bottleneck effects between seasons compared to those of H3N2 [20,24]. Indeed, in the current series the number of cases detected in patients over 60 years old is remarkably low: less than 1% in both Panels B and C whilst this age group provided 10.5% of the patients tested in these two panels.

This distribution of cases in age groups is of special interest in the light of HI serological results (see figures 8 and 9): regardless of the antibody titre considered, it appears clear that the prevalence of antibodies to H1N1sw is low under the age of 30. Since it is extremely improbable that strains related to H1N1sw circulated in human populations during the last 20 or 30 years, the value observed for young patients is likely to be due to cross reactivity with seasonal influenza and thus indicative of the global overestimation of the prevalence provided by the HI assay (according to this hypothesis, around 10%). In individuals over 40, the prevalence is clearly disconnected from that observed for seasonal viruses and suggests previous exposure (presumably before 1970) to influenza virus(es) antigenically related to the current H1N1sw. However, much earlier circulation (*i.e.* before 1940 and possibly between the first and the Second World War) of H1N1sw-related strains cannot be ruled out considering the high prevalence values observed for patients over 80.

This suggests a “cause and effect” relationship, *i.e.* protection provided by specific antibodies. However, this interpretation should be considered tenuous since the significance of the titres of HI antibodies detected, in terms of protection against infection/asymptomatic infection/severe forms, is unknown. Moreover, if the group of elderly individuals appears to be collectively prone to a low incidence of H1N1 and H1N1sw infections (at least of symptomatic infections), individuals without immunity to the virus

do exist in this age group. Their precise number is unknown since the antibody level (HI titre) that may provide effective protection is undetermined, but the occurrence of a low incidence in this age group does not eliminate during the outbreak the risk of complicated forms and high mortality as classically observed in the case of seasonal influenza infection.

Concerning diagnosis of the acute infection, it is generally considered that the only reliable tool was the detection of viral genomes using molecular biological methods. Our comparative analysis of results obtained in parallel that incorporated molecular biology and a RIDT led to a more subtle assessment. We found that the positive predictive and specificity values of the RIDTs used were 100% and that the sensitivity in the age group 0–15 was 75%. Comparative analyses with studies investigating the performance of RIDTs suggest that the RIDT used in the current study performs better than others. This deserves further investigation. However, it also suggests that RIDT may be useful for rapid investigation of clusters of paediatric cases, and that they may also be particularly useful at the peak of the outbreak: we could calculate that (in the case of children under the age of 15 and under the hypothesis of a ratio of 2 between the price of the molecular test and that of the RIDT) the cost of a strategy associating a systematic RIDT and a molecular test for all negatives would become more attractive than systematically testing all samples by molecular biology for prevalence of influenza infection over 60%.

Another conclusion that could be drawn from the use of RIDTs is, in the case of H1N1sw, the more important viral excretion in children under the age of 15 compared with other age groups (see figure 6A). Actually, children were associated with the highest sensitivity of the test and, simultaneously, positive results of RIDTs could be associated with elevated viral loads (see figure 6B). This confirms previous results showing that the highest attack rates of seasonal influenza observed in communities of schoolchildren are accounted for by the shedding of higher titres of virus for a longer period than other patient groups [21,22]. In the specific case of H1N1sw, similar results were observed suggesting that clinical attack rates in children under 15 years of age in La Gloria were twice those observed in adults [25].

The investigation of a cluster of cases in a summer camp showed the rapid spread of the virus in individuals living in the immediate vicinity of the index case. Interestingly, the attack rate observed in children (median age 11) was similar to that observed in young adults supervising them (median age 22). This strongly suggests that the shedding of higher titres of virus by children is the major parameter associated with high attack rates. However, it was also noticed that attack rates in children increased with age sub-groups, the risk of infection among teenagers being 3 times the risk of the youngest (under 8 years old). This difference may be, in the case of the current investigation, explained in part by the physical separation of children in different groups, but may also reflect specific behaviour or susceptibility to infection in different age groups.

Finally, the genetic characterisation of a strain isolated in the early period (May) of the outbreak from a patient returning from Mexico, and that of a strain isolated in July 2009 from a French autochthonous case revealed two mutations at positions 106 and 248 of the neuraminidase protein. Residue 106 is located at the N terminus of the neuraminidase domain and closely related to the trans-membrane domain. Residue 248 is located at the surface of the protein and part of an antibody recognition site [26]. It may therefore be associated with antigenic shift. The N248D mutation has previously been reported in H1N1 human strains isolated in the thirties, forties, seventies, eighties and nineties. Sequence

analysis suggests that a majority of strains harboured the V¹⁰⁶-N²⁴⁸ pattern at the origin of the outbreak. After May 2009, the decline of V¹⁰⁶-N²⁴⁸ strains was concomitant with the emergence of I¹⁰⁶-D²⁴⁸ strains. The mechanism of emergence of ID strains remains unclear: such strains may have emerged from a common ancestor and disseminated secondarily, but this hypothesis is epidemiologically puzzling and poorly supported by phylogenetic analyses in other genes such as HA. The alternative hypothesis (a common selection process may have lead to convergent evolution towards ID strains originating from various VN ancestors) cannot be ruled out and would suggest that evolutionary constraints led to the decline of V106-N248 strains after May 2009 and the

emergence of I106-D248. To our knowledge, this phenomenon has not been associated to date with a change in the epidemiology or clinical presentation of the viral infection, but certainly deserves a careful follow up during the coming months.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DR RNC XdL. Performed the experiments: AN LN CZ CG. Analyzed the data: AN LN CZ KM NR RNC XdL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AN LN NS KM NR CG. Wrote the paper: AN LN XdL.

References

- Levy-Bruhl D, Vaux S (2009) Modified surveillance of influenza A(H1N1)v virus infections in France. *Euro Surveill* 14.
- Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, De Lamballerie X, Gazin C, et al. (2009) Point of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus. *PLoS Currents Influenza* RRN1039.
- Ninove L, Gazin C, Gould EA, Nougairède A, Flahault A, et al. (2009) A Simple Method for Molecular Detection of Swine-Origin and Human-Origin Influenza A Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
- Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, et al. (2007) Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 44: 904–910.
- Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M (2008) Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 41: 69–74.
- Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A (2008) Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol* 42: 58–64.
- Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Defflernez C, Thomas Y, et al. (2004) Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 1197–1203.
- Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, et al. (2008) Study of influenza C virus infection in France. *J Med Virol* 80: 1441–1446.
- Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, et al. (2001) Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39: 4362–4369.
- Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Goh S, Ramqvist T, Allander T (2009) A single-tube, real-time PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol* 44: 24–26.
- Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Symmis MW, et al. (2003) Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 41: 100–105.
- Tiveljung-Lindell A, Rotzen-Ostlund M, Gupta S, Ullstrand R, Grillner L, et al. (2009) Development and implementation of a molecular diagnostic platform for daily rapid detection of 15 respiratory viruses. *J Med Virol* 81: 167–175.
- Tong S, Chern SW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ (2008) Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol* 46: 2652–2658.
- van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM (2001) Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 39: 196–200.
- van Elden LJ, van Loon AM, van Alphen F, Hendriksen KA, Hoepelman AI, et al. (2004) Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 189: 652–657.
- van Elden LJ, van Loon AM, van der Beek A, Hendriksen KA, Hoepelman AI, et al. (2003) Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 41: 4378–4381.
- World-Health-Organization (2009) Sequencing primers and protocol (Pandemic (H1N1) 2009 guidance documents). <http://www.who.int>.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
- Khiabani H, Farrell GM, St George K, Rabadan R (2009) Differences in patient age distribution between influenza A subtypes. *PLoS One* 4: e6832.
- Frank AL, Taber LH, Wells CR, Wells JM, Glezen WP, et al. (1981) Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. *J Infect Dis* 144: 433–441.
- Munoz FM (2002) The impact of influenza in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 13: 72–78.
- Follin P, Lindqvist A, Nystrom K, Lindh M (2009) A variety of respiratory viruses found in symptomatic travellers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. *Euro Surveill* 14.
- Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, et al. (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453: 615–619.
- Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, et al. (2009) Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324: 1557–1561.
- Maurer-Stroh S, Ma J, Lee RT, Sirota FL, Eisenhaber F (2009) Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites. *Biol Direct* 4: 18; discussion 18.

3. Discussion

Les données sur l'âge des personnes testées positives au laboratoire pour le virus A/H1N1pdm montrent que sur l'ensemble de la période de cette étude, environ 75% d'entre elles avaient moins de 30 ans. En effet, la plupart des personnes infectées durant cette pandémie étaient des jeunes adultes, probablement à cause du fait qu'une certaine proportion des adultes et surtout des personnes âgées était encore protégée suite à une ou plusieurs infections anciennes causées par des virus A/H1N1. C'est l'explication la plus probable qui est retenue aujourd'hui pour expliquer la très faible proportion de personnes âgées infectées durant cette pandémie (Bautista *et al.*, 2010). Les résultats de l'étude de séroprévalence présentée dans cette étude confirment cette hypothèse. Il faut quand même noter que la répartition par âge des cas confirmés est similaire à celle observée lors d'épidémies précédentes causées par les virus A/H1N1 issus de la pseudopandémie de 1977. Certaines caractéristiques propres à tous les virus A/H1N1 comme leur faible propension au glissement antigénique et la co-circulation de différents lignages pourraient donc également expliquer en partie cette répartition des cas confirmés (Rambaut *et al.*, 2008). Il est ainsi difficile de déterminer la part de chaque phénomène (immunité vs caractéristiques propres) et il est possible qu'ils interagissent entre eux. De plus, de 1977 à 2009, une partie de la population avait également été en contact avec des virus A/H1N1 auparavant.

La grande proportion de cas confirmés chez les enfants (environ 50% de cas confirmés) est peut être également le reflet qu'ils sont considérés comme d'importants vecteurs des virus grippaux (Glezen & Couch, 1978; Glezen *et al.*, 1997; Neuzil *et al.*, 2002). Cependant, nos données ne sont probablement pas représentatives de la population française car elles n'incluent pas tous les cas probables de grippe mais uniquement ceux qui ont été testés à l'hôpital. D'autre part, l'analyse des données sur la sensibilité du test rapide en fonction de l'âge montre indirectement que les enfants sécrètent plus de virus que les adultes confirmant de nombreuses études, ce qui peut expliquer qu'on observe des taux d'attaque clinique supérieurs chez ces derniers (Fox *et al.*, 1982; Frank *et al.*, 1981; Glezen & Couch, 1978; Hall *et al.*, 1979; Longini *et al.*, 1982; Sato *et al.*, 2005; Wright, 2000). L'investigation de cas groupés dans une colonie de vacances à Barcelonnette montre que

d'autres facteurs influencent la transmission, puisque nous avons observé des taux d'attaque similaires chez les adultes et les enfants durant cette épidémie.

L'excellente spécificité du test rapide utilisé dans cette étude associée à sa bonne sensibilité chez les enfants (70-75%) montrent à quel point il peut être utile en association avec les tests de biologie moléculaire chez ces derniers et notamment dans les services d'urgence pédiatrique où un rendu rapide des résultats (30 minutes pour ces derniers vs moins de 24h pour la biologie moléculaire) peut permettre de confirmer la mise en place d'un traitement antiviral curatif (ou prophylactique dans l'entourage), d'éviter la survenue de cas nosocomiaux et/ou d'orienter la prise en charge du patient plus rapidement. En effet, des études et notre analyse des étiologies des 99 premiers cas probables testés montrent bien à quel point il est difficile de différencier les symptômes associés à tel ou tel virus respiratoire (Orenstein *et al.*, 1988).

Enfin, l'analyse des séquences d'HA et de la NA de deux souches isolées chez des patients début mai et fin juillet est très similaire. Seulement deux mutations non-synonymes ont été retrouvées au niveau de la NA entre ces deux dernières : les mutations V106I et N248D. Les résultats présentés dans cet article suggèrent que l'ensemble des virus A/H1N1pdm a acquis ces deux mutations très rapidement au cours des premiers mois qui ont suivi la détection des premiers cas chez l'homme (le mécanisme reste incertain : expansion clonale ou convergence évolutive). Une analyse des bases de données plus récentes confirme cette tendance sur un grand nombre de séquences et montre que les doubles mutants (ID pattern) représentaient environ 50% des virus circulants en mars/avril pour atteindre 90% en août puis environ 99% en septembre 2009. De plus, l'analyse des gènes codant pour la NA des virus grippaux porcins montre que tous les virus du lignage eurasien ne sont pas mutés. Il est donc possible que ces deux mutations soient responsables de l'adaptation du virus A/H1N1pdm à l'homme. Des études complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre l'émergence rapide et simultanée de ces deux mutations.

B. Article 2: Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April-November 2009.

Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, Thiberville SD, Gazin C, La Scola B, Charrel RN, de Lamballerie X.

1. Avant propos

La vague pandémique hivernale toucha Marseille la semaine du 05 au 11 octobre 2009 selon nos données. Depuis septembre, le laboratoire de virologie faisait face à l'afflux d'un grand nombre de prélèvements pour recherche de grippe (avec un pic à plus de 500 par semaine mi septembre). Rapidement le pourcentage de prélèvements positifs a augmenté, suivi de l'augmentation du nombre de prélèvements. Mi-novembre, plus de 40% des prélèvements (environ 900) étaient positifs.

Dès le début du mois de novembre, et afin de faire face à cette vague pandémique, nous avons créé une base de données de tous les patients testés positifs à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille. Actualisée de façon journalière, elle permettait de détecter et suivre le devenir de tous les patients hospitalisés jusqu'à leur sortie de l'hôpital. Nous pouvions suivre en temps réel le nombre et la localisation (site, service etc.) de chaque cas confirmé au laboratoire et ainsi tenir informées les autorités compétentes afin d'adapter les moyens mis en œuvre pour faire face à cette vague pandémique (une réunion hebdomadaire avait lieu chaque semaine et j'étais en charge de rédiger un bilan hebdomadaire des données, cf. annexe C : Bulletin grippe A, 23/03/2010).

Début décembre 2009, nous décidons de publier nos premières données sur cette vague pandémique afin notamment de partager nos données sur le nombre de patients hospitalisés et de lits occupés par des patients testés positifs. Cet article a été publié en ligne dans *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* le 28 janvier 2010.

2. Article

Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April-November 2009.

Nougairede A, Ninove L, Zandotti C, Thiberville SD, Gazin C, La Scola B, Charrel RN, de Lamballerie X.

Unité des Virus Emergents, UMR190, Université de la Méditerranée et Institut de Recherche pour le Développement, Marseille.

Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16(4):322-5. Epub 2010 Jan 28.

Résumé:

We report here the results of a 7-month survey of the influenza A/H1N1 pandemic in the Virology laboratory of the public hospitals of Marseille (April-November 2009). In total, 8 587 samples were analysed during this period, of which 1 974 (23%) were positive for the novel influenza variant. The analysis of results obtained using rapid influenza diagnostic tests (RIDTs) revealed a global sensitivity of 49.4% (vs. molecular qRT-PCR detection), strongly correlated with age groups (varying from 30% to 58% for patients >40 age and <10, respectively), indicating that RIDTs can be helpful in accelerating the management of suspected cases. Epidemiological analysis showed that the winter influenza wave began in October in Marseille (i.e. 2 to 3 months earlier than usual seasonal influenza outbreaks) and that the majority of autochthonous cases were observed in patients younger than 20 years old, with a low number of cases in patients over 60 years old. In November 2009, 22.2% (167/754) of patients with a laboratory diagnosis of influenza A/H1N1 infection were hospitalized, of which 9% (15/167) were admitted to an intensive care unit (ICU). Patients in the extreme age groups (>40 years old and <1) were significantly more often hospitalized than others, and 2.4% of hospitalized patients died. During the last 3 weeks of the period, the average number of bed-days attributable to H1N1sw-positive patients was 31.4, of which 5.9 were in ICUs.

Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April–November 2009

A. Nougairède^{1,2}, L. Ninove^{1,2}, C. Zandotti², S.-D. Thiberville^{1,3}, C. Gazin², B. La Scola², R. N. Charrel^{1,2} and X. de Lamballerie^{1,2,4}

1) Unité des Virus Emergents, UMR190, Université de la Méditerranée et Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, 2) Laboratoire de Virologie, Pôle hospitalier de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Assistance Publique, Hôpitaux de Marseille, 3) Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Nord, Pôle hospitalier de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Assistance Publique, Hôpitaux de Marseille and 4) Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France

Abstract

We report here the results of a 7-month survey of the influenza A/H1N1 pandemic in the Virology laboratory of the public hospitals of Marseille (April–November 2009). In total, 8 587 samples were analysed during this period, of which 1 974 (23%) were positive for the novel influenza variant. The analysis of results obtained using rapid influenza diagnostic tests (RIDTs) revealed a global sensitivity of 49.4% (vs. molecular qRT-PCR detection), strongly correlated with age groups (varying from 30% to 58% for patients >40 age and <10, respectively), indicating that RIDTs can be helpful in accelerating the management of suspected cases. Epidemiological analysis showed that the winter influenza wave began in October in Marseille (i.e. 2 to 3 months earlier than usual seasonal influenza outbreaks) and that the majority of autochthonous cases were observed in patients younger than 20 years old, with a low number of cases in patients over 60 years old. In November 2009, 22.2% (167/754) of patients with a laboratory diagnosis of influenza A/H1N1 infection were hospitalized, of which 9% (15/167) were admitted to an intensive care unit (ICU). Patients in the extreme age groups (>40 years old and <1) were significantly more often hospitalized than others, and 2.4% of hospitalized patients died. During the last 3 weeks of the period, the average number of bed-days attributable to H1N1sw-positive patients was 31.4, of which 5.9 were in ICUs.

Keywords: H1N1, hospitalization, influenza, intensive care unit, pandemic, RIDT

Invited article

Editor: X. de Lamballerie

Article published online: 28 January 2010

Clin Microbiol Infect 2010; **16**: 322–325

Corresponding author and reprint requests: X. de Lamballerie, UMR190 Unité des Virus Emergents, Faculté de Médecine de Marseille, 27, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille Cedex 05, France
E-mail: xavier.de-lamballerie@univmed.fr

Introduction

In late April 2009, a novel A/H1N1 influenza virus (H1N1sw) was isolated in North America [1]. Rapidly, the World Health Organization increased the alert level from phase 5 to phase 6, defining the first influenza pandemic of the 21st century [2]. The first wave affected Mexico, the USA and Canada with severe cases and deaths [3–5]. The following wave affected the southern hemisphere during the southern winter season

[6,7], and once again severe cases were observed; over 3 months, 722 patients were admitted to an Intensive Care Unit (ICU) in Australia or New Zealand, representing 28.7 cases per million inhabitants, with a 14.3% mortality [8].

The first cases in metropolitan France were detected in April 2009 in patients returning from Mexico. Until early July 2009, a systematic surveillance based on laboratory confirmation of suspected cases was implemented in the 'Level A' laboratories of the seven French Defence Zones [9]. During the following months, laboratory confirmation was mainly performed in groups at risk and in hospitalized patients.

We report here data collected by the 'Level A' Virology laboratory of the public hospitals of Marseille (Southern Defence Zone) from 25 April to 29 November 2009; the evolution of the outbreak, the distribution among age groups, the results of rapid influenza diagnostic tests (RIDTs) and the characteristics of hospitalized patients are described and discussed.

Materials and Methods

Clinical samples

All clinical nasal samples were obtained using Virocult swabs (Virocult MW950; Medical Wire and Equipment Co.). Laboratory investigations for diagnostic purposes and epidemiological assessment, warranted by patients' signatures at the hospital entrance office, were performed in accordance with French national regulations (Huriet-Sérusclat law, #881138) and did not require ethical committee approval.

Rapid influenza diagnostic testing (RIDT)

RIDT was performed using the Directigen EZ influenza A+B test (BD EZ Flu A+B, Becton, Dickinson and Company) according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction

Samples were spiked with in-house MS2 phage internal control [10] and RNA was extracted using the EZ1 Virus Mini Kit v2 on the EZ1 Biorobot (both from Qiagen).

Quantitative real time PCR assays

Samples were analysed by two qRT-PCR assays: (i) a qRT-PCR assay using SYBR Green technology detecting all influenza A viruses [10], and (ii) a qRT-PCR assay specific for H1N1sw, recommended by the French Influenza Reference National Centre [9] as previously described.

Database of patients infected by H1N1sw

During the last 4 weeks of the study (November 2009) data regarding in-patients and patients presenting at the hospital emergency department with a subsequent laboratory confirmation of H1N1sw infection were collected from the database of the public hospitals of Marseille. The age, sex, arrival and discharge from hospital dates, category of hospitalization unit (paediatric medical unit, adult medical unit, paediatric ICU and adult ICU) and number of deaths were analysed using an anonymized database.

Results

From 25 April to 29 November 2009, we analysed 8 587 specimens for detection of the novel A/H1N1 virus. A total of 5 848 (68.1%) originated from public hospitals in Marseille, the remaining samples being sent by other hospitals from the French South Defence Zone. Until late June the numbers of samples tested remained low but they increased progressively until early September (Fig. 1). During this period, the

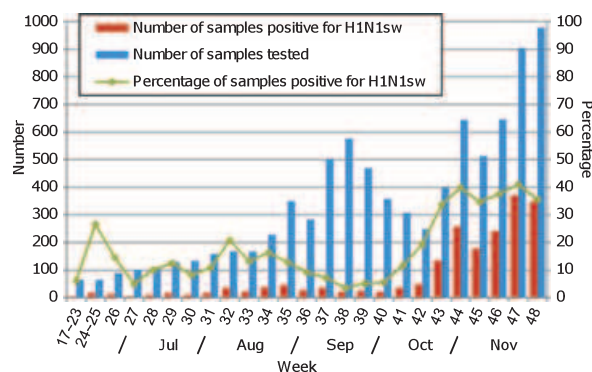


FIG. 1. Time distribution of samples tested and samples positive for H1N1sw during 7 months in the Virology laboratory of the public hospitals of Marseille.

percentage of H1N1sw-positive samples remained stable at c. 10%. In September, the number of samples increased suddenly but the percentage of H1N1sw-positive samples decreased (Fig. 1). This episode was associated with the circulation of other respiratory viruses such as rhinoviruses and coronaviruses. The influenza winter wave began effectively in October (weeks 41–42) with a marked increase of both tested and positive samples. From late October, the percentage of H1N1sw-positive samples remained stable (30–40%) but the number of positive samples continued to increase (Fig. 1).

We analysed the distribution among age groups of tested samples (N) and H1N1sw-positive samples (N') during the study period. Until late August, patients over 20 years old represented 60% of all tested patients and more than 50% of H1N1sw-positive patients. During this period, patients in the 10–19 years age group represented 30% of H1N1sw-positive patients (Fig. 2a,b) but this proportion increased in September (weeks 36–38), to reach more than 40% of infected patients. From mid-September, the proportion of patients younger than 10 years who were tested or infected by H1N1sw increased, representing approximately 40% of both groups and the distribution among age groups remained globally stable afterwards (Fig. 2a,b). The N'/N ratio (allowing standardization of the number of samples in the age groups) showed that the highest proportion of positive patients was observed in the 10–19 years age group (30–60%) and that this proportion fluctuated c. 20% for patients over 40 years old (Fig. 2c). During the complete study period the majority of patients infected by H1N1sw were younger than 20 years old.

Among the 8 587 samples tested for influenza virus using qRT-PCR, a total of 7 459 (including 1 615 qRT-PCR positive with both systems) were also tested using RIDT. Of the 7 459 samples, 798 (10.7%) gave positive results in the RIDT, all of these being positive for molecular detection of the

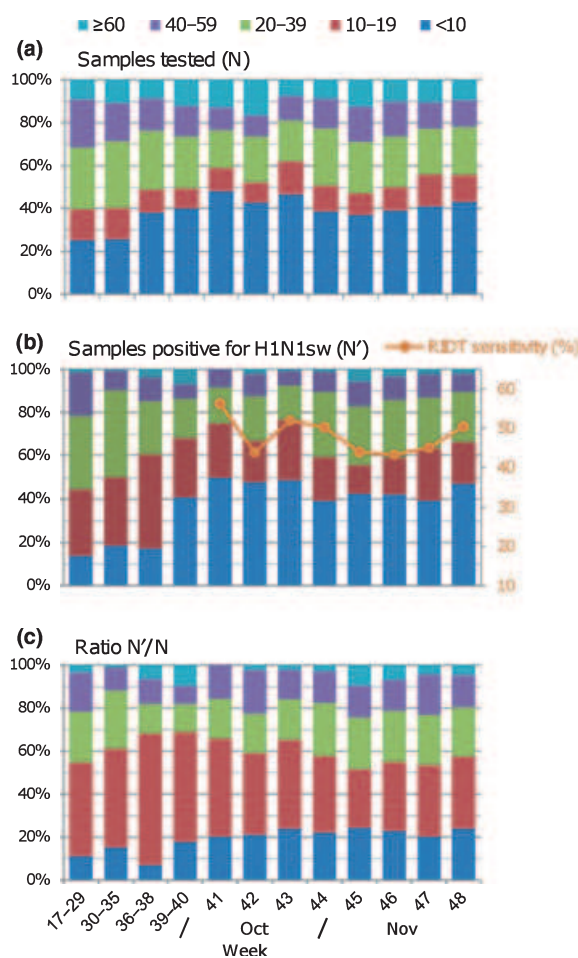


FIG. 2. Distribution among age groups of samples tested (N) (a), samples positive for H1N1sw (N') (b) and for the N'/N ratio (corresponding to the standardization of number of samples in age groups) (c). The evolution of RIDT sensitivity is indicated for weeks 41–48 (b).

H1N1sw influenza virus (specificity of RIDT = 100%, sensitivity = 49.4%). There was a strong correlation between RIDT sensitivity and age (Fig. 3): the sensitivity varied between 30% and 58% for patients in the ≥ 40 and <10 years age groups, respectively. Furthermore, from mid-October, the performance of RIDT detection was correlated with the proportion of patients infected who were younger than 20 years (Fig. 2b).

Among the 754 H1N1sw-positive patients admitted to the public hospitals of Marseille during the last 4 weeks of this study (weeks 45–48), 167 (22.2%) were hospitalized and four died (2.4% of hospitalized patients). Comparison of hospitalized and non-hospitalized patients showed comparable sex ratios (M/F, 0.99 and 0.92, respectively) and median ages (14.5, range: 0–98 years, and 11.3, range: 0–99 years, respectively). The age distribution was similar in hospitalized and non-hospitalized patients except for patients younger than 1 year and over 40 years. Overall, 24.0% of in-patients and 10.1% of

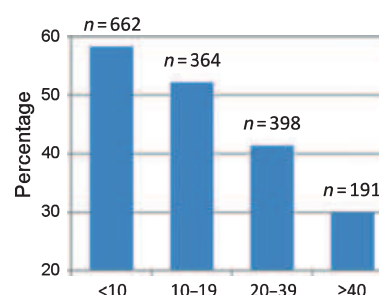


FIG. 3. Sensitivity of RIDT according to age groups amongst 615 samples positive for H1N1sw.

non-hospitalized patients were over 40 years (χ^2 test: $p < 0.0001$) and 15.6% of in-patients and 5.7% of non-hospitalized patients were under 1 year (χ^2 test: $p < 0.0001$). Among 167 hospitalized patients, 15 (9.0%, and 2.0% of all 754 infected patients) were admitted to an ICU because of severe clinical conditions. The median age of patients hospitalized in an ICU was 23.7 years (range: 1 month–61 years). Of patients hospitalized in ICUs 40% were over 40 years and 13.3% were under 6 months. From 9 November to 29 November, the average number of bed-days due to H1N1sw-positive patients in the public hospitals of Marseille was 31.4 (95% CI, 29.5 to 33.4 days) of which 5.9 (95% CI, 5.4 to 6.4) were in ICUs. Half and 32.5% of bed-days were attributable to children (under 18 years) in medical units and ICUs, respectively (Fig. 4). Among patients hospitalized in medical units, 21.1% and 61.3% stayed in hospital for 2 days or less and for 4 days or less, respectively (range: 1–23 days), while 12.5% of patients hospitalized in ICUs stayed in hospital 4 days or less and 50% stayed in hospital 13 days or more (range: 4–29 days).

Discussion

The retrospective analysis of the first 7 months (from late April to late November; weeks 17–48) of the wave of

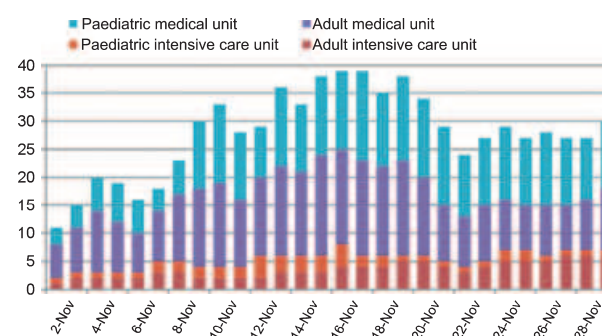


FIG. 4. Daily occupancy of the paediatric and adult medical unit and of the paediatric and adult ICU during 4 weeks in public hospitals of Marseille.

H1N1sw pandemic infections in the region of Marseille (south-eastern France) indicates that three periods with distinct epidemiological characteristics can be distinguished. The very first imported cases were observed from April to August in travellers returning from abroad (mainly Mexico and the USA), and thus with a majority of adults [9]. In the second phase, with indigenous cases, which became predominant during the summer, the number of paediatric cases (<10 years old) increased progressively to reach a stable proportion of approximately 40% of all cases. Consequently, the global distribution among age groups became comparable to that previously observed for seasonal H1N1 outbreaks [11], with a majority of cases in patients younger than 20 years, confirming data from other countries [7,12]) and a low number of patients over 60 years old. The final phase, a 'winter' wave, began in Marseille during October (as was also observed in other regions of metropolitan France [13]) 2–3 months before the classic winter wave of seasonal influenza.

The use of a RIDT is common for the diagnosis of seasonal influenza. Whether 'classical' tests (designed for detection of seasonal A/H3N2, A/H1N1 and B viruses) could be used for the detection of the new A/H1N1sw variant was uncertain and contrasting results had been obtained using various available commercial kits [13–16]. Our results suggest that RIDTs could make a significant contribution to the management of suspected cases. They allowed more rapid delivery of positive diagnosis (<2 h) for 49.4% of the H1N1sw-positive samples, the highest sensitivity (close to 60%) being obtained in children younger than 10 years. Other studies showed a similar sensitivity for the detection of this new variant [13] and an equal analytical sensitivity between seasonal influenza and this new variant [14] using the BD EZ Flu A+B test.

Finally, the follow up organized during November indicated that 22.2% of patients with a documented H1N1sw infection were hospitalized and that 2.4% of hospitalized patients died. Approximately 30 bed-days were attributable to H1N1sw in the public hospitals of Marseille, of which six were in ICUs. Since the public hospitals of Marseille serve a population of approximately one million inhabitants, these numbers are similar to those encountered in surveys previously performed in Australia and New Zealand [8]. Importantly, our results indicate that the duration of hospitalization was short for patients admitted to medical units, but also that the pattern of hospitalization observed (children younger than 1 year and patients over 40 years being significantly more frequently hospitalized than others) was reminiscent of the U-shaped age-distribution curve previously reported for seasonal influenza.

Transparency Declaration

The authors declare that no dual/conflicting interest exists.

References

1. Dawood FS, Jain S, Finelli L et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605–2615.
2. WHO. Statement to the press by WHO (World Health Organization). Director-General, Dr Margaret Chan. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html. 2009.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: novel influenza A (H1N1) virus infection – Mexico, March–May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 585–589.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity—United States, April–August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 1009–1012.
5. Anonymous. Epidemiological summary of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus – Ontario, Canada, June 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; 84: 485–491.
6. Fielding J, Higgins N, Gregory J et al. Pandemic H1N1 influenza surveillance in Victoria, Australia, April – September, 2009. *Euro Surveill* 2009; 14(42): pii: 19368.
7. New South Wales public health network. Progression and impact of the first winter wave of the 2009 pandemic H1N1 influenza in New South Wales, Australia. *Euro Surveill* 2009; 14(42): pii: 19365.
8. Webb SA, Pettit V, Seppelt I et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 2009; 361: 1925–1934.
9. Levy-Bruhl D, Vaux S. Modified surveillance of influenza a(H1N1)v virus infections in France. *Euro Surveill* 2009; 14(29): pii: 19276.
10. Ninove L, Gazin C, Gould EA et al. A simple method for molecular detection of swine-origin and human-origin influenza A virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009 (June 8).
11. Khiabanian H, Farrell GM, St George K, Rabadan R. Differences in patient age distribution between influenza A subtypes. *PLoS ONE* 2009; 4: e6832.
12. Munayco CV, Gomez J, Laguna-Torres VA et al. Epidemiological and transmissibility analysis of influenza A(H1N1)v in a southern hemisphere setting: Peru. *Euro Surveill* 2009; 14(32): pii: 19299.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus – United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 826–829.
14. Hurt AC, Baas C, Deng YM, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses* 2009; 3: 171–176.
15. Drexler JF, Helmer A, Kirberg H et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza a pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1662–1664.
16. Chan KH, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origin influenza virus (H1N1). *J Clin Virol* 2009; 45: 205–207.

3. Discussion

La vague pandémique a débuté à Marseille mi-octobre, plus d'un mois avant la vague hivernale de grippe saisonnière observée chaque année. Durant trois semaines, la grande majorité des prélèvements positifs ont été réalisés chez des enfants (autour de 70%) puis la proportion d'adultes testés positifs a légèrement augmenté puis s'est stabilisée. Ce phénomène s'observe également lors des épidémies de grippe saisonnière où les jeunes enfants sont toujours les premiers touchés (Olson *et al.*, 2007). A noter également, le décalage de l'épidémie de VRS qui débute généralement fin octobre à Marseille. En 2009-2010, elle a débuté fin décembre lorsque la vague pandémique commençait à décroître. En Europe, la vague pandémique hivernale a débuté entre début Octobre et début Novembre selon les données des différents réseaux de surveillance, avec une diffusion d'Est en ouest de l'épidémie, phénomène qui n'est pas observé avec la grippe saisonnière. Curieusement, La vague pandémique estivale observée en Amérique du Nord, n'a eu lieu qu'en Angleterre ou la vague hivernale a également suivie celle de ce continent (elle a débuté en Septembre) (ECDC, 2010). On peut supposer que le trafic aérien qui est très important entre ces deux continents peut avoir contribué à cette observation (Khan *et al.*, 2009). Enfin, en France comme en Suède, une épidémie de Rhinovirus qui a débuté en Septembre 2009 a probablement différé le début de la vague hivernale dans ces deux pays (Casalegno *et al.*, 2010; Linde *et al.*, 2009).

Les données virologiques présentées ici permettent de renforcer largement les résultats obtenus sur la sensibilité et la spécificité du test rapide (présentés dans l'article 1). En effet, il existe une corrélation claire entre la catégorie d'âge des patients testés et la sensibilité de ce test. Pour les enfants et au pic de l'épidémie, lorsque 40% des prélèvements étaient positifs, les tests rapides permettaient de rendre 25% de résultats (tous positifs) en moins de 30 minutes (moins de deux heures en réalité, en tenant compte du grand nombre de prélèvements à traiter et des différentes étapes d'enregistrement/traitement des prélèvements). Une étude récente réalisée aux Etats-Unis a montré des résultats comparables en termes de sensibilité globale et par classe d'âge sur plus de 250 échantillons positifs pour le virus A/H1N1pdm (Gao *et al.*, 2011).

Ces données permettent également d'évaluer l'impact qu'a eu la vague pandémique à Marseille, une ville de un million d'habitants. Le recueil des données a continué jusqu'à fin mars 2010, après la publication de cet article. Le nombre maximum de lits occupés par les patients infectés a été d'environ 35 par jour les deux dernières semaines du mois de novembre. Le nombre de lits occupés par des patients testés positifs en réanimation/soins intensifs/soins continus a lui augmenté plus lentement pour atteindre un plateau de début décembre à début janvier (9-12 lits/jour, pic début janvier). Durant toute la période, 10 patients sont décédés parmi les 294 patients hospitalisés (3.4%) et trente trois patients ont été hospitalisés en réanimation/soins intensifs/soins continus (11.2% des patients hospitalisés). Nos données concordent avec les nombreuses données qui sont aujourd'hui publiées dans la littérature. Les différentes études en Amérique du Sud et en Océanie montrèrent que 16.8-45.3% des patients infectés durant la vague pandémique dans l'hémisphère sud furent hospitalisés, 7.5-26% d'entre eux le furent en unité de réanimation/soins intensifs/soins continus et 0.5-1.5% des cas confirmés décédèrent (4.0-7.6% des patients hospitalisés) (Falagas *et al.*, 2011). Dans l'hémisphère nord, les données concordent également : aux Etats-Unis (Utah) par exemple, 25% des patients hospitalisés le furent en unité de réanimation/soins intensifs/soins continus (2011b); deux études menées au Canada et en Autriche montrèrent que 17% et 9.1% des patients hospitalisés le furent en unité de réanimation/soins intensifs/soins continus respectivement, et 4.9% et 4.1% des patients hospitalisés décédèrent (Helferty *et al.*, 2010; Poepl *et al.*, 2011).

C. Article 3: Point of care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.

Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, de Lamballerie X, Gazin C, Drancourt M, La Scola B, Raoult D, Charrel RN.

1. Avant propos

Fin juin 2009, il a été décidé que l'ensemble des prélèvements provenant de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille serait traité par les deux laboratoires Point of Care (POC) afin entre autres de maintenir une surveillance locale de la pandémie suite à l'annonce de l'arrêt du dépistage systématique des cas probables. Mis en place en 2008, les deux laboratoires POC permettent de réaliser un large panel de test rapides et de PCR en temps réel. Ils ont été créés à l'origine pour répondre aux contraintes de centralisation des différents laboratoires de biologie tout en conservant une proximité avec les services implantés sur différents sites à Marseille. Ce sont les internes qui sont chargés de faire fonctionner le POC et en juin 2009, je réalisais mon dernier choix d'internat en biologie médicale au laboratoire de virologie des hôpitaux de Marseille.

La mise en place d'un diagnostic rapide de la grippe au laboratoire avait également pour but d'améliorer la prise en charge des patients et de traiter plus rapidement les prélèvements. Les cliniciens qui étaient déjà habitués à prescrire des "tests POC" ont rapidement adhéré. En effet, le POC permettait de répondre rapidement 24h/24 à des demandes de recherche de virus grippaux toujours plus nombreuses. Durant les mois de juillet et août 2009, les cliniciens étaient très souvent pressés d'obtenir le résultat du test car de grandes incertitudes pesaient encore sur la dangerosité de ce nouveau virus.

En septembre 2009, nous décidions de publier notre stratégie POC dans PLoS Currents Influenza (créé par PLoS pour partager rapidement les données sur la grippe). L'article a été mis en ligne fin septembre. Nous avons ensuite amélioré le manuscrit qui a été soumis à PLoS One fin novembre et publié le 17 février 2010.

2. Article

Point of care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.

Nougairède A, Ninove L, Zandotti C, de Lamballerie X, Gazin C, Drancourt M, La Scola B, Raoult D, Charrel RN.

Fédération de Microbiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.

PLoS One. 2010 Feb 17;5(2):e9215.

Résumé:

BACKGROUND: Within months of the emergence of the novel A/H1N1 pandemic influenza virus (nA/H1N1v), systematic screening for the surveillance of the pandemic was abandoned in France and in some other countries. At the end of June 2009, we implemented, for the public hospitals of Marseille, a Point Of Care (POC) strategy for rapid diagnosis of the novel A/H1N1 influenza virus, in order to maintain local surveillance and to evaluate locally the kinetics of the pandemic.

METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS: Two POC laboratories, located in strategic places, were organized to receive and test samples 24 h/24. POC strategy consisted of receiving and processing naso-pharyngeal specimens in preparation for the rapid influenza diagnostic test (RIDT) and real-time RT-PCR assay (rtRT-PCR). This strategy had the theoretical capacity of processing up to 36 samples per 24 h. When the flow of samples was too high, the rtRT-PCR test was abandoned in the POC laboratories and transferred to the core virology laboratory. Confirmatory diagnosis was performed in the core virology laboratory twice a day using two distinct rtRT-PCR techniques that detect either influenza A virus or nA/N1N1v. Over a period of three months, 1974 samples were received in the POC laboratories, of which 111 were positive for nA/H1N1v. Specificity and sensitivity of RIDT were 100%, and 57.7% respectively. Positive results obtained using RIDT were transmitted to clinical practitioners in less than 2 hours. POC processed rtRT-PCR results were available within 7 hours, and rtRT-PCR confirmation within 24 hours.

CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE: The POC strategy is of benefit, in all cases (with or without rtRT-PCR assay), because it provides continuous reception/processing of samples and reduction of the time to provide consolidated results to the clinical practitioners. We believe that implementation of the POC strategy for the largest number of suspect cases may improve the quality of patient care and our knowledge of the epidemiology of the pandemic.

Point of Care Strategy for Rapid Diagnosis of Novel A/H1N1 Influenza Virus

Antoine Nougairede^{1,2}, Laetitia Ninove^{1,2}, Christine Zandotti¹, Xavier de Lamballerie^{1,2}, Celine Gazin¹, Michel Drancourt^{1,3}, Bernard La Scola^{1,3}, Didier Raoult^{1,3}, Remi N. Charrel^{1,2*}

1 Fédération de Microbiologie, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, **2** Unité des Virus Emergents, UMR 190 "Emergence des pathologies virales", Université de la Méditerranée & Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France, **3** Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes UMR CNRS 6236 IRD 3R198, IFR 48, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France

Abstract

Background: Within months of the emergence of the novel A/H1N1 pandemic influenza virus (nA/H1N1v), systematic screening for the surveillance of the pandemic was abandoned in France and in some other countries. At the end of June 2009, we implemented, for the public hospitals of Marseille, a Point Of Care (POC) strategy for rapid diagnosis of the novel A/H1N1 influenza virus, in order to maintain local surveillance and to evaluate locally the kinetics of the pandemic.

Methodology/Principal Findings: Two POC laboratories, located in strategic places, were organized to receive and test samples 24 h/24. POC strategy consisted of receiving and processing naso-pharyngeal specimens in preparation for the rapid influenza diagnostic test (RIDT) and real-time RT-PCR assay (rtRT-PCR). This strategy had the theoretical capacity of processing up to 36 samples per 24 h. When the flow of samples was too high, the rtRT-PCR test was abandoned in the POC laboratories and transferred to the core virology laboratory. Confirmatory diagnosis was performed in the core virology laboratory twice a day using two distinct rtRT-PCR techniques that detect either influenza A virus or nA/H1N1v. Over a period of three months, 1974 samples were received in the POC laboratories, of which 111 were positive for nA/H1N1v. Specificity and sensitivity of RIDT were 100%, and 57.7% respectively. Positive results obtained using RIDT were transmitted to clinical practitioners in less than 2 hours. POC processed rtRT-PCR results were available within 7 hours, and rtRT-PCR confirmation within 24 hours.

Conclusions/Significance: The POC strategy is of benefit, in all cases (with or without rtRT-PCR assay), because it provides continuous reception/processing of samples and reduction of the time to provide consolidated results to the clinical practitioners. We believe that implementation of the POC strategy for the largest number of suspect cases may improve the quality of patient care and our knowledge of the epidemiology of the pandemic.

Citation: Nougairede A, Ninove L, Zandotti C, de Lamballerie X, Gazin C, et al. (2010) Point of Care Strategy for Rapid Diagnosis of Novel A/H1N1 Influenza Virus. PLoS ONE 5(2): e9215. doi:10.1371/journal.pone.0009215

Editor: Robyn Klein, Washington University School of Medicine, United States of America

Received: November 21, 2009; **Accepted:** January 25, 2010; **Published:** February 17, 2010

Copyright: © 2010 Nougairede et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partly funded by AP-HM Public Hospital system and by the FP7 European project n°228292 European Virus Archive (EVA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: remi.charrel@univmed.fr

Introduction

In late April 2009, The World Health Organization (WHO) announced the emergence of a novel A/H1N1 influenza virus (nA/H1N1v). This virus spread rapidly, and after two months the WHO raised the alert level from phase 5 to phase 6 defining the first influenza pandemic of the 21st century [1]. At the beginning of the pandemic, some countries established measures to identify all possible cases, but rapidly and due to the constant increase of suspected cases, they decided to abandon the systematic screening.

In France, the initial strategy which commenced at the end of April 2009 relied on the early identification of suspect cases which were directed into the hospital system to be tested for nA/H1N1v, the positive cases being further hospitalized in an isolation ward to reduce secondary transmission. This approach provided information concerning the kinetics of the pandemic when the most positive cases were acquired abroad. The systematic screening of all suspect cases was abandoned on July 7th and replaced by

sentinel systems to estimate the number of cases from surveillance of certain populations and to target groups with higher risk of morbidity or mortality [2]. This cessation of laboratory-confirmed cases eliminated the possibility of a reliable estimation of the evolution of the pandemic in France. Figures varying from 28,000 (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, France) to 130,000 (Réseau sentinelles, France) cases weekly were claimed during the same period depending on the source data [3]. The data gathered at the beginning of the pandemic in Europe clearly indicate that the positive predictive value of the clinical examination during examination by general practitioners or infectious disease specialists ranged between 8 and 25%, which is very low, thus justifying a laboratory-based diagnostic approach [2,4,5,6]. This is a strong argument to maintain laboratory confirmation of nA/H1N1v suspect cases to provide robust epidemiological data. Even if the results are biased, the calculated proportion of laboratory-confirmed nA/H1N1v infection cases amongst suspect cases enables extrapolation to provide a

reasonable estimation of the total number of cases. Because of the innate evolving nature of an epidemic/pandemic caused by a transmissible agent, such an extrapolation must be periodically updated for comparison with the kinetics of the pandemic from unambiguous data as derived from laboratory-confirmed diagnostic tests.

To maintain systematic surveillance in the public hospitals of Marseille, we organized our two POC laboratories to perform rapid diagnosis of nA/H1N1v. Here we describe the POC organization, the results of POC laboratories during three months, and the sensitivity and the specificity of the POC-based results during this period.

Materials and Methods

Clinical Samples

Following national regulations under the term of Biomedical Research (Loi Huriet-Sérusclat (loi 881138)), the signature at the hospital entrance office warrants that all samples done during hospitalization for diagnostic purpose are accessible for research (excluding human genetic research) without specific consent of the patient and then ethics approval was not asked for regarding the terms of the Loi Huriet-Sérusclat (loi 881138).

For each patient, specimens from both nostrils were obtained with the same Virocult swab (Virocult MW950; Medical Wive and Equipment Co.). Specimens collected were rapidly transported at room temperature for testing in the POC laboratory.

Processing, Aliquoting, Internal Control Spiking and Rapid Influenza Diagnostic Test (RIDT)

In a class-2 biosafety cabinet, nasal swabs were resuspended in 1 mL of sterile PBS solution and transferred into a 2 mL cryotube. Two aliquots were prepared respectively for RIDT and nucleic acid extraction. The remaining material, to be tested in the core laboratory was (i) either stored at -80°C in the La Timone hospital POC laboratory, (ii) or stored at -20°C temporarily in the North hospital POC laboratory and shipped to La Timone core laboratory on dry ice every 3 hours. RIDT was performed using the Directigen EZ influenza A+B test (BD EZ Flu A+B, Becton, Dickinson and Company) according to the manufacturer's recommendations.

RNA Extraction

One 200- μL aliquot of suspended nasal swab was added to a 2 mL tube containing 200 μL of AVL buffer and 10 μL of MS2 phage internal control and incubated for 10 minutes at room temperature for inactivation. Extracted nucleic acids were then purified using the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (elution volume: 90 μL) onto the EZ1 Biorobot (both from Qiagen).

Quantitative Real Time PCR Assays

Each sample was tested by two rtRT-PCR systems: (i) a rtRT-PCR assay using SYBR Green technology targeting all influenza A viruses [7], and (ii) a rtRT-PCR assay specific for the nA/H1N1v. The latter was developed and provided by the French Influenza Reference National Center [2]. This test was used in both POC laboratories on a two-block SmartCycler system (reaction volume: 25 μL), and in the core laboratory on either an Mx3005p thermocycler (Stratagene) or an LC480 thermocycler (Roche) (reaction volume: 50 μL). rtRT-PCR reactions were performed using the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) under the same conditions in POC and core laboratories. Standard quantities of 2X PCR Master Mix and SuperScript III RT/Platinum Taq Mix were added to the mixture

reaction containing 0.8 μM of each primers (GRswH1-349Fw GAGCTAAGAGAGCAATTGA; GRswH1-601Rv GTAGATG-GATGGTGAATG) and 0.2 μM of the probe (GRswH1-538 Probe TTGCTGAGCTTTGGGTATGA [5']Fam [3']BHQ-1). A volume of 5 μL and 10 μL of total RNA was used for 25 μL and 50 μL final reaction volumes respectively. Positive controls consisted of (i) an *in-vitro* synthesized RNA transcript, and (ii) a patient-derived positive sample that was used in the core laboratory only. Reaction conditions were as follows: reverse transcription at 50°C for 15 min, initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 40 s.

Results

POC Laboratory Organization in Marseille

In Marseille, the recent reorganization of the health structures (4 public hospitals) was achieved through the implementation of unique core laboratory for Clinical Microbiology. Centralization of the laboratories so that they serve several hospitals maximizes the efficiency of testing, thus reducing costs but has the disadvantage of poor communication with physicians in clinical wards and problems of specimen transfer [8]. As countermeasures, we decided to establish two Point Of Care (POC) laboratories located in the vicinity of the emergency units (see Figure 1) to reduce delays due to sample transportation and to reduce time to obtain the results for selected analyses. Open 24 h/24 and operated by one person, POC laboratories can rapidly perform a large panel of analyses (see Table 1). For selected parameters, the results were confirmed by the core virology laboratory.

POC Laboratory Adaptation for Diagnosis of nA/H1N1v

When secondary cases of nA/H1N1v were documented in France, we decided to implement rapid detection of nA/H1N1v in the POC laboratories to provide rapid diagnosis and to study levels and variation of virus circulation. Both POC laboratories were adapted to process clinical specimens under appropriate biosafety conditions, and to perform nA/H1N1v detection via rapid

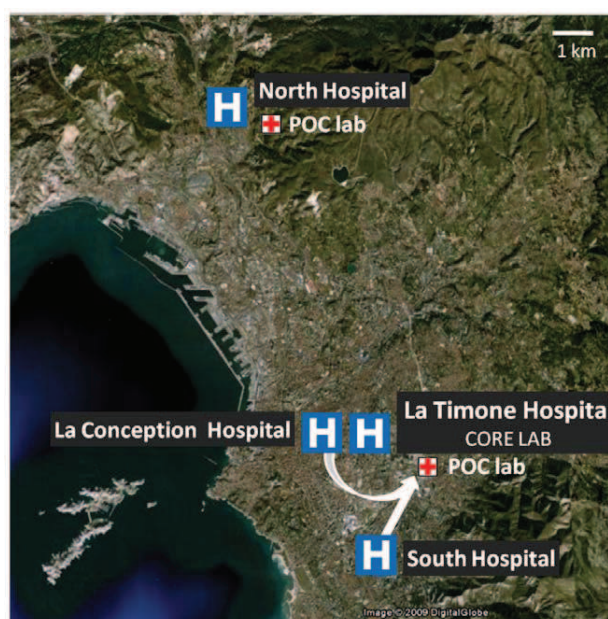


Figure 1. POC laboratories organization in Marseille.
doi:10.1371/journal.pone.0009215.g001

Table 1. List of POC analysis.

	Pathogen agent	Specimen	Test/Target	Time for result
Pharyngitis	Group A Streptococcus	pharyngeal swab	ICT/Antigen	30 min
	Epstein Barr Virus	serum	ICT/Antibody	30 min
Pneumopathy	Mycoplasma pneumoniae	sputum or nasopharyngeal aspirate	qPCR/Genome	3 h30
	Bordetella pertussis	sputum or nasopharyngeal aspirate	qPCR/Genome	3 h30
	Legionella pneumophila	urine	ICT/Antigen	30 min
	Influenza A/B virus	nasopharyngeal aspirate	ICT/Antigen	30 min
	Respiratory syncytial virus	nasopharyngeal aspirate	ICT/Antigen	30 min
Diarrhoea	Rotavirus and Adenovirus	stool	ICT/Antigen	30 min
	Clostridium difficile	stool	ICT/Antigen	30 min
Meningitis	Neisseria meningitidis	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3 h30
	Streptococcus pneumoniae	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3 h30
	Mycoplasma pneumoniae	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3 h30
	Herpes Simplex Virus 1/2	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3 h30
	Enterovirus	Cerebrospinal fluid	qRT-PCR/genome	2 h30
	Cryptococcus	Cerebrospinal fluid	ICT/Antigen	45 min
Gynaecology	Group B Streptococcus	vaginal swab	qPCR/Genome	2 h30
	HIV 1/2	serum	ICT/Antibody	30 min
Tropical fever	Plasmodium	blood	ICT/Antigen	30 min
	Dengue Virus	serum	ICT/Antigen and Antibody	30 min
Blood exposure accident	HIV 1/2	serum	ICT/Antibody	30 min
Risk of Tetanus	Tetanus	serum	ICT/Antibody	30 min
Gastroenterology	Helicobacter pylori	urine	ICT/Antigen	30 min
Urinary tract infection	Urinary reactive strip	stool	colorimetric assay	30 min
Procalcitonine	Procalcitonine	serum	ICT/Antigen	45 min

ICT: immuno-chromatographic test.
doi:10.1371/journal.pone.0009215.t001

influenza diagnostic tests (RIDT), and real time RT-PCR (rtRT-PCR) on SmartCycler (Cepheid). POC operators were trained to work in class II laminar hoods, and to perform RIDT and rtRT-PCR for influenza virus. The rtRT-PCR detection was performed using the test recommended by the French Influenza Reference National Centre which was adapted on SmartCycler [2]. When received at the POC laboratory, specimens were systematically spiked with an internal control that monitored all steps of the technical process from nucleic acid extraction to rtRT-PCR. Comparative evaluation with the same protocol operated in an MX3005P thermocycler (Stratagene) showed a lower sensitivity for low copy number specimens, but no significant difference in term

of specificity (data not shown). Therefore positive rtRT-PCR results were validated at the POC level. The training duration for all steps of sample analysis in POC was shorter than one working day (see table 2). The cost necessary to implement POC capacity to perform nucleic acid extraction and rtRT-PCR assay was estimated at 110,000 € for the equipment and 19 € per sample (see table 2). The maximal flow capacity (upper limit) of the POC laboratory for detection of nA/H1N1v was theoretically 36 samples per day (see figure 2). In our experience, a POC laboratory was saturated when more than 20–25 samples to be tested for nA/H1N1v were received per day. This discrepancy is mainly due to two points: (i) samples were not received

Table 2. Equipment, cost and training duration required for POC laboratory implementation.

Equipment/assay	Cost	Maximum number of specimens tested per run	Training duration
RIDT influenza A+B (Directgen Influenza Test Kit, Becton Dickinson)	8 €/sample	-	30 min
Extraction Instrument (EZ1 BioRobot, Qiagen)	30 000 €	6 (45 min)	1 h
Viral RNA extraction (EZ1 Virus Mini Kit v2.0, Qiagen)	5 €/sample		
rtRT-PCR for nA/H1N1v and internal control (SSIII platinum one step qRT-PCR, Invitrogen)	6 €/sample	14 (2 h30)	3 h
Thermocycler (Smart cycler, Cepheid) two blocks	75 000 €		
Biosafety cabinet	≈5 000 €	-	1 h

doi:10.1371/journal.pone.0009215.t002

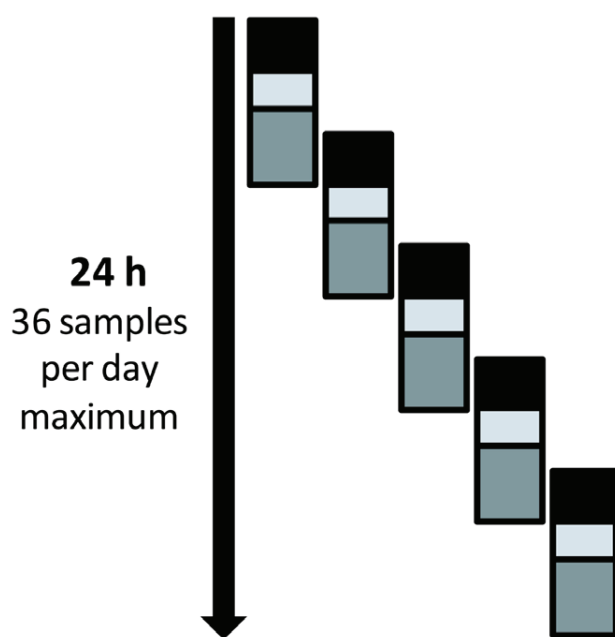


Figure 2. Flow capacity in POC laboratory for detection of nA/H1N1v. Black boxes represent sample receipt, registration, processing, aliquoting, internal control spiking and rapid influenza A+B test (2 h for 6 samples). Light grey boxes represent RNA extraction (6 maximum) and PCR-mix preparation (1 h30). Dark grey boxes represent rtRT-PCR (detection of nA/H1N1v on SmartCycler), interpretation and results validation (3 h).
doi:10.1371/journal.pone.0009215.g002

continuously during the 24^h period, (ii) POC diagnostic activities were maintained and operators had to process other samples for detection of viruses and bacteria other than nA/H1N1v (see Table 1).

POC Laboratory Data from June 23rd to September 27th 2009

From June 23rd 2009 to September 27th 2009, 1974 samples were analyzed in the two POC laboratories (see figure 3). The

majority of samples originated from emergency wards (pediatrics and adults) (64.7%) and from the specific influenza consultation located in the North Hospital (9.5%). The median and mean ages were 21 years and 25.4 years respectively for these 1974 patients (see table 3). The two POC laboratories processed a similar number of specimens. At the beginning of the period, each laboratory tested about 30–40 samples per week. Then there was an obvious increase in the activity with more than 150 samples weekly from mid August to Sept 7th, and more than 250 samples weekly for the three last weeks of September (see figure 3). In late August, this rapid increase of clinical specimens constrained us to stop performing rtRT-PCR, while sample processing, RIDT and nucleic acid extraction were maintained at the POC level.

From late June to late August 990 samples were processed in POC laboratories. During this period, a proportion of samples, for which nucleic acid extraction was performed at POC level, was rtRT-PCR tested only in the core laboratory (427 samples); 563/990 samples were tested using the rtRT-PCR on SmartCycler in POC laboratories, of which 33 (5.9%) were positive. From late August to late September, all samples extracted by POC were tested directly by the core laboratory twice a day.

Among the 1974 samples received in POC laboratories, 111 (5.6%) samples were positive after core laboratory confirmation using rtRT-PCR. A total of 1974 RIDT were performed, of which 64 were positive. These 64 RIDT positive samples were confirmed by A/H1N1 rtRT-PCR, then RIDT specificity was 100% (no false positive). Of the 111 core laboratory positive samples, 47 were not detected using RIDT (false negative). Therefore, the sensitivity of the POC strategy for A/H1N1 was 57.7% using RIDT and 84.6% using POC rtRT-PCR assay. We determined the positive and negative predictive value (PPV and NPV) for each step of the POC process (see figure 4).

From mid-August, the number of samples received for testing started to increase. In parallel, the number of positive samples equal to or higher than 10 per week was observed (except for week 36; see figure 3). During September, we observed an increase of specimens received for testing, whereas the number of positive samples remained stable being constantly lower than 6% of tested samples (see figure 3).

The delay necessary to obtain the results was (i) <2 h for the 64 samples with positive RIDT and (ii) 4–7 h for the 546 samples -

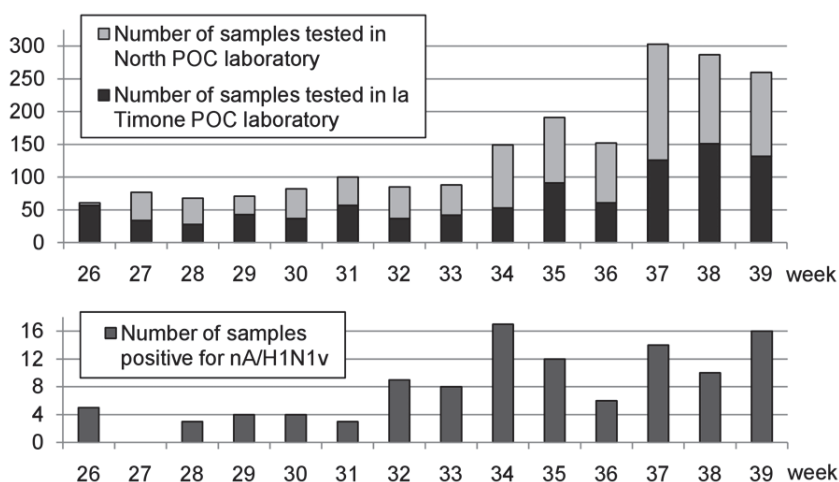


Figure 3. Time distribution of samples tested and positive for nA/H1N1v in POC laboratories. Positive samples correspond to rtRT-PCR core laboratory-confirmed results regardless the result obtained at the POC level.
doi:10.1371/journal.pone.0009215.g003

Table 3. Characteristics and results for each group described in this study.

	Age mean (year)	Age median (year)	Samples tested	Samples positive for nA/H1N1v	Samples positive for seasonal influenza virus
All POC samples	25.4	21	1974	111 (5.6%)	9
Adults emergency	42.0	36	596	28 (4.7%)	2
Pediatrics emergency	4.0	3	682	45 (6.6%)	1

doi:10.1371/journal.pone.0009215.t003

with negative RIDT - tested using rtRT-PCR in POC laboratories. For the remaining 1364 samples, the uninterrupted nucleic acid extraction at POC level reduced the time to obtain the results (10–24 h). Computer-based communication of results also saved the time that would normally be dedicated to telephone calls for both the physician and the POC operator.

To assess circulation of nA/H1N1v in infants and in adults, we compared the percentage of positive samples in pediatric and adult emergency wards (Table 3). From late June to mid-August, pediatric and adult emergency wards tested about 3 patients per day. The number of positive samples was low until August, then it sharply increased. In August and September, the percentage of positive samples progressively increased for children and decreased for adults, indicating a tendency that persisted in October (data not shown; figure 5).

Core Laboratory Data from April 25th to September 27th 2009

The core laboratory processed confirmatory tests for all samples received at POC laboratories using (i) the rtRT-PCR nA/H1N1v assay aforementioned and (ii) an rtRT-PCR SYBR Green system which detected all Influenza A viruses [7]. Both PCR reactions were performed on either the Mx3005p thermocycler (Stratagene) or the LC480 thermocycler (Roche). From April 25th 2009 to September 27th 2009, the core laboratory received and processed 3609 samples for nA/H1N1v detection. A total of 339 samples were positive (9.4%). During the entire period, our laboratory was in charge of testing human samples corresponding to 9 French departments (south-eastern France) representing 8 million inhabitants. From late April to early July, the authorities recommended

to test all suspect cases [2]. During this period up to 50 specimens were received weekly. On June 23rd 2009, we started to implement the POC strategy for all samples received from Marseille public hospitals, while samples received from hospitals and practitioners outside of Marseille were processed directly in the core laboratory. This strategic change was synchronous with a drastic increase in the weekly number of samples. During this period, about 100–150 samples were received each week until mid-August which witnessed an obvious increase in the activity with more than 200 samples during the next three weeks and more than 500 samples in the following three weeks of September (see figure 6).

Discussion

POC strategy for nA/H1N1v requires minimal training, necessitates a small dedicated laboratory area available in any hospital setting and can be operated by one person. It enables the hospital to provide diagnosis within the period of clinical illness. This is imperative if one wishes to take the decision to treat the patient, to decide to isolate the patient to prevent nosocomial transmission, or to discharge the patient. It provides reliable data for studies of the local epidemiology and its evolution. It also contributes to defining and monitoring the epidemiology on a larger scale (regional, national, international), via extrapolation based on the percentage of laboratory-confirmed cases compared with suspect cases. The usefulness of the POC strategy in the context of the nA/H1N1v pandemic demonstrates that POC could usefully be implemented throughout the country not only for emergency situations but also as a daily tool to improve the quality of care for hospitalized patients, by shortening the delays and allowing decisions during the period of clinical presentation. It is

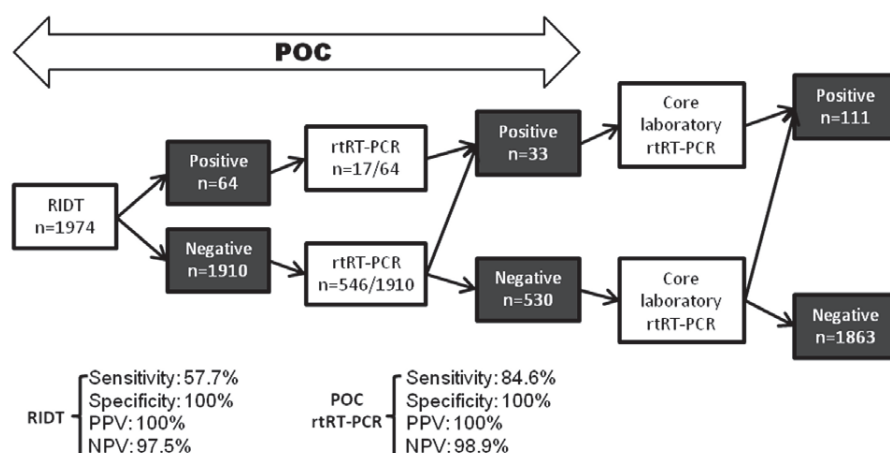


Figure 4. Flow chart of POC samples with sensitivity and specificity of each step. PPV: Positive predictive value. NPV: Negative predictive value.

doi:10.1371/journal.pone.0009215.g004

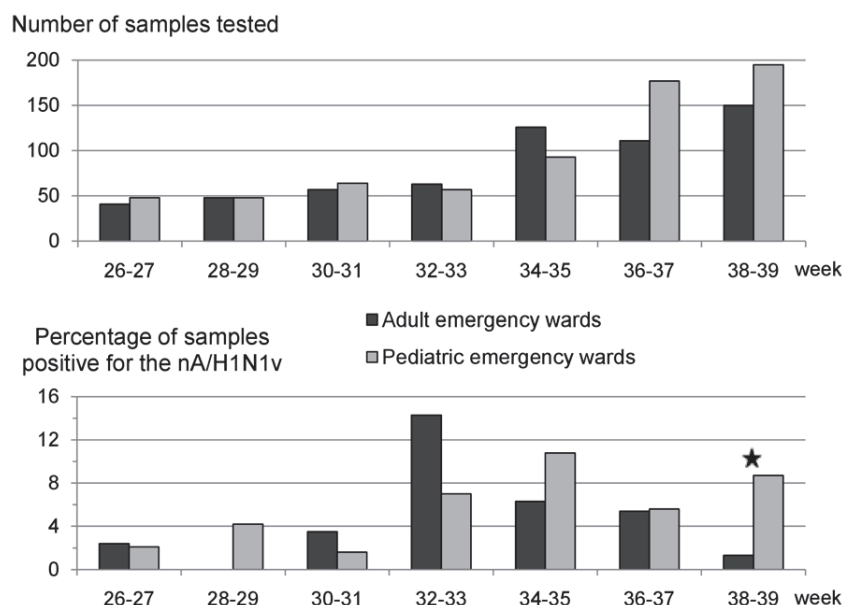


Figure 5. Time distribution of samples received/positive from adult and pediatric emergency wards. Positive samples correspond to rtRT-PCR core laboratory-confirmed results regardless the result obtained at the POC level. ★: $p < 0.01$ (chi-square test). doi:10.1371/journal.pone.0009215.g005

likely that hospitalization costs would also directly benefit from POC strategy, through reduction of the duration of hospitalization as previously demonstrated [9,10]. Our experience demonstrates that POC laboratory implementation reduces the time necessary to obtain the results in all cases, even when the molecular techniques are not performed at the POC level. Although, the sensitivity of POC tests is usually lower than that of rtRT-PCR techniques, their high PPV enables clinical decisions to be taken much more rapidly than in the standard diagnostic approach.

One can argue that an efficient transportation system may be less expensive than setting up a POC facility because of the short distance (less than 10 km) between the North Hospital and the core laboratory. However, our experience is that delays due to transfer for medical ward to core laboratory can vary greatly (up to 7 hours). In our hospital system, samples transportation is operated by messengers (with cars). The long delays may be sometimes due to heavy traffic between the two hospitals (more than 1 hour). Beside, as MDs, we have no hierarchical authority on the messengers. This situation has been discussed with the administrative head of the hospital, but no satisfactory solution could be found. This is the reason why the POC laboratory solution has been considered and developed.

In our opinion, the decision to abandon systematic laboratory testing of suspect patients was equivalent to breaking the thermometer while attempting to define the body temperature curve. We believe that the application of diagnostic tools for respiratory tract infections (RTI) enables the doctors and nurses to work efficiently to combat this group of diseases that the most common cause of death worldwide [11] and the most neglected cause of reduced longevity [12]. In the current pandemic situation where less than 10% of tested specimens were found positive for nA/H1N1v, the economic impact of rapid testing through the POC strategy is very important. Indeed, all negative patients - the large majority of suspect patients for the considered study period - can therefore return to their professional activities immediately. The re-admission of students in the educational course is often conditioned by a certificate assessing the absence of contagiousness for nA/H1N1v, which needs to be based on specific virologic diagnostic tests such as those implemented in the POC strategy. Finally, a better knowledge of the local and seasonal ecology of RTI microorganisms must help to determine the panel of agents to be tested at the POC level. As an example, the findings that 34% of suspected nA/H1N1v infections were in fact due to rhinoviruses [13] should theoretically justify POC testing for these viruses. It is

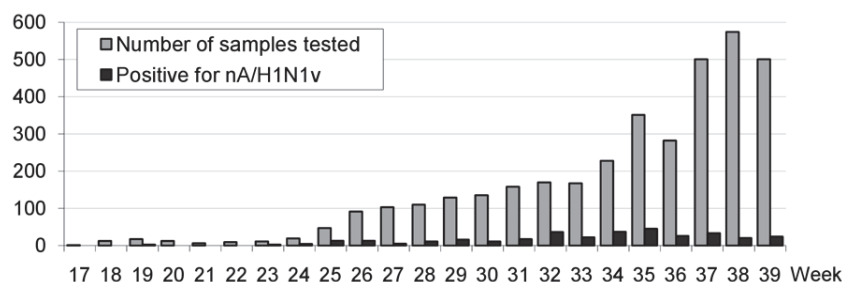


Figure 6. Number of samples tested/positive in the core laboratory from April to September 2009. Samples were tested using two rtRT-PCR assays (see materials and methods). doi:10.1371/journal.pone.0009215.g006

also likely that the panel of POC detected pathogens will progressively increase to other agents causing respiratory tract infections. To address influenza morbidity and mortality, the approach based on systematic screening is more efficient than passive methods that produce underestimated data, in part due to the fact that they cannot consider the role of unrecognized influenza infection as a decisive co-morbidity factor in patients with underlying cardiovascular disease, hypertension, chronic pulmonary diseases and endocrine disorders [14]. Therefore passive surveillance tends to hinder the knowledge of epidemiology of this pandemic [3]. Systematic detection for each patient with severe influenza-associated pathology like acute respiratory distress syndrome [15] or for each patient with high mortality risk like

pregnant woman [16] may contribute to appreciating the true incidence of influenza infection in such specific groups.

Acknowledgments

The authors wish to thank all the interns involved in POC activities from May to October 2009, the technicians of the Virology laboratory and BIOTOX unit, and Professor Ernest A. Gould for English improvement.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AN XdL MD BLS DR RNC. Performed the experiments: AN LN CZ CG. Analyzed the data: AN LN CZ XdL CG MD BLS DR RNC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AN LN CZ CG. Wrote the paper: AN DR RNC.

References

1. World Health Organization (2009) Statement to the press by WHO Director-General Dr Margaret Chan. Available: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html. Accessed on 2009 Aug. 15.
2. Levy-Bruhl D, Vaux S (2009) Modified surveillance of influenza A(H1N1)v virus infections in France. *Euro Surveill* 14.
3. InVS: Institut de Veille Sanitaire, France (2009) Bulletin épidémiologique grippe A (H1N1) 2009. Point au 29 septembre 2009 à 11 h. Available: http://www.invs.sante.fr/display/?doc=surveillance/grippe_dossier/index_h1n1.htm. Accessed on 2009 Oct. 20.
4. Belgian working group on influenza A(H1N1)v (2009) Influenza A(H1N1)v virus infections in Belgium, May-June 2009. *Euro Surveill* 14.
5. Lytras T, Theocharopoulos G, Tsiodras S, Mentis A, Panagiotopoulos T, et al. (2009) Enhanced surveillance of influenza A(H1N1)v in Greece during the containment phase. *Euro Surveill* 14.
6. Rizzo C, Declich S, Bella A, Caporali MG, Lana S, et al. (2009) Enhanced epidemiological surveillance of influenza A(H1N1)v in Italy. *Euro Surveill* 14.
7. Ninove L, Gazin C, Gould EA, Nougaiere A, Flahault A, et al. (2009) A Simple Method for Molecular Detection of Swine-Origin and Human-Origin Influenza A Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*.
8. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M (2004) What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2: 151–159.
9. Woo PC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M (1997) Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 35: 1579–1581.
10. Ninove L, Tan C, Nougaiere A, Zandotti C, Richet H, et al. (2009) Impact of diagnostic procedures on patient management and hospitalisation cost during the 2000 and 2005 enterovirus epidemics in Marseilles, France: *Clin Microbiol Infect* In Press.
11. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430: 242–249.
12. Enserink M (2009) Global health. Some neglected diseases are more neglected than others. *Science* 323: 700.
13. Follin P, Lindqvist A, Nystrom K, Lindh M (2009) A variety of respiratory viruses found in symptomatic travellers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. *Euro Surveill* 14.
14. Hanshaworakul W, Simmerman JM, Narueponjirakul U, Sanasuttipun W, Shinde V, et al. (2009) Severe human influenza infections in Thailand: oseltamivir treatment and risk factors for fatal outcome. *PLoS One* 4: e6051.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009) Intensive-care patients with severe novel influenza A (H1N1) virus infection - Michigan, June 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58: 749–752.
16. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, et al. (2009) H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 374: 451–458.

3. Discussion

Afin de s'adapter constamment à l'afflux croissant de prélèvements respiratoires, la stratégie mise en place au POC a évolué. La PCR en temps réel a été rapidement abandonnée car trop prenante. De plus, la gestion des barrettes de PCR prêtes à l'emploi utilisées par les internes posait problème. Le choix de continuer à réaliser l'extraction des prélèvements au niveau des deux laboratoires POC au fur et à mesure s'est avéré être très utile. Durant la vague pandémique, les deux laboratoires POC ont traité certains jours plus de 100 prélèvements. La mise à disposition des extraits a souvent permis de rendre les résultats de biologie moléculaire en moins de 24 heures, le délai maximum prévu par les autorités à cette période.

Une des difficultés rencontrée lors de la mise en place de la recherche de grippe aux deux laboratoires POC a été d'expliquer aux cliniciens comment interpréter les résultats des tests rapides. Il leur était spécifié que seuls les tests positifs devaient être pris en compte et cela était également inscrit à côté du résultat sur le logiciel de notre laboratoire.

IV. DISCUSSION GENERALE

Fin avril 2009, un nouveau virus d'origine porcine émerge au Mexique et aux Etats-Unis. Rapidement, ce virus est détecté aux quatre coins du monde et le 11 juin 2009, l'OMS déclare officiellement que la première pandémie grippale du XXI^{ème} siècle est en cours. Alors que tous les regards étaient tournés vers l'Asie depuis l'apparition de cas humains d'infections par le virus aviaire A/H5N1 hautement pathogène, c'est un virus A/H1N1 quadruple-réassortant d'origine porcine qui émergea. La date exacte de l'apparition des premiers cas humains et la nature des mécanismes qui ont conduit à la création de ce nouveau variant sont aujourd'hui encore inconnus, montrant bien la complexité des phénomènes qui régissent l'évolution des virus grippaux A. Depuis la pseudopandémie de 1977-1978, deux virus grippaux A co-circulaient dans le monde causant chaque hiver des épidémies dans les régions tempérées. L'émergence d'un virus A/H1N1 créa la surprise pour plusieurs raisons. Les pandémies du XX^{ème} siècle ont toutes été associées à l'émergence de virus portant un ou deux antigènes de surface (HA et NA) d'un sous type différent de ceux qui circulaient lors de leur émergence, ce qui n'a pas été le cas en 2009. Cependant, l'HA et la NA du virus A/H1N1pdm sont toutes deux d'origine animale. De plus, le sous-type de ce nouveau variant était le même que celui qui causa la pandémie de 1918-1919 responsable de dizaines de millions de morts dans le monde. Cette ressemblance durant les premiers mois suivant la découverte du virus A/H1N1pdm a probablement influencé les autorités sanitaires sur les mesures prises pour répondre à cette pandémie. Il est cependant vrai que hormis quelques articles publiés en mai et juin 2009, nous ne connaissions rien de la pathogénicité et de la transmissibilité de ce nouveau variant, et la plupart des informations qui circulaient dans le monde étaient essentiellement des avis d'experts. Par ailleurs, les premières données venant du Mexique sur la proportion de formes sévères et de décès étaient supérieures à celles observées avec l'épidémie hivernale de grippe saisonnière.

Dans ce contexte, nous avons débuté la détection de ce nouveau variant au laboratoire de virologie des hôpitaux de Marseille. En effet, la surveillance épidémiologique

sur le territoire français à cette époque était très importante. Elle avait pour but de détecter les personnes infectées, d'isoler ces premiers cas dans des services spécialisés pour éviter l'apparition de cas secondaires et bien-sûr de prendre en charge ces patients (traitement antiviral, etc.). Notre laboratoire était alors le seul laboratoire de niveau A de la zone de défense sud (8 millions d'habitants). Nous réalisions donc l'ensemble des analyses pour cette zone. Cette première phase dite de dépistage systématique des cas probables a duré jusqu'en juillet 2009, date à laquelle la multiplication des foyers d'infection en France ne permettait plus de contenir la diffusion du virus. De plus, à cette période, les premières données plutôt rassurantes en termes de gravité et de mortalité commençaient à sortir.

L'OMS et les autorités sanitaires françaises ont recommandé dès le départ l'utilisation d'au moins deux tests moléculaires : un détectant tous les virus grippaux A, et un spécifique de ce nouveau variant A/H1N1pdm. Nous avons alors décidé d'adapter notre test diagnostique de PCR en temps réel (avec sonde d'hydrolyse) utilisé auparavant en ne gardant que les amorces et en réalisant une PCR en milieu Syber Green (agent intercalant) (cf. article 4, ANNEXE A). Ce test permet de détecter toutes les gripes A et de différencier en plus les gripes A saisonnières du nouveau variant (grâce à la lecture des courbes de fusion des produits de PCR). Il a été utilisé en 2009-2010 sur plus de 13 000 échantillons traités et il fait maintenant partie de notre panel de tests de biologie moléculaire au laboratoire. Le test de biologie moléculaire spécifique du nouveau variant a été quand à lui fourni par le centre national de référence de la grippe (Institut Pasteur). Depuis la pandémie de 2009-2010, nous utilisons en routine ces tests de biologie moléculaire pour le diagnostic des infections virales respiratoires permettant ainsi d'améliorer notre sensibilité pour la détection de ces virus.

L'utilisation des tests d'IF directe et des tests rapides n'était pas recommandés durant cette pandémie. Cependant, nous avons utilisé notre test rapide sur les premiers prélèvements reçus afin d'établir sa sensibilité qui s'est rapidement avérée être aux alentours de 50% (valeur confirmée sur plus de 1600 prélèvements positifs en PCR en 2009-2010). Malgré cette faible sensibilité, l'usage des tests rapides, réalisables en moins d'une demi-heure peut s'avérer très utile si la PCR est réalisée dans le même temps (<24h) et si les cliniciens sont conscients que seuls les résultats positifs doivent être considérés. Cela est

encore plus vrai pour les enfants chez lesquels nous avons trouvé une sensibilité d'environ 60%. Durant la vague pandémique qui a débuté mi-octobre à Marseille, l'utilisation de tests rapides a permis de rendre environ 25% des résultats en moins de deux heures ce qui a probablement permis une prise en charge plus rapide et plus adaptée pour un grand nombre de patients (au pic de l'épidémie environ 300 prélèvements étaient positifs chaque semaine). Néanmoins des études coût-efficacité plus complètes devront être menées dans le futur afin d'évaluer réellement l'avantage conféré par l'utilisation de ces tests rapides.

Le nombre de tests réalisés chaque jour au laboratoire n'a cessé d'augmenter au cours du temps. En juillet 2009, la barre des 100 prélèvements par semaine fut atteinte et à partir de fin août, 300 à 500 prélèvements étaient traités hebdomadairement. Enfin, durant la vague pandémique, plus de 800 prélèvements étaient reçus chaque semaine. De plus, nous devions rendre le résultat de la PCR en moins de 24 heures et les cliniciens étaient souvent très pressés de les obtenir. C'est dans ce contexte que nous avons dû adapter constamment les moyens humains et matériels pour faire face à cet afflux toujours plus croissant de prélèvements. Fin juin 2009 nous avons décidé de traiter tous les prélèvements dans nos deux laboratoires POC. Mis en place en 2008 et ouverts 24h/24 et 7 jours sur 7, ces deux laboratoires gérés uniquement par les internes du service réalisent un panel de tests d'urgence. L'utilisation du POC, avec ou sans réalisation de la PCR *in situ* a permis d'accélérer le traitement des échantillons et donc le temps de rendu des résultats améliorant ainsi la prise en charge des patients. Le fait d'extraire tous les prélèvements au fur et à mesure de leur arrivée y a largement contribué et cette stratégie est depuis mise en place chaque année durant l'épidémie d'infections virales respiratoires hivernales.

La pandémie de 2009-2010 a probablement accéléré la transition au 'tout par biologie moléculaire' dans notre laboratoire. De plus, cette expérience nous a permis de mettre en place une organisation flexible qui aujourd'hui encore nous permet d'analyser plusieurs centaines de prélèvements par semaine en période épidémique. Actuellement la recherche de la grippe (un test grippe A 'saisonnier', un test grippe B et un test grippe A/H1N1pdm), du VRS (un test VRS A et un test VRS B), du Metapneumovirus et des Rhinovirus est réalisée en systématique sur l'ensemble des prélèvements respiratoires.

La réalisation de nombreuses PCR sur chaque prélèvement pose un problème de coût et de quantité d'extrait d'acides nucléiques disponibles. De nombreux systèmes de PCR multiplex ont été décrits pour contourner ces problèmes (Caliendo, 2011). De plus, de nouvelles méthodes très sensibles permettent aujourd'hui de détecter un grand nombre de virus respiratoires : après l'extraction, une étape unique d'amplification suivie d'une révélation utilisant des technologies nouvelles telles que les biopuces, la spectrométrie de masse ou la cytométrie de flux permettent d'obtenir les résultats pour un panel de pathogènes respiratoires (Chen *et al.*, 2011b; Krunic *et al.*, 2007; Renois *et al.*, 2010). Cependant, toutes ces techniques qui peuvent être utilisées en routine doivent être réalisées par des laboratoires disposant de locaux adaptés à la biologie moléculaire et nécessitent plusieurs étapes. Il existe aujourd'hui des techniques entièrement automatisées (extraction, amplification, +/- révélation en une seule étape) qui permettent de rendre des résultats en quelques heures et qui sont très faciles d'utilisation (GeneXpert de Cepheid, BD-Max/Jaguar de Becton-Dickinson/HandyLab et FilmArray de Idaho Technologies). Le test est lancé en moins d'un quart d'heure (ajout de réactifs et du prélèvement), et le manipulateur n'a plus qu'à récupérer les résultats. Ces tests utilisent des techniques de RT-PCR en temps réel (Xpert Flu sur GeneXpert permettant de détecter les virus grippaux A et B) ou des techniques d'amplification couplées à une révélation sur biopuces (FilmArray RP détectant un large panel de pathogènes respiratoires) (Popowitch *et al.*, 2011; Rand *et al.*, 2011). Ces tests peuvent être mis en place dans un laboratoire d'urgence ouvert 24h/24 tel que nos deux laboratoires POC à Marseille.

Les données (sexe, âge, service, etc.) concernant les patients testés ont rapidement permis d'obtenir des informations précieuses sur l'épidémiologie des infections causées par ce nouveau variant. Dès août 2009, elles indiquaient que c'était chez les enfants et les jeunes adultes que le virus circulait le plus. Les données obtenues durant la vague pandémique ont montré ensuite qu'environ 60% des prélèvements positifs avaient été réalisés chez des personnes âgées de moins de 20 ans confirmant ainsi cette tendance. D'autre part, la gestion des données sur l'hospitalisation et la mortalité ont également permis de donner aux autorités compétentes, sous forme d'un bilan hebdomadaire, un suivi en temps réel du nombre de lits occupés par les patients grippés et la proportion de forme sévères parmi ces patients. Ainsi, le recueil de données simples sur l'ensemble des patients

dépistés au laboratoire s'avère être un outil efficace de surveillance locale/régionale en complément des autres réseaux de surveillance. De plus, pour recueillir des données pertinentes il faut bien sûr dépister un maximum de patients. Cela renforce l'idée qu'il est nécessaire de tester un grand nombre de cas suspects pour obtenir ces données en période de crise.

D'autres moyens existent en France pour surveiller les épidémies de grippe comme la surveillance syndromique (réseaux sentinelles et GROG) qui consiste à récolter les données de réseaux de médecins généralistes. Les données des services d'urgences permettent également une bonne surveillance (réseau Oscour par exemple). Ces réseaux de surveillance sont très sensibles car ils permettent de centraliser assez facilement de très nombreuses données. Cependant, ces données sont basées sur les gripes cliniques (diagnostic basé sur la symptomatologie uniquement) et la pandémie de 2009-2010 a montré leurs limites : en septembre 2009, les réseaux de surveillance déclaraient un dépassement du seuil épidémique alors que moins de 5% des virus respiratoires circulants étaient des virus grippaux. En effet, d'autres virus respiratoires peuvent causer des gripes cliniques et en septembre 2009, c'est une épidémie d'infections par les rhinovirus qui provoqua en partie cette alerte. De plus, ces méthodes ne sont pas applicables dans les régions tropicales où la circulation des virus grippaux est peu connue et quasi continue. Ainsi, les données des laboratoires hospitaliers de virologie sont incontournables pour suivre une épidémie de grippe. Elles permettent en plus de caractériser les virus circulants et de surveiller la résistance aux antiviraux comme l'oseltamivir par exemple. Durant cette pandémie, tous les virus résistants à l'oseltamivir avaient la même mutation H275Y au niveau de la NA, ce qui les rendait facilement détectables avec des techniques standards de biologie moléculaire (Bautista *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2010). Pour que les données issues des laboratoires de virologie soient fiables, elles doivent porter sur un nombre suffisant d'échantillons et la détection simultanée de plusieurs pathogènes respiratoires doit être réalisée. Cela est possible aujourd'hui grâce notamment aux techniques de PCR en temps réel. Enfin, un dernier moyen récemment décrit de surveiller la grippe est l'analyse du nombre de requêtes portant sur la grippe réalisées sur le moteur de recherche le plus utilisé (Google). Une des limitations de cette méthode est qu'elle est sensible à la médiatisation d'informations concernant la grippe comme le risque d'émergence d'un virus pandémique (A/H5N1 aviaire

par exemple) ou l'émergence réelle d'un virus pandémique (A/H1N1pdm). Durant ces périodes, les données issues de Google ne sont plus corrélées aux données épidémiologiques (2011a; Ginsberg *et al.*, 2009; Pelat *et al.*, 2009). Ainsi, toutes les méthodes qui ne détectent pas les virus grippaux sont très efficaces pour suivre les épidémies de grippe saisonnière chaque année mais le sont beaucoup moins en période de crise.

L'étude de séroprévalence présentée dans l'article 5 (cf. ANNEXE B) montre qu'environ 12% de la population française a été infectée par ce nouveau virus, ce qui est peu comparé aux pandémies de 1957-1958 et 1968-1969. La plupart des sérums testés venant de Marseille (1 million d'habitants), on peut estimer qu'environ 120000 personnes ont été infectées durant la pandémie 2009-2010. En se basant sur les données publiées sur le pourcentage de cas asymptomatiques, qui donnent des valeurs comparables à celles décrites auparavant avec les virus grippaux A (cf. Introduction/Epidémiologie), 20 à 35% des personnes infectées (24000 à 42000 personnes à Marseille) l'ont été de façon asymptomatique (Li *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011). Les plus forts taux d'attaque ont été mesurés chez les enfants et les jeunes adultes alors que les personnes âgées ont été relativement épargnées du fait qu'elles étaient déjà protégées contre des virus proches qui circulaient auparavant. Cette protection des personnes âgées permet d'expliquer pourquoi cette pandémie a provoqué un nombre limité de décès car ils sont les plus fragiles face à la grippe. Ainsi, une proportion importante des décès ont eu lieu chez des enfants et des jeunes adultes dont quasiment la moitié n'avait aucun facteur de risque.

Enfin, l'année suivant la pandémie (2010-2011), l'épidémie de grippe en France a été d'intensité modérée. Les virus A/H1N1 issus de la pseudopandémie de 1977-1978 ont été remplacés par les virus A/H1N1pdm. Cette saison a en fait été marquée par une circulation à parts égales de virus grippaux A et B ce qui n'est pas le cas d'habitude, les virus B circulant généralement moins et plus tard dans le temps par rapport au virus grippaux A. Par ailleurs, les virus A/H1N1pdm ont largement dominé les virus A/H3N2 qui représentaient moins de 15% des virus grippaux A détectés (Belchior, 2011).

Les résultats présentés dans cette thèse auraient pu être complétés en intégrant notamment une étude de la variabilité génétique inter-hôte et une surveillance de la

résistance à l'oseltamivir. La surveillance de la résistance aux antiviraux en temps réel est indispensable en cas de pandémie grippale et le grand nombre de prélèvements positifs obtenus en 2009-2010 dans notre laboratoire aurait pu servir à l'améliorer. De plus, une seule mutation (H275T) étant responsable de la résistance à l'oseltamivir, il est facile de la détecter par PCR/séquençage (Bautista *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2010). La variabilité inter-hôte au cours du temps aurait été une occasion unique pour étudier l'évolution d'un virus pandémique après son introduction dans la population humaine et pour répondre à plusieurs questions : le virus s'est-il adapté à l'homme comme le suggèrent les résultats présentés dans l'article 1 (adaptation rapide par l'acquisition de deux mutations dans la NA)? Plusieurs lignages ont-ils co-circulés durant la pandémie de 2009-2010 et y a-t-il eu des réassortiments génétiques entre les différents lignages? Y a-t-il eu un glissement antigénique important entre le début et la fin de l'épidémie? Les données génétiques obtenues auraient pu également être comparées aux données des bases de données.

V. CONCLUSION

Fin avril 2009, un nouveau virus grippal A/H1N1 d'origine porcine émerge au Mexique et aux Etats-Unis. Rapidement, il est détecté aux quatre coins du monde et le 11 juin 2009, l'OMS annonce officiellement que la première pandémie du XXI^{ème} siècle est en cours.

Les différents travaux présentés dans cette thèse retracent les moyens mis en œuvre pour faire face à l'émergence de ce nouveau virus au laboratoire de virologie des hôpitaux de Marseille. Durant la période d'avril 2009 à avril 2010, nous avons analysé au laboratoire plus de 13 000 prélèvements réalisés chez des patients suspectés d'être infectés. Sans cesse nous avons dû adapter les moyens humains et matériels mis en œuvre au laboratoire pour le diagnostic de la grippe et la mise en place d'une stratégie 'Point of Care' s'est avérée très utile. Afin de réaliser le diagnostic par biologie moléculaire nous avons également modifié notre test utilisé auparavant en routine. Ce test modifié, qui a prouvé son efficacité durant cette période, permet de détecter tous les virus grippaux A et de différencier dans le même temps les gripes A saisonnières du nouveau virus A/H1N1pdm. Nous préconisons également l'usage des tests rapides en plus de la PCR afin d'accélérer le temps de rendu des résultats pour les patients testés positifs (<2 h au lieu de <24h) et ainsi améliorer la prise en charge des patients. Cela est surtout vrai en période de forte prévalence de grippe et pour les services de pédiatrie puisque la sensibilité de ces tests décroît avec l'âge des personnes testées.

Les données (sexe, âge, service, etc.) sur cas suspects dépistés au laboratoire ont également permis d'obtenir en temps réel des informations précieuses sur l'épidémiologie de ce nouveau variant comme l'estimation des incidences par classes d'âge et les données sur l'hospitalisation et la mortalité chez ces patients testés.

Enfin, nous avons réalisé une étude de séroprévalence qui montre qu'environ 12% de la population française a été infectée par ce nouveau virus. Les plus forts taux d'attaque ont été observés chez les enfants et les jeunes adultes alors que les personnes âgées ont été relativement épargnées sûrement à cause du fait qu'elles étaient déjà protégées contre des virus proches qui circulaient auparavant.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- (2011a).** Réseau Sentinelles : Incidence des maladies vs volume de recherches dans Google. Available on <http://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?rub=316>.
- (2011b).** Severe illness from 2009 pandemic influenza A (H1N1)--Utah, 2009-10 influenza season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**, 1310-1314.
- Adiego Sancho, B., Omenaca Teres, M., Martinez Cuenca, S., Rodrigo Val, P., Sanchez Villanueva, P., Casas, I., Pozo, F. & Perez Brena, P. (2009).** Human case of swine influenza A (H1N1), Aragon, Spain, November 2008. *Euro Surveill* **14**.
- Ahluwalia, G., Embree, J., McNicol, P., Law, B. & Hammond, G. W. (1987).** Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **25**, 763-767.
- Air, G. M., Gibbs, A. J., Laver, W. G. & Webster, R. G. (1990).** Evolutionary changes in influenza B are not primarily governed by antibody selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3884-3888.
- anonymous (2009).** News. Timeline: Swine flu. A chronology of the H1N1 outbreak. Updated until January 2010. *Nature* doi:10.1038/news.2009.416
- Armstrong, G. L., Brammer, L. & Finelli, L. (2011).** Timely assessment of the severity of the 2009 H1N1 influenza pandemic. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 1**, S83-89.
- Bauer, T. T., Ewig, S., Rodloff, A. C. & Muller, E. E. (2006).** Acute respiratory distress syndrome and pneumonia: a comprehensive review of clinical data. *Clin Infect Dis* **43**, 748-756.
- Bautista, E., Chotpitayasunondh, T., Gao, Z., Harper, S. A., Shaw, M., Uyeki, T. M., Zaki, S. R., Hayden, F. G., Hui, D. S., Kettner, J. D., Kumar, A., Lim, M., Shindo, N., Penn, C. & Nicholson, K. G. (2010).** Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* **362**, 1708-1719.
- Belchior, E. (2011).** Surveillance épidémiologique et virologique de la grippe en France, saison 2010-2011. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire BEH* **37-38/11 Octobre 2011**.
- Bloom, J. D., Gong, L. I. & Baltimore, D. (2010).** Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* **328**, 1272-1275.
- Boivin, G., Hardy, I. & Kress, A. (2001).** Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* **39**, 730-732.
- Boivin, G., Hardy, I., Tellier, G. & Maziade, J. (2000).** Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis* **31**, 1166-1169.
- Bonmarin, I., Desenclos, J. C., Gastellu-Etchegorry, M., Saura, C. & Levy-Bruhl, D. (2010).** Grippe pandémique A(H1N1)2009: de l'estimé à l'observé! *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **Jun 2010**.

- Both, G. W., Sleight, M. J., Cox, N. J. & Kendal, A. P. (1983).** Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* **48**, 52-60.
- Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C. & Gardam, M. (2007).** Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* **7**, 257-265.
- Brown, I. H. (2000).** The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* **74**, 29-46.
- Buonagurio, D. A., Nakada, S., Fitch, W. M. & Palese, P. (1986).** Epidemiology of influenza C virus in man: multiple evolutionary lineages and low rate of change. *Virology* **153**, 12-21.
- Butler, D. (2009).** Swine flu goes global. *Nature* **458**, 1082-1083.
- Caliendo, A. M. (2011).** Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 4**, S326-330.
- Cannell, J. J., Vieth, R., Umhau, J. C., Holick, M. F., Grant, W. B., Madronich, S., Garland, C. F. & Giovannucci, E. (2006).** Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect* **134**, 1129-1140.
- Casalegno, J. S., Ottmann, M., Duchamp, M. B., Escuret, V., Billaud, G., Frobert, E., Morfin, F. & Lina, B. (2010).** Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin Microbiol Infect* **16**, 326-329.
- Cauchemez, S., Donnelly, C. A., Reed, C., Ghani, A. C., Fraser, C., Kent, C. K., Finelli, L. & Ferguson, N. M. (2009).** Household transmission of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in the United States. *N Engl J Med* **361**, 2619-2627.
- Cauchemez, S., Valleron, A. J., Boelle, P. Y., Flahault, A. & Ferguson, N. M. (2008).** Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data. *Nature* **452**, 750-754.
- Cazacu, A. C., Greer, J., Taherivand, M. & Demmler, G. J. (2003).** Comparison of lateral-flow immunoassay and enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of influenza virus in nasal wash specimens from children. *J Clin Microbiol* **41**, 2132-2134.
- CDC (2009a).** CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). Available on <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>.
- CDC (2009b).** Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 521-524.
- CDC (2009c).** Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 585-589.
- CDC (2009d).** Update: novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 453-458.
- CDC (2011).** Center for diseases Control and Prevention (CDC). Role of Laboratory Diagnosis of Influenza. Available on <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrole.htm>.

- Chan, K. H., Maldeis, N., Pope, W., Yup, A., Ozinskas, A., Gill, J., Seto, W. H., Shortridge, K. F. & Peiris, J. S. (2002). Evaluation of the Directigen FluA+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* **40**, 1675-1680.
- Chen, C. J., Lee, P. I., Chang, S. C., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Hsieh, Y. C., Chang, F. Y., Lee, J. J., Su, S. C., Shen, G. H., Chuang, Y. C., Chen, Y. S., Liu, J. W. & Lin, T. Y. (2011a). Seroprevalence and severity of 2009 pandemic influenza A H1N1 in Taiwan. *PLoS One* **6**, e24440.
- Chen, K. F., Rothman, R. E., Ramachandran, P., Blyn, L., Sampath, R., Ecker, D. J., Valsamakis, A. & Gaydos, C. A. (2011b). Rapid identification viruses from nasal pharyngeal aspirates in acute viral respiratory infections by RT-PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J Virol Methods* **173**, 60-66.
- Chen, R. & Holmes, E. C. (2008). The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol* **66**, 655-663.
- Chin, T. D., Foley, J. F., Doto, I. L., Gravelle, C. R. & Weston, J. (1960). Morbidity and mortality characteristics of Asian strain influenza. *Public Health Rep* **75**, 149-158.
- CIDRAP (2011). Avian Influenza (Bird Flu): Implications for Human Disease. *Center for Infectious Disease Research & Policy*, University of Minnesota. June 16, 2011. http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/biofacts/avflu_human.html. Consulté le 12 Septembre 2011.
- Claas, E. C., de Jong, J. C., van Beek, R., Rimmelzwaan, G. F. & Osterhaus, A. D. (1998a). Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* **16**, 977-978.
- Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F. & Webster, R. G. (1998b). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **351**, 472-477.
- Clerx, J. P., Fuller, F. & Bishop, D. H. (1983). Tick-borne viruses structurally similar to Orthomyxoviruses. *Virology* **127**, 205-219.
- Cohen, J. (2009). Pandemic influenza. Straight from the pig's mouth: swine research with swine influenzas. *Science* **325**, 140-141.
- Collins, S. D. & Lehmann, J. (1951). Trends and epidemics of influenza and pneumonia: 1918-1951. *Public Health Rep* **66**, 1487-1516.
- Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**, 41-44.
- Covalciuc, K. A., Webb, K. H. & Carlson, C. A. (1999). Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol* **37**, 3971-3974.
- Cox, N. J. & Subbarao, K. (1999). Influenza. *Lancet* **354**, 1277-1282.
- Cox, N. J. & Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* **51**, 407-421.

- Crawford, P. C., Dubovi, E. J., Castleman, W. L., Stephenson, I., Gibbs, E. P., Chen, L., Smith, C., Hill, R. C., Ferro, P., Pompey, J., Bright, R. A., Medina, M. J., Johnson, C. M., Olsen, C. W., Cox, N. J., Klimov, A. I., Katz, J. M. & Donis, R. O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* **310**, 482-485.
- Davies, A., Jones, D., Bailey, M., Beca, J., Bellomo, R., Blackwell, N., Forrest, P., Gattas, D., Granger, E., Herkes, R., Jackson, A., McGuinness, S., Nair, P., Pellegrino, V., Pettila, V., Plunkett, B., Pye, R., Torzillo, P., Webb, S., Wilson, M. & Ziegenfuss, M. (2009). Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA* **302**, 1888-1895.
- Dellagi, K., Rollet, O., Temmam, S., Salez, N., Guernier, V., Pascalis, H., Gerardin, P., Fianu, A., Lapidus, N., Naty, N., Tortosa, P., Boussaid, K., Jaffar-Banjee, M. C., Filleul, L., Flahault, A., Carrat, F., Favier, F. & de Lamballerie, X. (2011). Pandemic influenza due to pH1N1/2009 virus: estimation of infection burden in Reunion Island through a prospective serosurvey, austral winter 2009. *PLoS One* **6**, e25738.
- Desselberger, U., Nakajima, K., Alfino, P., Pedersen, F. S., Haseltine, W. A., Hannoun, C. & Palese, P. (1978). Biochemical evidence that "new" influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3341-3345.
- Donaldson, L. J., Rutter, P. D., Ellis, B. M., Greaves, F. E., Mytton, O. T., Pebody, R. G. & Yardley, I. E. (2009). Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ* **339**, b5213.
- Dowell, S. F. (2001). Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis* **7**, 369-374.
- Dutkowski, R. (2010). Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high-risk patients. *J Antimicrob Chemother* **65 Suppl 2**, ii11-ii24.
- ECDC (2010). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) The 2009 A(H1N1) pandemic in Europe, a review of the experience. Available on http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=575.
- Falagas, M. E., Koletsi, P. K., Baskouta, E., Rafailidis, P. I., Dimopoulos, G. & Karageorgopoulos, D. E. (2011). Pandemic A(H1N1) 2009 influenza: review of the Southern Hemisphere experience. *Epidemiol Infect* **139**, 27-40.
- Fanning, T. G. & Taubenberger, J. K. (1999). Phylogenetically important regions of the influenza A H1 hemagglutinin protein. *Virus Res* **65**, 33-42.
- FAO-ECTAD (2011). FAO AIDEnews Animal Influenza Disease Emergency. Food and Agriculture Organization (FAO) Emergency Center for Transboundary Animal Diseases (ECTAD). Situation Update 82 17 November 2011. Available on <http://www.fao.org/docrep/014/al910e/al910e00.pdf>.
- Ferguson, N. M., Galvani, A. P. & Bush, R. M. (2003). Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* **422**, 428-433.

- Fox, J. P., Hall, C. E., Cooney, M. K. & Foy, H. M. (1982).** Influenzavirus infections in Seattle families, 1975-1979. I. Study design, methods and the occurrence of infections by time and age. *Am J Epidemiol* **116**, 212-227.
- Frank, A. L., Taber, L. H., Wells, C. R., Wells, J. M., Glezen, W. P. & Paredes, A. (1981).** Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. *J Infect Dis* **144**, 433-441.
- Frank, A. L., Taber, L. H. & Wells, J. M. (1985).** Comparison of infection rates and severity of illness for influenza A subtypes H1N1 and H3N2. *J Infect Dis* **151**, 73-80.
- Fraser, C., Donnelly, C. A., Cauchemez, S., Hanage, W. P., Van Kerkhove, M. D., Hollingsworth, T. D., Griffin, J., Baggaley, R. F., Jenkins, H. E., Lyons, E. J., Jombart, T., Hinsley, W. R., Grassly, N. C., Balloux, F., Ghani, A. C., Ferguson, N. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C. M., Chapela, I. B., Zavala, E. P., Guevara, D. M., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S. & Roth, C. (2009).** Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* **324**, 1557-1561.
- Frost, W. H. (2006).** The epidemiology of influenza. 1919. *Public Health Rep* **121 Suppl 1**, 149-159; discussion 148.
- Gao, F., Loring, C., Laviolette, M., Bolton, D., Daly, E. R. & Bean, C. (2011).** Detection of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus infection in different age groups by using rapid influenza diagnostic tests. *Influenza Other Respi Viruses*.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C. A., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. A., Clark, P. A., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I. & Cox, N. J. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**, 197-201.
- Gauzere, B. A., Bussienne, F., Bouchet, B., Jabot, J., Roussiaux, A., Drouet, D., Djourhi, S., Leaute, B., Belcour, D., Bossard, G., Champion, S., Jaffar-Bandjee, M. C., Belmonte, O., Vilain, P., Brottet, E., Hoang, L. & Vandroux, D. (2011).** [Severe cases of A(H1N1)v2009 infection in Reunion Island in 2009 and 2010]. *Bull Soc Pathol Exot* **104**, 97-104.
- Geraci, J. R., St Aubin, D. J., Barker, I. K., Webster, R. G., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Ruhnke, H. L., Prescott, J. H., Early, G., Baker, A. S., Madoff, S. & Schooley, R. T. (1982).** Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science* **215**, 1129-1131.
- Gharabaghi, F., Tellier, R., Cheung, R., Collins, C., Broukhanski, G., Drews, S. J. & Richardson, S. E. (2008).** Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. *J Clin Virol* **42**, 190-193.

- Gilbert, G. L., Cretikos, M. A., Hueston, L., Doukas, G., O'Toole, B. & Dwyer, D. E. (2010).** Influenza A (H1N1) 2009 antibodies in residents of New South Wales, Australia, after the first pandemic wave in the 2009 southern hemisphere winter. *PLoS One* **5**, e12562.
- Ginsberg, J., Mohebbi, M. H., Patel, R. S., Brammer, L., Smolinski, M. S. & Brilliant, L. (2009).** Detecting influenza epidemics using search engine query data. *Nature* **457**, 1012-1014.
- Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M. & Kieny, M. P. (2010).** The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* **28**, 4895-4902.
- Glezen, W. P. (1980).** Considerations of the risk of influenza in children and indications for prophylaxis. *Rev Infect Dis* **2**, 408-420.
- Glezen, W. P. (1996).** Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev* **18**, 64-76.
- Glezen, W. P. & Couch, R. B. (1978).** Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N Engl J Med* **298**, 587-592.
- Glezen, W. P., Decker, M. & Perrotta, D. M. (1987).** Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981. *Am Rev Respir Dis* **136**, 550-555.
- Glezen, W. P., Keitel, W. A., Taber, L. H., Piedra, P. A., Clover, R. D. & Couch, R. B. (1991).** Age distribution of patients with medically-attended illnesses caused by sequential variants of influenza A/H1N1: comparison to age-specific infection rates, 1978-1989. *Am J Epidemiol* **133**, 296-304.
- Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L., Gruber, W. C. & Piedra, P. A. (1997).** Influenza virus infections in infants. *Pediatr Infect Dis J* **16**, 1065-1068.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1990a).** Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* **64**, 1487-1497.
- Gorman, O. T., Donis, R. O., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1990b).** Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. *J Virol* **64**, 4893-4902.
- Greenbaum, J. A., Kotturi, M. F., Kim, Y., Oseroff, C., Vaughan, K., Salimi, N., Vita, R., Ponomarenko, J., Scheuermann, R. H., Sette, A. & Peters, B. (2009).** Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20365-20370.
- Gregory, V., Bennett, M., Thomas, Y., Kaiser, L., Wunderli, W., Matter, H., Hay, A. & Lin, Y. P. (2003).** Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virol* **148**, 793-802.
- Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Li, P. H., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1996).** Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J Virol* **70**, 8041-8046.
- Habib-Bein, N. F., Beckwith, W. H., 3rd, Mayo, D. & Landry, M. L. (2003).** Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct

- immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* **41**, 3597-3601.
- Hall, C. B. & Douglas, R. G., Jr. (1975).** Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **131**, 1-5.
- Hall, C. B., Douglas, R. G., Jr., Geiman, J. M. & Meagher, M. P. (1979).** Viral shedding patterns of children with influenza B infection. *J Infect Dis* **140**, 610-613.
- Heikkinen, T., Marttila, J., Salmi, A. A. & Ruuskanen, O. (2002).** Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **40**, 4337-4339.
- Heikkinen, T., Salmi, A. A. & Ruuskanen, O. (2001).** Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ* **322**, 138.
- Helferty, M., Vachon, J., Tarasuk, J., Rodin, R., Spika, J. & Pelletier, L. (2010).** Incidence of hospital admissions and severe outcomes during the first and second waves of pandemic (H1N1) 2009. *CMAJ* **182**, 1981-1987.
- Herrmann, B., Larsson, C. & Zwegberg, B. W. (2001).** Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* **39**, 134-138.
- Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Geraci, J., Fiorelli, P., Early, G. & Webster, R. G. (1986).** Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* **58**, 655-656.
- Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Jr., Webster, R. G. & Easterday, B. C. (1978).** The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology* **84**, 51-62.
- Holland, J. & Domingo, E. (1998).** Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**, 13-21.
- Hsieh, Y. C., Wu, T. Z., Liu, D. P., Shao, P. L., Chang, L. Y., Lu, C. Y., Lee, C. Y., Huang, F. Y. & Huang, L. M. (2006).** Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc* **105**, 1-6.
- Hurt, A. C., Alexander, R., Hibbert, J., Deed, N. & Barr, I. G. (2007).** Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol* **39**, 132-135.
- InVS & CNR-grippe (2009).** New influenza A(H1N1) virus infections in France, April - May 2009. *Euro Surveill* **14**.
- Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K. & Kawaoka, Y. (2009).** In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* **460**, 1021-1025.

- Izurieta, H. S., Thompson, W. W., Kramarz, P., Shay, D. K., Davis, R. L., DeStefano, F., Black, S., Shinefield, H. & Fukuda, K. (2000). Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* **342**, 232-239.
- Jackson, D. C., Tang, X. L., Murti, K. G., Webster, R. G., Tregear, G. W. & Bean, W. J. (1991). Electron microscopic evidence for the association of M2 protein with the influenza virion. *Arch Virol* **118**, 199-207.
- Johnson, F. B. (1990). Transport of viral specimens. *Clin Microbiol Rev* **3**, 120-131.
- Kawaoka, Y., Cox, N. J., Haller, O., Hongo, S., Kaverin, N., Klenk, H.-D., Lamb, R. A., MacCauley, J., Palese, P., Rimstad, E. & Webster, R. G. (1996). *Orthomyxoviridae*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Elsevier Academic Press*, 681-693.
- Khan, K., Arino, J., Hu, W., Raposo, P., Sears, J., Calderon, F., Heidebrecht, C., Macdonald, M., Liauw, J., Chan, A. & Gardam, M. (2009). Spread of a novel influenza A (H1N1) virus via global airline transportation. *N Engl J Med* **361**, 212-214.
- Kilbourne, E. D. (2006). Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* **12**, 9-14.
- Kirkland, P. D., Finlaison, D. S., Crispe, E. & Hurt, A. C. (2010). Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis* **16**, 699-702.
- Krossoy, B., Hordvik, I., Nilsen, F., Nylund, A. & Endresen, C. (1999). The putative polymerase sequence of infectious salmon anemia virus suggests a new genus within the Orthomyxoviridae. *J Virol* **73**, 2136-2142.
- Kronic, N., Yager, T. D., Himsworth, D., Merante, F., Yaghoubian, S. & Janeczko, R. (2007). xTAG RVP assay: analytical and clinical performance. *J Clin Virol* **40 Suppl 1**, S39-46.
- Labrosse, B., Tournjman, M., Porcher, R., LeGoff, J., de Lamballerie, X., Simon, F., Molina, J. M. & Clavel, F. (2010). Detection of extensive cross-neutralization between pandemic and seasonal A/H1N1 Influenza Viruses using a pseudotype neutralization assay. *PLoS One* **5**, e11036.
- Lamb, R. A. & Krug, R. M. (1996). *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their replication*. Third ed. *Fields Virology*, ed. Knipe DM, Howley PM. *Lippincott Williams and Wilkins*, 1353-1395.
- Lambert, S. B., Whiley, D. M., O'Neill, N. T., Andrews, E. C., Canavan, F. M., Bletchly, C., Siebert, D. J., Sloots, T. P. & Nissen, M. D. (2008). Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* **122**, e615-620.
- Landry, M. L., Cohen, S. & Ferguson, D. (2008). Real-time PCR compared to Binax NOW and cytospin-immunofluorescence for detection of influenza in hospitalized patients. *J Clin Virol* **43**, 148-151.
- Landry, M. L. & Ferguson, D. (2003). Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of

- antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J Clin Microbiol* **41**, 3407-3409.
- Laver, W. G. & Valentine, R. C. (1969).** Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* **38**, 105-119.
- Leekha, S., Zitterkopf, N. L., Espy, M. J., Smith, T. F., Thompson, R. L. & Sampathkumar, P. (2007).** Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**, 1071-1076.
- Lemieux, C., Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z. & Gardam, M. (2007).** Questioning aerosol transmission of influenza. *Emerg Infect Dis* **13**, 173-174; author reply 174-175.
- Lessler, J., Reich, N. G., Cummings, D. A., Nair, H. P., Jordan, H. T. & Thompson, N. (2009).** Outbreak of 2009 pandemic influenza A (H1N1) at a New York City school. *N Engl J Med* **361**, 2628-2636.
- Lewis, N. S., Daly, J. M., Russell, C. A., Horton, D. L., Skepner, E., Bryant, N. A., Burke, D. F., Rash, A. S., Wood, J. L., Chambers, T. M., Fouchier, R. A., Mumford, J. A., Elton, D. M. & Smith, D. J. (2011).** The antigenic and genetic evolution of equine influenza A(H3N8) virus from 1968-2007. *J Virol*.
- Li, T., Liu, Y., Di, B., Wang, M., Shen, J., Zhang, Y., Chen, X., Yuan, J., Wu, J., Li, K., Lu, E., Wu, Y., Hao, A., Wang, Y., Liu, J., Pickerill, S. & Zheng, B. (2011).** Epidemiological investigation of an outbreak of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in a boarding school: serological analysis of 1570 cases. *J Clin Virol* **50**, 235-239.
- Liao, R. S., Tomalty, L. L., Majury, A. & Zoutman, D. E. (2009).** Comparison of viral isolation and multiplex real-time reverse transcription-PCR for confirmation of respiratory syncytial virus and influenza virus detection by antigen immunoassays. *J Clin Microbiol* **47**, 527-532.
- Linde, A., Rotzen-Ostlund, M., Zweygberg-Wirgart, B., Rubinova, S. & Brytting, M. (2009).** Does viral interference affect spread of influenza? *Euro Surveill* **14**.
- Lipsitch, M. & Viboud, C. (2009).** Influenza seasonality: lifting the fog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3645-3646.
- Longini, I. M., Jr., Koopman, J. S., Monto, A. S. & Fox, J. P. (1982).** Estimating household and community transmission parameters for influenza. *Am J Epidemiol* **115**, 736-751.
- Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. (2007).** Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* **3**, 1470-1476.
- Lvov, D. K., Zdanov, V. M., Sazonov, A. A., Braude, N. A., Vladimirtceva, E. A., Agafonova, L. V., Skljanskaja, E. I., Kaverin, N. V., Reznik, V. I., Pysina, T. V., Oserovic, A. M., Berzin, A. A., Mjasnikova, I. A., Podcernjaeva, R. Y., Klimenko, S. M., Andrejev, V. P. & Yakhno, M. A. (1978).** Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull World Health Organ* **56**, 923-930.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. (2002).** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* **30**, 1292-1305.

- Maltezos, H. C., Katerelos, P., Mavrouli, M., Lourida, A., Routsias, J. G., Spanakis, N., Maragos, A., Tedoma, A., Bassiakos, Y., Koratzanis, G., Mantagos, S., Metallidis, S., Katragkou, A., Nikolaidis, P., Roilides, E., Theodoridou, M. & Tsakris, A. (2011).** Seroepidemiological study of pandemic influenza H1N1 following the 2009-2010 wave in Greece. *Vaccine* **29**, 6664-6669.
- Masters, H. B., Weber, K. O., Groothuis, J. R., Wren, C. G. & Lauer, B. A. (1987).** Comparison of nasopharyngeal washings and swab specimens for diagnosis of respiratory syncytial virus by EIA, FAT, and cell culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* **8**, 101-105.
- McCook, A. (2011).** Death of a pathology centre: Shelved. *Nature* **476**, 270-272.
- McHardy, A. C. & Adams, B. (2009).** The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog* **5**, e1000566.
- McIntosh, K., Hendry, R. M., Fahnstock, M. L. & Pierik, L. T. (1982).** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: application to clinical samples. *J Clin Microbiol* **16**, 329-333.
- McQuillin, J., Madeley, C. R. & Kendal, A. P. (1985).** Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A and B virus infections by immunofluorescence. *Lancet* **2**, 911-914.
- McVernon, J., Laurie, K., Nolan, T., Owen, R., Irving, D., Capper, H., Hyland, C., Faddy, H., Carolan, L., Barr, I. & Kelso, A. (2010).** Seroprevalence of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in Australian blood donors, October - December 2009. *Euro Surveill* **15**.
- Miller, E., Hoschler, K., Hardelid, P., Stanford, E., Andrews, N. & Zambon, M. (2010).** Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet* **375**, 1100-1108.
- Miller, M. A., Viboud, C., Balinska, M. & Simonsen, L. (2009).** The signature features of influenza pandemics--implications for policy. *N Engl J Med* **360**, 2595-2598.
- Monto, A. S., Davenport, F. M., Napier, J. A. & Francis, T., Jr. (1970).** Modification of an outbreak of influenza in Tecumseh, Michigan by vaccination of schoolchildren. *J Infect Dis* **122**, 16-25.
- Monto, A. S., Gravenstein, S., Elliott, M., Colopy, M. & Schweinle, J. (2000).** Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med* **160**, 3243-3247.
- Monto, A. S., Koopman, J. S. & Longini, I. M., Jr. (1985).** Tecumseh study of illness. XIII. Influenza infection and disease, 1976-1981. *Am J Epidemiol* **121**, 811-822.
- Monto, A. S. & Sullivan, K. M. (1993).** Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* **110**, 145-160.
- Monto, A. S. & Ullman, B. M. (1974).** Acute respiratory illness in an American community. The Tecumseh study. *JAMA* **227**, 164-169.
- Mumford, J., Wood, J. M., Scott, A. M., Folkers, C. & Schild, G. C. (1983).** Studies with inactivated equine influenza vaccine. 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8). *J Hyg (Lond)* **90**, 385-395.

- Murcia, P. R., Wood, J. L. & Holmes, E. C. (2011).** Genome-scale evolution and phylodynamics of equine H3N8 influenza A virus. *J Virol* **85**, 5312-5322.
- Murphy, B. R. & Webster, R. G. (1996).** Orthomyxoviruses. Third ed. *Fields Virology*, ed. Knipe DM, Howley PM. *Lippincott Williams and Wilkins*, 1397-1445.
- Nelson, M. I. & Holmes, E. C. (2007).** The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* **8**, 196-205.
- Nelson, M. I., Simonsen, L., Viboud, C., Miller, M. A. & Holmes, E. C. (2007).** Phylogenetic analysis reveals the global migration of seasonal influenza A viruses. *PLoS Pathog* **3**, 1220-1228.
- Neuzil, K. M., Mellen, B. G., Wright, P. F., Mitchel, E. F., Jr. & Griffin, M. R. (2000a).** The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med* **342**, 225-231.
- Neuzil, K. M., Wright, P. F., Mitchel, E. F., Jr. & Griffin, M. R. (2000b).** The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. *J Pediatr* **137**, 856-864.
- Neuzil, K. M., Zhu, Y., Griffin, M. R., Edwards, K. M., Thompson, J. M., Tollefson, S. J. & Wright, P. F. (2002).** Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis* **185**, 147-152.
- Newman, A. P., Reisdorf, E., Beinemann, J., Uyeki, T. M., Balish, A., Shu, B., Lindstrom, S., Achenbach, J., Smith, C. & Davis, J. P. (2008).** Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* **14**, 1470-1472.
- Newton, D. W., Mellen, C. F., Baxter, B. D., Atmar, R. L. & Menegus, M. A. (2002).** Practical and sensitive screening strategy for detection of influenza virus. *J Clin Microbiol* **40**, 4353-4356.
- Nguyen-Van-Tam, J. S. & Hampson, A. W. (2003).** The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* **21**, 1762-1768.
- Nicholson, K. G. (1992).** Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect* **7**, 26-37.
- Nicholson, K. G. (1996).** Impact of influenza and respiratory syncytial virus on mortality in England and Wales from January 1975 to December 1990. *Epidemiol Infect* **116**, 51-63.
- Nicholson, K. G., Wood, J. M. & Zambon, M. (2003).** Influenza. *Lancet* **362**, 1733-1745.
- Noah, M. A., Peek, G. J., Finney, S. J., Griffiths, M. J., Harrison, D. A., Grieve, R., Sadique, M. Z., Sekhon, J. S., McAuley, D. F., Firmin, R. K., Harvey, C., Cordingley, J. J., Price, S., Vuylsteke, A., Jenkins, D. P., Noble, D. W., Bloomfield, R., Walsh, T. S., Perkins, G. D., Menon, D., Taylor, B. L. & Rowan, K. M. (2011).** Referral to an extracorporeal membrane oxygenation center and mortality among patients with severe 2009 influenza A(H1N1). *JAMA* **306**, 1659-1668.
- Noyola, D. E., Clark, B., O'Donnell, F. T., Atmar, R. L., Greer, J. & Demmler, G. J. (2000).** Comparison of a new neuraminidase detection assay with an enzyme immunoassay, immunofluorescence, and culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin Microbiol* **38**, 1161-1165.

- Olsen, C. W. (2002).** The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* **85**, 199-210.
- Olson, D. R., Heffernan, R. T., Paladini, M., Konty, K., Weiss, D. & Mostashari, F. (2007).** Monitoring the impact of influenza by age: emergency department fever and respiratory complaint surveillance in New York City. *PLoS Med* **4**, e247.
- Orenstein, W. A., Bernier, R. H. & Hinman, A. R. (1988).** Assessing vaccine efficacy in the field. Further observations. *Epidemiol Rev* **10**, 212-241.
- Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M. & Fouchier, R. A. (2000).** Influenza B virus in seals. *Science* **288**, 1051-1053.
- Pang, X., Yang, P., Li, S., Zhang, L., Tian, L., Li, Y., Liu, B., Zhang, Y., Huang, R., Li, X. & Wang, Q. (2011).** Pandemic (H1N1) 2009 among quarantined close contacts, Beijing, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* **17**, 1824-1830.
- Peiris, J. S., Poon, L. L. & Guan, Y. (2009).** Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* **45**, 169-173.
- Pelat, C., Turbelin, C., Bar-Hen, A., Flahault, A. & Valleron, A. (2009).** More diseases tracked by using Google Trends. *Emerg Infect Dis* **15**, 1327-1328.
- Peltola, V., Ziegler, T. & Ruuskanen, O. (2003).** Influenza A and B virus infections in children. *Clin Infect Dis* **36**, 299-305.
- Pensaert, M., Ottis, K., Vandeputte, J., Kaplan, M. M. & Bachmann, P. A. (1981).** Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ* **59**, 75-78.
- Perrotta, D. M., Decker, M. & Glezen, W. P. (1985).** Acute respiratory disease hospitalizations as a measure of impact of epidemic influenza. *Am J Epidemiol* **122**, 468-476.
- Poeppl, W., Hell, M., Herkner, H., Stoiser, B., Fritsche, G., Schurz-Bamieh, N., Poeppl, G., Gattringer, R., Jones, N., Maass, M., Egle, A. & Burgmann, H. (2011).** Clinical aspects of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in Austria. *Infection* **39**, 341-352.
- Popowitch, E. B., Rogers, E. & Miller, M. B. (2011).** Retrospective and prospective verification of the Cepheid Xpert influenza virus assay. *J Clin Microbiol* **49**, 3368-3369.
- Presanis, A. M., De Angelis, D., Hagy, A., Reed, C., Riley, S., Cooper, B. S., Finelli, L., Biedrzycki, P. & Lipsitch, M. (2009).** The severity of pandemic H1N1 influenza in the United States, from April to July 2009: a Bayesian analysis. *PLoS Med* **6**, e1000207.
- Rahman, M., Vandermause, M. F., Kieke, B. A. & Belongia, E. A. (2008).** Performance of Binax NOW Flu A and B and direct fluorescent assay in comparison with a composite of viral culture or reverse transcription polymerase chain reaction for detection of influenza infection during the 2006 to 2007 season. *Diagn Microbiol Infect Dis* **62**, 162-166.
- Rambaut, A., Pybus, O. G., Nelson, M. I., Viboud, C., Taubenberger, J. K. & Holmes, E. C. (2008).** The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* **453**, 615-619.

- Rand, K. H., Rammersaud, H. & Houck, H. J. (2011).** Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. *J Clin Microbiol* **49**, 2449-2453.
- Reid, A. H. & Taubenberger, J. K. (2003).** The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol* **84**, 2285-2292.
- Renois, F., Talmud, D., Huguenin, A., Moutte, L., Strady, C., Cousson, J., Leveque, N. & Andreoletti, L. (2010).** Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol* **48**, 3836-3842.
- Rota, P. A., Wallis, T. R., Harmon, M. W., Rota, J. S., Kendal, A. P. & Nerome, K. (1990).** Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* **175**, 59-68.
- Rudenko, L. G., Slepishkin, A. N., Monto, A. S., Kendal, A. P., Grigorieva, E. P., Burtseva, E. P., Rekstin, A. R., Beljaev, A. L., Bragina, V. E., Cox, N. & et al. (1993).** Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia. *J Infect Dis* **168**, 881-887.
- Sato, M., Hosoya, M., Kato, K. & Suzuki, H. (2005).** Viral shedding in children with influenza virus infections treated with neuraminidase inhibitors. *Pediatr Infect Dis J* **24**, 931-932.
- Schrag, S. J., Shay, D. K., Gershman, K., Thomas, A., Craig, A. S., Schaffner, W., Harrison, L. H., Vugia, D., Clogher, P., Lynfield, R., Farley, M., Zansky, S. & Uyeki, T. (2006).** Multistate surveillance for laboratory-confirmed, influenza-associated hospitalizations in children: 2003-2004. *Pediatr Infect Dis J* **25**, 395-400.
- Shaman, J. & Kohn, M. (2009).** Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3243-3248.
- Shek, L. P. & Lee, B. W. (2003).** Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev* **4**, 105-111.
- Shetty, A. K., Treynor, E., Hill, D. W., Gutierrez, K. M., Warford, A. & Baron, E. J. (2003).** Comparison of conventional viral cultures with direct fluorescent antibody stains for diagnosis of community-acquired respiratory virus infections in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 789-794.
- Shope, R. E. (1931).** The Etiology of Swine Influenza. *Science* **73**, 214-215.
- Shope, R. E. (1938).** Serological Evidence for the Occurrence of Infection with Human Influenza Virus in Swine. *J Exp Med* **67**, 739-748.
- Shortridge, K. F., Webster, R. G., Butterfield, W. K. & Campbell, C. H. (1977).** Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. *Science* **196**, 1454-1455.
- Shortridge, K. F., Zhou, N. N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K. G., Norwood, M., Senne, D., Sims, L., Takada, A. & Webster, R. G. (1998).** Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* **252**, 331-342.

- Shrestha, S. S., Swerdlow, D. L., Borse, R. H., Prabhu, V. S., Finelli, L., Atkins, C. Y., Owusu-Edusei, K., Bell, B., Mead, P. S., Biggerstaff, M., Brammer, L., Davidson, H., Jernigan, D., Jhung, M. A., Kamimoto, L. A., Merlin, T. L., Nowell, M., Redd, S. C., Reed, C., Schuchat, A. & Meltzer, M. I. (2011).** Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Dis* **52 Suppl 1**, S75-82.
- Simonsen, L. (1999).** The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine* **17 Suppl 1**, S3-10.
- Simonsen, L., Clarke, M. J., Williamson, G. D., Stroup, D. F., Arden, N. H. & Schonberger, L. B. (1997).** The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. *Am J Public Health* **87**, 1944-1950.
- Simonsen, L., Fukuda, K., Schonberger, L. B. & Cox, N. J. (2000).** The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J Infect Dis* **181**, 831-837.
- Skarbinski, J., Jain, S., Bramley, A., Lee, E. J., Huang, J., Kirschke, D., Stone, A., Wedlake, T., Richards, S. M., Page, S., Ragan, P., Bullion, L., Neises, D., Williams, R. M., Petrucci, B. P., Vandermeer, M., Lofy, K. H., Gindler, J. & Finelli, L. (2011).** Hospitalized patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in the United States--September-October 2009. *Clin Infect Dis* **52 Suppl 1**, S50-59.
- Smith, D. J., Lapedes, A. S., de Jong, J. C., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2004).** Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* **305**, 371-376.
- Smith, G. J., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L., Chen, H., Webster, R. G., Peiris, J. S. & Guan, Y. (2009a).** Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11709-11712.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., Cheung, C. L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J. S., Guan, Y. & Rambaut, A. (2009b).** Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**, 1122-1125.
- Spada, B., Biehler, K., Chagas, P., Kaye, J. & Riepenhoff-Talty, M. (1991).** Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children. *J Virol Methods* **33**, 305-310.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. & Cox, N. (1998).** Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393-396.
- Sung, R. Y., Chan, P. K., Choi, K. C., Yeung, A. C., Li, A. M., Tang, J. W., Ip, M., Tsen, T. & Nelson, E. A. (2008).** Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol* **46**, 3073-3076.
- Suzuki, Y. & Nei, M. (2002).** Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* **19**, 501-509.

- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. (1997).** Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**, 1793-1796.
- Tellier, R. (2006).** Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis* **12**, 1657-1662.
- Thompson, W. W., Shay, D. K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L. J. & Fukuda, K. (2003).** Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* **289**, 179-186.
- Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C. & Furuyama, M. (1975).** Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* **162**, 9-14.
- Treanor, J. J. (2005).** Influenza Virus. Sixth ed. *Principles and Practice of infectious Diseases*, ed. Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1823-1849.
- Treuhaft, M. W., Soukup, J. M. & Sullivan, B. J. (1985).** Practical recommendations for the detection of pediatric respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol* **22**, 270-273.
- Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J. K., Palese, P., Swayne, D. E. & Basler, C. F. (2004).** Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3166-3171.
- Uyeki, T. M. (2003).** Influenza diagnosis and treatment in children: a review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 164-177.
- Van der Werf, S., Rousset, D. & Enouf, V. (2009).** Real-time PCR of Type A A(H1N1)2009 viruses. *Centre National de Référence du Virus Influenzae région nord (Institut Pasteur) Available on: http://www.santegouv.fr/IMG/pdf/Protocoles_CNR_03122009pdf.*
- van Elden, L. J., Nijhuis, M., Schipper, P., Schuurman, R. & van Loon, A. M. (2001).** Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* **39**, 196-200.
- Van Kerkhove, M. D., Vandemaele, K. A., Shinde, V., Jaramillo-Gutierrez, G., Koukounari, A., Donnelly, C. A., Carlino, L. O., Owen, R., Paterson, B., Pelletier, L., Vachon, J., Gonzalez, C., Hongjie, Y., Zijian, F., Chuang, S. K., Au, A., Buda, S., Krause, G., Haas, W., Bonmarin, I., Taniguichi, K., Nakajima, K., Shobayashi, T., Takayama, Y., Sunagawa, T., Heraud, J. M., Orelle, A., Palacios, E., van der Sande, M. A., Wielders, C. C., Hunt, D., Cutter, J., Lee, V. J., Thomas, J., Santa-Olalla, P., Sierra-Moros, M. J., Hanshaoworakul, W., Ungchusak, K., Pebody, R., Jain, S. & Mounts, A. W. (2011).** Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. *PLoS Med* **8**, e1001053.
- Viboud, C., Alonso, W. J. & Simonsen, L. (2006).** Influenza in tropical regions. *PLoS Med* **3**, e89.
- Viboud, C., Boelle, P. Y., Cauchemez, S., Lavenue, A., Valleron, A. J., Flahault, A. & Carrat, F. (2004).** Risk factors of influenza transmission in households. *Br J Gen Pract* **54**, 684-689.

- Waris, M., Ziegler, T., Kivivirta, M. & Ruuskanen, O. (1990).** Rapid detection of respiratory syncytial virus and influenza A virus in cell cultures by immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **28**, 1159-1162.
- Webby, R. J., Swenson, S. L., Krauss, S. L., Gerrish, P. J., Goyal, S. M. & Webster, R. G. (2000).** Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* **74**, 8243-8251.
- Webster, R. G. (1993).** Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet J* **25**, 537-538.
- Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J. & Murti, K. G. (1978).** Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* **84**, 268-278.
- Weinberg, G. A., Erdman, D. D., Edwards, K. M., Hall, C. B., Walker, F. J., Griffin, M. R. & Schwartz, B. (2004).** Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* **189**, 706-710.
- Wentworth, D. E., Thompson, B. L., Xu, X., Regnery, H. L., Cooley, A. J., McGregor, M. W., Cox, N. J. & Hinshaw, V. S. (1994).** An influenza A (H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for a fatal case of human influenza. *J Virol* **68**, 2051-2058.
- Wertheim, J. O. (2010).** The re-emergence of H1N1 influenza virus in 1977: a cautionary tale for estimating divergence times using biologically unrealistic sampling dates. *PLoS One* **5**, e11184.
- White, L. F., Wallinga, J., Finelli, L., Reed, C., Riley, S., Lipsitch, M. & Pagano, M. (2009).** Estimation of the reproductive number and the serial interval in early phase of the 2009 influenza A/H1N1 pandemic in the USA. *Influenza Other Respi Viruses* **3**, 267-276.
- WHO (1981).** The ecology of influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* **59**, 869-873.
- WHO (2011a).** World Health Organization (WHO). Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available on http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf.
- WHO (2011b).** World Health Organization (WHO). H5N1 Avian Influenza: Timeline of major events. 7 November 2011. Available on http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en/index.html.
- Wiley, D. C., Wilson, I. A. & Skehel, J. J. (1981).** Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* **289**, 373-378.
- Wimmer, E., Mueller, S., Tumpey, T. M. & Taubenberger, J. K. (2009).** Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat Biotechnol* **27**, 1163-1172.
- Wolf, Y. I., Viboud, C., Holmes, E. C., Koonin, E. V. & Lipman, D. J. (2006).** Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol Direct* **1**, 34.

- Wood, J. M., Mumford, J., Folkers, C., Scott, A. M. & Schild, G. C. (1983).** Studies with inactivated equine influenza vaccine. 1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine. *J Hyg (Lond)* **90**, 371-384.
- Wright, P. (2000).** Influenza in the family. *N Engl J Med* **343**, 1331-1332.
- Wright, P. F., Thompson, J. & Karzon, D. T. (1980).** Differing virulence of H1N1 and H3N2 influenza strains. *Am J Epidemiol* **112**, 814-819.
- Wu, J. T., Ma, E. S., Lee, C. K., Chu, D. K., Ho, P. L., Shen, A. L., Ho, A., Hung, I. F., Riley, S., Ho, L. M., Lin, C. K., Tsang, T., Lo, S. V., Lau, Y. L., Leung, G. M., Cowling, B. J. & Peiris, J. S. (2011).** A serial cross-sectional serologic survey of 2009 Pandemic (H1N1) in Hong Kong: implications for future pandemic influenza surveillance. *Influenza Other Respi Viruses* **5 Suppl 1**, 190-194.
- Xu, R., Ekiert, D. C., Krause, J. C., Hai, R., Crowe, J. E., Jr. & Wilson, I. A. (2010).** Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* **328**, 357-360.
- Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W. M. & Palese, P. (1988).** Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**, 112-122.
- Yang, Y., Sugimoto, J. D., Halloran, M. E., Basta, N. E., Chao, D. L., Matrajt, L., Potter, G., Kenah, E. & Longini, I. M., Jr. (2009).** The transmissibility and control of pandemic influenza A (H1N1) virus. *Science* **326**, 729-733.
- Young, J. F. & Palese, P. (1979).** Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6547-6551.
- Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999).** Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* **73**, 8851-8856.
- Zimmer, S. M., Crevar, C. J., Carter, D. M., Stark, J. H., Giles, B. M., Zimmerman, R. K., Ostroff, S. M., Lee, B. Y., Burke, D. S. & Ross, T. M. (2010).** Seroprevalence following the second wave of Pandemic 2009 H1N1 influenza in Pittsburgh, PA, USA. *PLoS One* **5**, e11601.

VII. ANNEXES

A. Article 4: A simple method for molecular detection of Swine-origin and human-origin influenza A virus.

Ninove L, Gazin C, Gould EA, Nougairède A, Flahault A, Charrel RN, Zandotti C, De Lamballerie X. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010 Apr;10(3):237-40.

1. Avant propos

Jusqu'à ce que le nouveau virus A/H1N1pdm émerge en avril 2009 dans le monde, le diagnostic de la grippe au laboratoire de virologie des hôpitaux de Marseille (Fédération de Microbiologie Clinique, Assistance Hôpitaux de Marseille, service du Pr. Didier Raoult) était réalisé par IF directe pour une large majorité des prélèvements. Les tests rapides étaient également utilisés notamment pour les services d'urgence mais toujours contrôlés par IF directe. La PCR en temps réel (PCR temps réel avec sonde d'hydrolyse de type TaqMan®) n'était utilisée que dans certaines situations comme celle des patients présentant des formes sévères (hospitalisation en réanimation, myocardite etc.) et pour certains prélèvements réalisés au niveau des voies respiratoires inférieures (les biopsies pulmonaires et les lavages broncho-alvéolaires lorsque les tests d'IF directe n'était pas réalisable). Nous utilisons un test décrit en 2001 par Van Elden et son équipe (van Elden *et al.*, 2001). Cette méthode, décrite en multiplex à l'origine, nous permettait de détecter grâce à deux systèmes soit les gripes A saisonnières (A/H1N1 et A/H3N2) soit les gripes B. Ces systèmes de détection de l'ARN des virus grippaux A et B ciblent des régions conservées au niveau des segments d'ARN codant pour les gènes de matrice et l'HA respectivement.

Dès l'émergence du nouveau variant A/H1N1pdm fin avril 2009, l'OMS recommande uniquement l'usage de techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic de ce virus parce qu'elles sont très sensibles et la sensibilité des tests rapides et des anticorps monoclonaux utilisés pour les techniques d'IF directe n'a pas encore été évaluée. Cependant, les premières séquences des différents segments de ce nouveau virus qui sont mises à disposition de l'ensemble de la communauté internationale montrent que de nombreux tests de PCR en temps réel ne permettent pas de détecter ce nouveau virus. Afin de palier au risque qu'un grand nombre de tests de dépistage soient rendus faussement négatifs, le CDC met à disposition le 29 avril un protocole de détection pour ce nouveau virus

qui inclut un test détectant toutes les grippes A (dont A/H1N1 et A/H3N2 saisonnières et A/H1N1pdm), et un test spécifique du nouveau variant A/H1N1pdm (CDC, 2009a). Après l'analyse des séquences disponibles nous réalisons que notre test diagnostique doit être adapté afin de détecter ce nouveau virus : c'est ce dont traite ce premier article qui a été écrit en mai 2009 et publié rapidement (en ligne le 8 juin 2009) afin de faire partager notre expérience sur le diagnostic moléculaire du virus A/H1N1pdm.

2. Article

A simple method for molecular detection of Swine-origin and human-origin influenza A virus.

Ninove L, Gazin C, Gould EA, Nougairede A, Flahault A, Charrel RN, Zandotti C, de Lamballerie X.

Unité des Virus Emergents, Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée & Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France.

Vector Borne Zoonotic Dis. 2010 Apr;10(3):237-40.

Résumé:

Here we present a real-time one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction SYBR Green assay derived from the method reported by van Elden and collaborators (2001) that ensures the rapid, sensitive, and cost-effective detection of both seasonal influenza A virus and emerging (H1N1) swine-origin influenza A virus (S-OIV). In addition to this screening test, which successfully detected both seasonal influenza A virus and S-OIV in human clinical samples, we showed that the probe initially designed by van Elden and collaborators could detect seasonal influenza A virus, but not S-OIV; a new probe was designed and tested that specifically detects S-OIV, but not seasonal influenza A. Both probe-based assays were validated by testing human clinical samples and specifically detected either seasonal influenza virus or S-OIV. Finally, in silico analysis of databases predicted that minor modifications of the van Elden primers would facilitate the use of this assay for the broad spectrum detection of all currently characterized variants of influenza A virus, including avian strains.

A Simple Method for Molecular Detection of Swine-Origin and Human-Origin Influenza A Virus

Laetitia Ninove,^{1,2} Céline Gazin,² Ernest A. Gould,^{1,3} Antoine Nougai re,^{1,2} Antoine Flahault,⁴
Rémi N. Charrel,^{1,2} Christine Zandotti,^{1,2} and Xavier de Lamballerie^{1,2,4}

Abstract

Here we present a real-time one-step reverse transcriptase–polymerase chain reaction SYBR Green assay derived from the method reported by van Elden and collaborators (2001) that ensures the rapid, sensitive, and cost-effective detection of both seasonal influenza A virus and emerging (H1N1) swine-origin influenza A virus (S-OIV). In addition to this screening test, which successfully detected both seasonal influenza A virus and S-OIV in human clinical samples, we showed that the probe initially designed by van Elden and collaborators could detect seasonal influenza A virus, but not S-OIV; a new probe was designed and tested that specifically detects S-OIV, but not seasonal influenza A. Both probe-based assays were validated by testing human clinical samples and specifically detected either seasonal influenza virus or S-OIV. Finally, *in silico* analysis of databases predicted that minor modifications of the van Elden primers would facilitate the use of this assay for the broad spectrum detection of all currently characterized variants of influenza A virus, including avian strains.

Key Words: Arbovirus(es)—Chikungunya—Dengue virus—Tick-borne encephalitis—Vector-borne.

MOLECULAR DETECTION OF INFLUENZA A VIRUSES, in the form of real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR), has been broadly adopted in medical diagnostic laboratories (Brown 2006), and thus routine diagnosis now includes these molecular techniques. However, the detection methods are directed at classical seasonal influenza viruses, currently, human H3N2 and H1N1, but not at the detection of avian or porcine viruses, which are rarely encountered in human medicine. Consequently, a large number of specific tests have recently been proposed for the detection of H5N1 avian viruses, after the significant emergence of human cases. However, assays designed to detect a large range of viral subtypes are rarely used for routine diagnosis. Nevertheless, such assays do exist and provided that they are precisely evaluated, merit more frequent use. Daum and collaborators (2007) proposed a panel of highly sensitive typing and subtyping protocols in a real-time RT-PCR format, and suggested that these tests offer significant utility in the context of a pandemic influenza outbreak. Other assays have been proposed (Whiley and Sloots 2005, Valle et al. 2006, Karlsson et al. 2007, Li et al. 2008), including

commercial kits (Gharabaghi et al. 2008) and tests derived from subtyping assays taking advantage of conserved nucleotide regions in the hemagglutinin gene (Gall et al. 2008, Yacoub et al. 2009).

Since 2002, we have been using a real-time PCR assay designed by van Elden and collaborators (2001) for the routine molecular detection of influenza A virus. In this test, a 189 nt fragment within the Matrix gene of the virus is amplified using the INFA-1 and INFA-23 primers and hybridized with the INFA-specific probe (see Fig. 1) using a two-step RT-PCR protocol (i.e., a reverse transcription reaction using random hexaprimers, followed by a real-time PCR reaction). This assay has proved to be robust and able to detect human influenza virus subtypes H1N1 and H3N2 in clinical samples. Moreover, it can be combined with the simultaneous detection of influenza B virus in a multiplex assay (van Elden et al. 2001).

The recent spread of the H1N1 swine-origin influenza A virus (S-OIV) led us to reconsider this assay. The Matrix gene of S-OIV is of porcine origin, and genetic analysis of sequences available in GenBank revealed an ~13% nt divergence

¹Unité des Virus Emergents, Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée & Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France.

²Fédération de Microbiologie, Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.

³CEH Oxford, Oxford, United Kingdom.

⁴EHESP School of Public Health, Rennes, France.

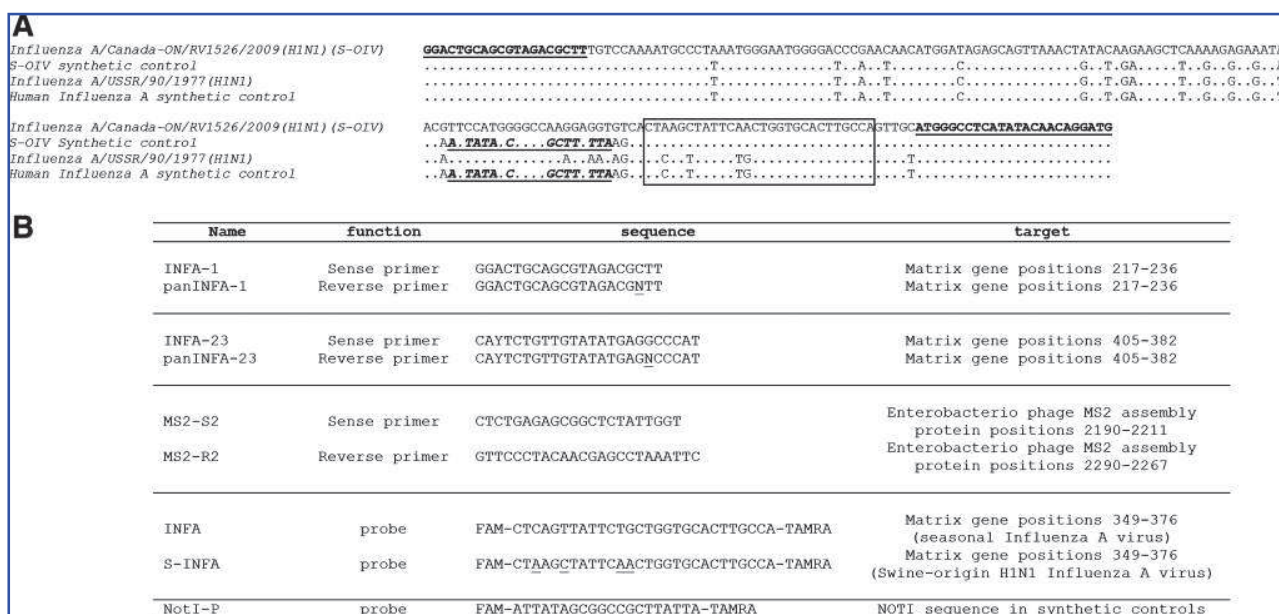


FIG. 1. (A) Comparison of sequences of an S-OIV strain and a seasonal H1N1 strain in the region amplified by the Van Elden primers within the Matrix gene (positions 217–405). Dots denote identical sequence. Primers are bold and underlined; characters and the central box correspond to the sequence targeted by INFA and S-INFA probes. The sequence of synthetic RNA controls is also indicated. The 5' end of these controls (first line) is identical and comes from the sequence of a human H1N1 strain (USSR/90/1977); the 3' end (second line) is specific for human virus or S-OIV and includes a *NotI* sequence that is targeted by the NotI-P probe (in italics and underlined). (B) Primers and probes used in this study.

between the region targeted by the assay in the new porcine H1N1 virus and in previously circulating H1N1 or H3N2 human strains. In particular, the region chosen for probe hybridization includes four nt mismatches (see Fig. 1), suggesting that the probe initially designed by van Elden and collaborators would not efficiently detect the new porcine virus. In contrast, the van Elden primers matched the corresponding sequence of the new virus (Figs. 1 and 2).

Accordingly, the primers from the van Elden assay were used to elaborate a simple SYBR Green one-step real-time RT-PCR assay as described hereafter. Extraction: 200 μ L of nasopharyngeal sample was spiked with 5 μ L of MS2 phage suspension and used for nucleic acid extraction (elution volume: 90 μ L) using the EZ1 Biorobot and the virus mini kit (both from Qiagen, Courtaboeuf, France). Amplification: one-step RT-PCR gene amplification was performed in a 25 μ L final volume, using 5 μ L of RNA extract, 1.4 μ L of each 10 μ M primer solution, and the one-step QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit master mix with Uracil-N-Glycosylase (UNG) (Qiagen).

Two distinct reactions were conducted using the Mx3005P[®] QPCR System thermocycler (Stratagene-Agilent, Massy, France) and the following thermal profile. Segment 1: 50°C, 2 min; segment 2: 95°C, 15 min; segment 3: 94°C, 15 s; 60°C, 30 s; and 72°C, 30 s (45 $\times$), followed by the analysis of a thermal dissociation curve. One reaction included the INFA-1/INFA-23 primer set for the detection of the influenza A virus; the other included the MS2-S2/-R2 primer set for detection of MS2 phage detection (see Fig. 1B for a list of primers and probes used in the current study). The latter reaction was used as an internal control for monitoring the extraction and RT-PCR steps, and in particular the detection of amplification inhibitors in the biological material tested (see the dissociation curve in Fig. 3, with a Tm at 82°C).

In addition, synthetic RNA transcripts (including a specific extrinsic specific sequence, that is, a *NotI* restriction site; see Fig. 1A) were produced by amplification with a primer containing the T7 promoter sequence and by transcription with the T7-MEGA shortscript (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. They were quantified by spectrophotometry and used as positive controls for RT-PCR amplification.

Synthetic RNA controls were detected with a Tm of the amplicons at 79.5°C (see Fig. 3). When serial dilutions were tested, 50 RNA copies per reaction could be reproducibly and unambiguously detected (equivalent to $\sim$ 4.5 viral RNA copies per μ L of clinical sample tested; data not shown). With regard to these performances, the assay was subsequently used to detect genomic viral RNA in clinical samples. It was able to detect either classical influenza A virus (see Fig. 3, detection of H3N2 virus in a human naso-pharyngeal sample, with a Tm at 80°C) or the newly emerging H1N1 porcine virus (detection of S-OIV in a human naso-pharyngeal sample, with a Tm at 81°C), justifying its use for the immediate detection of the influenza A virus in clinical samples.

In addition to this test, one-step real-time RT-PCR assays were performed using either the probe designed by van Elden and collaborators, or the equivalent probe (S-INFA) designed from the sequences available for S-OIV (see Fig. 1) and the following protocol. Amplification: Genetic amplification was performed in a one-step RT-PCR format and a 25 μ L final volume, using 5 μ L of RNA extract, 1 μ L of each 10 μ M primer solution, 0.4 μ L of 10 μ M probe solution, and the Super Script III Platinum One step qRT PCR System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Two reactions were conducted using the Mx3005P QPCR System thermocycler and the following thermal profile. Segment 1: 48°C, 30 min; segment 2: 95°C,

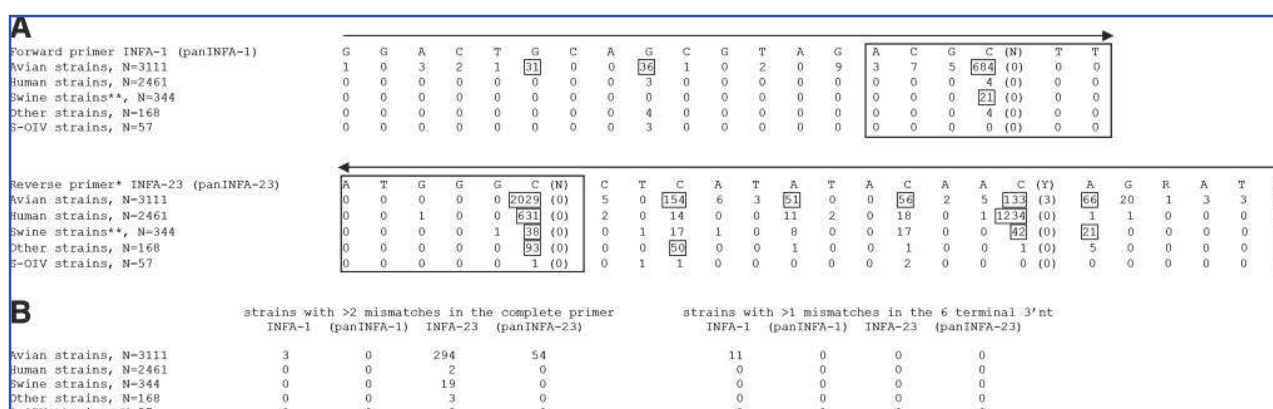


FIG. 2. (A) Number of nt mismatches observed between the primers used and sequences deposited in the Influenza Resource database for influenza A viruses of different origins. The sequence corresponding to the reverse primers is presented in the polarity of genomic sequence deposited in databases (reverse complement of the primer used for genetic amplification). **Swine strains do not include S-OIV strains, which are presented separately. The six terminal 3' positions of the primers (essential for a correct hybridization and initiation of polymerization) are in boxes. Nucleotides in parentheses correspond to modifications of sequences proposed for primers panINFA-1 and panINFA-23. Modifications were proposed only for variable positions among the six last 3' terminal nucleotides of each primer. The number of mismatches observed after introduction of these modifications are also indicated in parentheses. (B) Number of strains with a significant number of mismatches observed in the complete primers or in the six terminal 3' positions of the primers.

2 min; segment 3: 95°C, 15 s; 60°C, 1 min (45×). One reaction included the INFA-1/INFA-23 primer set and the INFA probe for the detection of the seasonal influenza A virus; the other included the same primers and the S-INFA probe for the detection of S-OIV. Synthetic RNA transcripts specific for human seasonal influenza A virus and S-OIV were used as positive controls for RT-PCR amplification.

Using both synthetic RNA transcripts and human samples positive for either H3N2 or S-OIV, it could be shown (see Fig. 3)

(i) that the van Elden and S-OIV probes could efficiently detect the H3N2 and S-OIV, respectively, but (ii) that the van Elden probe could not detect S-OIV, while the S-OIV probe could not detect seasonal influenza virus. A probe designed to detect specifically the synthetic positive control (NotI-P) was used to rule out the possibility of accidental amplification of the control.

Altogether, these results suggest that this SYBR Green one-step real-time RT-PCR assay is a simple, inexpensive, but very effective tool for screening clinical samples for the presence of

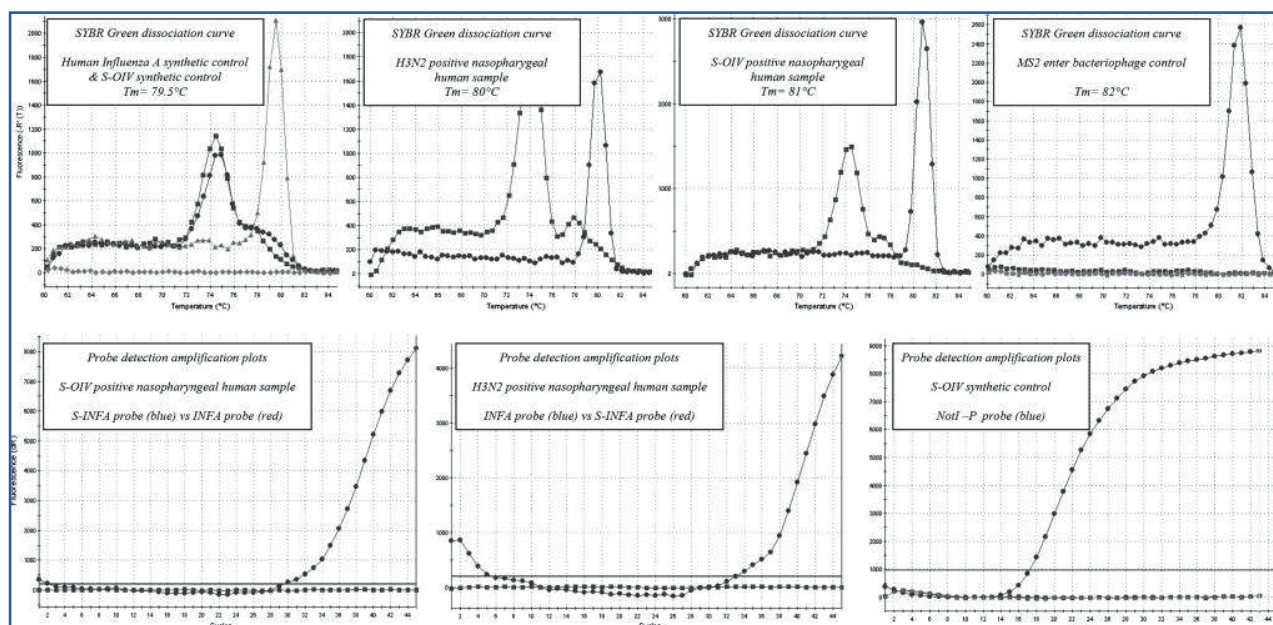


FIG. 3. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of synthetic controls and clinical samples. First line shows SYBR dissociation curves for influenza virus synthetic controls, H3N2-positive and S-OIV-positive clinical samples, and MS2 control. Second line shows specific probe detection of H3N2 and S-OIV in clinical samples using INFA and S-INFA probes that of S-OIV synthetic control using NotI-P probe (system designed for the detection of incidental contamination by synthetic controls).

influenza A virus. Most importantly, positive samples may be secondarily tested using the same primers and the van Elden (INFA) and S-OIV (S-INFA) probes to discriminate between seasonal and S-OIV. It should also be noted that the direct sequencing of the products resulting from the SYBR Green assay produced the definitive differentiation of seasonal and S-OIV strains.

In addition to this initial study, which provides a rapid and pragmatic solution to the detection of the newly emerging S-OIV, we analyzed in depth:

- (i) 6084 influenza A Matrix sequences available in the Influenza Virus Resource database (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/flu/flu.html) for which hemagglutinin and neuraminidase subtyping was available. This data set included 3111 avian strains [H1N1 (73), H1N2 (5), H1N3 (4), H1N5 (2), H1N6 (4), H1N9 (1), H2N1 (14), H2N2 (8), H2N3 (25), H2N4 (1), H2N5 (10), H2N7 (7), H2N8 (4), H2N9 (14), H3N1 (8), H3N2 (57), H3N3 (5), H3N4 (3), H3N5 (7), H3N6 (44), H3N7 (3), H3N8 (96), H3N9 (2), H4N1 (3), H4N2 (15), H4N3 (5), H4N4 (2), H4N5 (2), H4N6 (91), H4N7 (1), H4N8 (35), H4N9 (8), H5N1 (980), H5N2 (126), H5N3 (50), H5N4 (4), H5N6 (1), H5N7 (6), H5N8 (4), H5N9 (5), H6N1 (145), H6N2 (92), H6N3 (4), H6N4 (6), H6N5 (19), H6N6 (9), H6N8 (47), H6N9 (2), H7N1 (43), H7N2 (121), H7N3 (91), H7N4 (4), H7N5 (2), H7N7 (29), H7N8 (4), H7N9 (4), H8N4 (18), H9N1 (6), H9N2 (524), H9N5 (4), H9N6 (2), H9N8 (2), H9N9 (1), H10N1 (2), H10N2 (2), H10N3 (3), H10N4 (3), H10N5 (6), H10N6 (2), H10N7 (37), H10N8 (6), H10N9 (2), H11N1 (8), H11N2 (9), H11N3 (7), H11N4 (1), H11N6 (5), H11N8 (2), H11N9 (42), H12N1 (1), H12N2 (1), H12N4 (3), H12N5 (23), H12N8 (1), H12N9 (2), H13N2 (5), H13N3 (1), H13N6 (11), H13N8 (1), H13N9 (3), H14N5 (1), H14N6 (1), H15N9 (1), H16N3 (5)], 2461 human strains [H1N1 (696), H1N2 (35), H2N2 (76), H3N2 (1532), H5N1 (119), H7N2 (1), H7N7 (2)], 344 porcine strains [H1N1 (158), H1N2 (56), H3N1 (2), H3N2 (92), H3N3 (2), H4N6 (2), H5N1 (5), H5N2 (1), H9N2 (26)], and 168 strains of diverse origin (environment, horse, tiger, leopard, cat, civet, musk rat, mink, etc.) [H11N6 (1), H11N8 (2), H11N9 (1), H1N1 (1), H3N2 (3), H3N6 (3), H3N8 (80), H4N6 (2), H5N1 (18), H5N2 (7), H7N2 (47), H7N3 (2), H7N7 (1)];
- (ii) 57 S-OIV influenza A Matrix sequences available in GenBank.

The performance of the van Elden primers was evaluated *in silico* for each group of influenza A viruses (see Fig. 2). This analysis revealed that these primers are indeed highly appropriate for the detection of human seasonal influenza A virus and for most porcine strains, including the newly emerging S-OIV. However, minor but important modifications among the six 3' terminal nucleotides of each primer would ensure the detection of viruses from other groups, in particular avian viruses (see Fig. 2B). Modified primers (panINFA-1 and panINFA-23) were predicted to be capable of detecting all Matrix sequences available to date, including strains of avian (including H5N1 viruses) and porcine (including H1N1 viruses) origin, irrespective of hemagglutinin and neuraminidase subtypes.

In conclusion, we propose a simple and cost-effective amplification protocol for the detection of both seasonal influenza

virus and newly emerging S-OIV strains. Its effectiveness relies on tried and tested amplification primers that were shown to be extremely reliable for the screening of clinical samples and on actual detection of both seasonal and H1N1 S-OIV in human clinical samples. *In silico* analysis predicts that minor modifications of these primers would allow the use of this assay for the broad spectrum detection of all currently known variants of influenza A virus, including avian strains.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Brown, IH. Advances in molecular diagnostics for avian influenza. *Dev Biol (Basel)* 2006; 124:93–97.
- Daum, LT, Canas, LC, Arulanandam, BP, Niemeyer, D, et al. Real-time RT-PCR assays for type and subtype detection of influenza A and B viruses. *Influenza Other Respi Viruses* 2007; 1:167–175.
- Gall, A, Hoffmann, B, Harder, T, Grund, C, Beer, M. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2561–2567.
- Gharabaghi, F, Tellier, R, Cheung, R, Collins, C, et al. Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. *J Clin Virol* 2008; 42:190–193.
- Karlsson, M, Wallensten, A, Lundkvist, A, Olsen, B, Brytting, M. A real-time PCR assay for the monitoring of influenza A virus in wild birds. *J Virol Methods* 2007; 144:27–31.
- Li, PQ, Zhang, J, Muller, CP, Chen, JX, et al. Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for the detection of influenza virus type A including H5 and H9 subtypes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61:192–197.
- Valle, L, Amicizia, D, Bacilieri, S, Banfi, F, et al. Performance testing of two new one-step real time PCR assays for detection of human influenza and avian influenza viruses isolated in humans and respiratory syncytial virus. *J Prev Med Hyg* 2006; 47:127–133.
- van Elden, LJ, Nijhuis, M, Schipper, P, Schuurman, R, van Loon, AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:196–200.
- Whiley, DM, Sloots, TP. A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:335–337.
- Yacoub, A, Kiss, I, Zohari, S, Hakhverdyan, M, et al. The rapid molecular subtyping and pathotyping of avian influenza viruses. *J Virol Methods* 2009; 156:157–161.

Address correspondence to:

Xavier de Lamballerie
Unité des Virus Emergents
Faculté de Médecine de Marseille
Université de la Méditerranée & Institut de Recherche
pour le Développement
27 Bd Jean Moulin
13005 Marseille
France

E-mail: xavier.de-lamballerie@univmed.fr

This article has been cited by:

1. Elizabeth Botelho-Nevers, Philippe Gautret, Lucas Benarous, Rémi Charrel, Peter Felkai, Philippe Parola. 2010. Travel-Related Influenza A/H1N1 Infection at a Rock Festival in Hungary: One Virus May Hide Another One. *Journal of Travel Medicine* **17**:3, 197-198. [[CrossRef](#)]
2. A. Nougairede, L. Ninove, C. Zandotti, S.-D. Thiberville, C. Gazin, B. La Scola, R. N. Charrel, X. de Lamballerie. 2010. Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April-November 2009. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:4, 322-325. [[CrossRef](#)]
3. Wai-Yip Lam, Ting-Fan Leung, Nelson Lee, Jo L.K. Cheung, Apple C.M. Yeung, Yolanda I.I. Ho, Rickjason C.W. Chan, Kitty S.C. Fung, Ian G. Barr, David S.C. Hui, Joseph J.Y. Sung, Paul K.S. Chan. 2010. Development and comparison of molecular assays for the rapid detection of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *Journal of Medical Virology* **82**:4, 675-683. [[CrossRef](#)]

3. Discussion

Ce test de dépistage a été mis en place *in silico* (choix de ne pas utiliser la sonde et d'utiliser une technique en temps réel utilisant un agent intercalant, le SYBR green, qui permet de détecter tous les ADN double brin dans le milieu réactionnel), puis utilisé sur les premiers prélèvements reçus au laboratoire fin avril. Il n'a pas tardé à montrer son efficacité à détecter les virus grippaux A saisonniers et A/H1N1pdm. Nous avons alors décidé de publier ce système (article en ligne dès le 8 juin 2009) et de l'utiliser en routine en association avec le système spécifique du virus A/H1N1pdm mis au point par le Centre National de Référence de la grippe (Van der Werf *et al.*, 2009). De mai 2009 à mars 2010, plus de 13000 échantillons ont été testés ce qui a confirmé la robustesse et la sensibilité de ce test pour détecter les virus grippaux A et notamment les virus A/H1N1pdm (cf. résultats article 1, 2 et 3).

Ce test a deux avantages majeurs : il permet la détection d'une très large gamme de virus A et la différenciation des deux types de virus A qui circulaient durant la saison 2009-10. En effet, en plus de détecter toutes grippes A humaines, la lecture des courbes de fusion permet dans le même temps de faire la différence entre les souches saisonnières (température de fusion : 80°C) et le nouveau variant A/H1N1pdm (température de fusion 81°C) et cette différenciation était particulièrement importante en 2009 car la pathogénicité du nouveau variant A/H1N1pdm était alors inconnue. Cependant, l'expérience a montré que pour les échantillons faiblement positifs, il est souvent difficile de faire cette distinction soulignant l'utilité de pratiquer deux tests sur les échantillons. Par ailleurs, deux modifications dans les amorces décrites initialement en 2001 (van Elden *et al.*, 2001) permettent de détecter quasiment toutes les grippes A animales dont la grippe A/H5N1 aviaire hautement pathogène. Ce test est donc un bon outil pour une première détection des virus grippaux A responsables d'anthropozoonoses (et peut-être les futurs virus pandémiques) dans les laboratoires qui n'ont pas la possibilité de réaliser un grand panel de tests de biologie moléculaire.

B. Article 5: Serological study of the 2009 pandemic due to influenza A H1N1 in the metropolitan French population.

Delangue J, Salez N, Ninove L, Kieffer A, Zandotti C, Seston M, Lina B, Nougairede A, Charrel R, Flahault A, de Lamballerie X.

1. Avant propos

Peu de temps après l'émergence du nouveau virus A/H1N1pdm, les premières études de la structure des antigènes (Garten *et al.*, 2009) et sérologique (CDC, 2009b) prédisaient que, hormis les personnes en contact avec des virus proches de la souche pandémique de 1918-1919 (>80 ans), la population n'était pas protégée contre ce nouveau virus.

Après la première vague dans l'hémisphère Sud, aux Etats-Unis et en Angleterre, les premières études sérologiques montrèrent que les taux d'attaque globaux étaient d'environ 10-20%, avec une grande majorité de séroconversions observée chez les enfants et les jeunes adultes suggérant alors qu'une assez grande partie de la population de plus de 40-50 ans (selon les études) était partiellement protégée contre ce virus (Dellagi *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2010; McVernon *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). De plus, certaines études suggèrent des réactions croisées entre les anticorps acquis suite à des infections par les virus A/H1N1 saisonniers et le virus A/H1N1pdm, montrant que les relations antigéniques entre les différents virus sont souvent complexes (Greenbaum *et al.*, 2009; Labrosse *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2010).

Afin de déterminer le taux de séroconversion en France suite à l'émergence du nouveau virus A/H1N1pdm (et surtout suite à la vague hivernale qui débuta mi-octobre à Marseille), nous décidons de tester en IHA plus de 1500 sérums collectés avant 2009 et environ 1400 sérums collectés après la vague pandémique. Une étude sur la séoprévalence per-pandémique chez les femmes enceintes est également entreprise. Les résultats de ces études ont été publiés fin avril 2001 dans *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.

2. Article

Serological study of the 2009 pandemic due to influenza A H1N1 in the metropolitan French population.

Delangue J, Salez N, Ninove L, Kieffer A, Zandotti C, Seston M, Lina B, Nougairede A, Charrel R, Flahault A, de Lamballerie X.

Unité des Virus Emergents, UMR190 Université Aix-Marseille 2 and Institut de Recherche pour le Développement Pôle de Microbiologie et Maladies Infectieuses, AP-HM Public Hospitals of Marseilles, Marseille CRISIS-H centre, EHESP School of Public Health, Rennes Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France), Lyon, France.

Clin Microbiol Infect. 2011 Apr 25. doi: 10.1111/j.1469-0691

Résumé:

We looked for evidence of antibodies to the 2009 influenza A/H1N1 pandemic virus in panels of sera from individuals living in metropolitan France, obtained either before, during or after the epidemic, using standard haemagglutination inhibition and microneutralization tests. The difference between seroprevalence values measured in post- and pre-epidemic panels was used as an estimate of seroconversion rate in different age groups (23.4% (0-24 years, age-group 0); 16.5% (25-34); 7.9% (35-44); 7.2% (45-54); 1.6% (55-64); and 3.1% (>65)), confirming that the distribution of cases in different age groups was similar to that of the seasonal H1N1 virus. During the pre-pandemic period low-titre cross-reactive antibodies were present in a large proportion of the population (presumably acquired against seasonal H1N1) whereas cross-reactive antibodies were detected in individuals over the age of 65 years with significantly higher prevalence and serological titres (presumably acquired previously against Spanish flu-related H1N1 strains). Clinical data and analysis of post-pandemic seroprevalence showed that few of these latter patients were infected by the influenza virus during the epidemic. In contrast, the majority of both clinical cases and seroconversions were recorded in the 0-24 age group and a global inverse relationship

between prevalence of antibodies to pH1N1 in the pre-pandemic period and rate of seroconversion was observed amongst age groups. Our results emphasize the complex relationships involved in antigenic reactivity to pandemic and seasonal H1N1 viral antigens; hence the difficulty in distinguishing between low-titre specific and cross-reactive antibodies, establishing precise seroprevalence numbers and fully understanding the relationship between previous immunity to seasonal viruses and protection against the novel variant.

Serological study of the 2009 pandemic due to influenza A H1N1 in the metropolitan French population

J. Delangue^{1,*}, N. Salez^{1,*}, L. Ninove^{1,2}, A. Kieffer³, C. Zandotti^{1,2}, M. Seston¹, B. Lina⁴, A. Nougairède^{1,2}, R. Charrel^{1,2}, A. Flahault³ and X. de Lamballerie^{1,2,3}

1) Unité des Virus Emergents, UMR190 Université Aix-Marseille 2 and Institut de Recherche pour le Développement, 2) Pôle de Microbiologie et Maladies Infectieuses, AP-HM Public Hospitals of Marseilles, Marseille, 3) CRISIS-H centre, EHESP School of Public Health, Rennes and 4) Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France), Lyon, France

Abstract

We looked for evidence of antibodies to the 2009 influenza A/H1N1 pandemic virus in panels of sera from individuals living in metropolitan France, obtained either before, during or after the epidemic, using standard haemagglutination inhibition and microneutralization tests. The difference between seroprevalence values measured in post- and pre-epidemic panels was used as an estimate of seroconversion rate in different age groups (23.4% (0–24 years, age-group 0); 16.5% (25–34); 7.9% (35–44); 7.2% (45–54); 1.6% (55–64); and 3.1% (>65)), confirming that the distribution of cases in different age groups was similar to that of the seasonal H1N1 virus. During the pre-pandemic period low-titre cross-reactive antibodies were present in a large proportion of the population (presumably acquired against seasonal H1N1) whereas cross-reactive antibodies were detected in individuals over the age of 65 years with significantly higher prevalence and serological titres (presumably acquired previously against Spanish flu-related H1N1 strains). Clinical data and analysis of post-pandemic seroprevalence showed that few of these latter patients were infected by the influenza virus during the epidemic. In contrast, the majority of both clinical cases and seroconversions were recorded in the 0–24 age group and a global inverse relationship between prevalence of antibodies to pH1N1 in the pre-pandemic period and rate of seroconversion was observed amongst age groups. Our results emphasize the complex relationships involved in antigenic reactivity to pandemic and seasonal H1N1 viral antigens; hence the difficulty in distinguishing between low-titre specific and cross-reactive antibodies, establishing precise seroprevalence numbers and fully understanding the relationship between previous immunity to seasonal viruses and protection against the novel variant.

Keywords: Epidemiology, H1N1, haemagglutination, microneutralization, pandemic, seroconversion

Original Submission: 9 September 2010; **Revised Submission:** 1 April 2011; **Accepted:** 3 April 2011

Editor: T. A. Zupanc

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: X. de Lamballerie, Unité des Virus Emergents, UMR190 Université Aix-Marseille 2, 27 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France

E-mail: xavier.de-lamballerie@univmed.fr

* Contributed equally to this study.

Introduction

A novel influenza virus, A/H1N1, emerged in Mexico in April 2009 (pH1N1(2009), referred to here as pH1N1). In June, the World Health Organization declared a pandemic alert

due to its rapid global dispersal. Significant differences between the antigenic structure of this novel variant and that of H1N1 seasonal viruses (referred to here as sH1N1) that circulated during the previous decades, were identified [1–3]. This agreed with the observed epidemiological dissemination of the disease that first hit western countries during the summer of 2009 and with the first serological studies that appeared to show limited cross-reactivity between pandemic and seasonal H1N1 viruses [1,4–10], predicting limited protection following vaccination based on seasonal influenza vaccine [5,9].

To date, few seroepidemiological studies of the first and second waves of the 2009 pandemic have been performed

[11–16], but the accumulating data imply that the antigenic relationship between the pandemic virus and previously circulating H1N1 viruses is more complex than was initially realised: antigenic relationships between the haemagglutinin of the pandemic virus and that of the 1918 H1N1 virus were confirmed by structural studies [3,17–21], but a significant correlation was observed between neutralization of pandemic A/H1N1 and neutralization of a standard seasonal A/H1N1 strain, and significantly higher pH1N1 neutralizing titres were detected in subjects who had previously received vaccination against seasonal influenza in 2008–2009 [22].

Here, we have examined the antibody repertoire of the pandemic A/H1N1 virus in individuals, using panels of pre-, per- and post-epidemic sera from French metropolitan populations. In parallel, we tested pre-pandemic sera for the presence of antibodies to the recently circulating H1N1 seasonal virus.

We present the first dataset, which allows us to propose an estimate of the seroconversion rate in the French metropolitan population during the 2009 pandemic waves and discuss the distribution of cases in age groups in the light of the complex antigenic cross-relationships between pandemic and seasonal H1N1 viral antigens.

Materials and Methods

Ethical issues

This study was approved by the Departmental (IFR48) Ethics Committee for archival hospital panels and by the 'Comité de Protection des Personnes Ile de France' for per-pandemic samples (including patient consent). All information in databases was made anonymous.

Populations studied

Pre-epidemic serum samples. One thousand six hundred and ninety-three sera collected in 2007–2008 (archival material randomly selected from the serum library of the Public Hospitals of Marseilles) were tested for antibody to pH1N1, including a subpopulation of 1020 samples also tested for sH1N1. The distribution in age groups is indicated in Table 1.

Post-epidemic samples. Similarly, 1396 archival sera sampled after the end of the pandemic wave in France (weeks 51–2009 to 12–2010) were tested for antibody to pH1N1.

Per-epidemic samples. Sera were collected between weeks 45–2009 and 12–2010 from 1541 women (not vaccinated against pH1N1) tested during the first term of pregnancy in French private biology laboratories (RBML network) for toxoplasmosis (95% in the 20–39 years age group; median age, 30). The geographical origin of samples is shown in Fig. 1. Sera were tested for antibody to pH1N1.

Haemagglutination inhibition (HI) assays

Viral antigen. This was prepared from a phosphate buffer saline dilution of influenza virus cell culture supernatant medium, conserved either at -80°C (HI-assay) or freeze-dried in the presence of sucrose 0.2 M (microneutralization assay). Strains used were: (i) pH1N1: OPYFLU-1, isolated in Marseille in early May 2009 [8,23], and (ii) sH1N1: MRS-2007 (closely related to strain A/Paris/6/2007(H1N1)).

HI-assay. This was conducted in a Bio-Safety Level 3 laboratory using 5.33 haemagglutinating units of non-inactivated antigen, serial dilutions (1/10–1/1280) of heat-inactivated

TABLE 1. Seroprevalence of pandemic H1N1 in pre- and post-epidemic panels, using the haemagglutination inhibition (HI) method

	Pre-epidemic samples (2007–2008)		Post-epidemic samples (2010)		Difference (CI)		Cases in FMP	
Total	N = 1693		N' = 1396			FMP* 62.8	N''*(CI)	Distribution 100%
Age	%HI $\geq 1/40$ (CI)		%HI $\geq 1/40$ (CI)		$\Delta \geq 1/40$ (CI)		$\Sigma = 7.5$	
0–24	383	40.47 (35.55–45.39)	318	63.84 (58.56–69.12)	23.37 (18.09–28.65)	19.4	4.5 (3.5–5.6)	59.8%
25–34	299	43.48 (34.99–51.96)	235	60.00 (50.54–69.46)	16.52 (7.06–25.98)	7.8	1.3 (0.5–2.0)	17.0%
35–44	267	45.32 (33.25–57.38)	231	53.25 (40.25–66.25)	7.93 (–5.07–20.93)	8.9	0.7 (0.0–1.9)	9.3%
45–54	190	51.58 (33.60–69.56)	194	58.76 (41.23–76.29)	7.18 (–10.8–25.16)	8.5	0.6 (0.0–2.1)	8.1%
55–64	205	58.54 (38.03–79.04)	208	60.10 (39.86–80.33)	1.56 (–18.95–22.07)	7.7	0.1 (0.0–1.7)	1.6%
65–100	349	68.77 (51.50–86.03)	210	71.90 (50.32–93.49)	3.14 (–18.45–24.73)	10.5	0.3 (0.0–2.6)	4.3%

The difference between the 2007–2008 baseline and the 2010 seroprevalence was used as an estimate of the seroconversion rate ($\Delta \geq 1/40$).

FMP, French metropolitan population for year 2009 (source INSEE); N, number of samples tested from pre-pandemic panel; N', number of samples tested from post-pandemic panel; N'', estimates of the number of cases in the French metropolitan population; %HI $\geq 1/40$, proportion of samples with a pH1N1 HI-titre $\geq 1/40$; $\Delta \geq 1/40$, difference of seroprevalence (titre $\geq 1/40$) between pre- and post-pandemic panels. CI, 95% confidence interval calculated according to the Wald method without continuity correction.

*Expressed in millions.

Distribution: estimate of the distribution of cases in the different age classes of the FMP, based on N'' values.

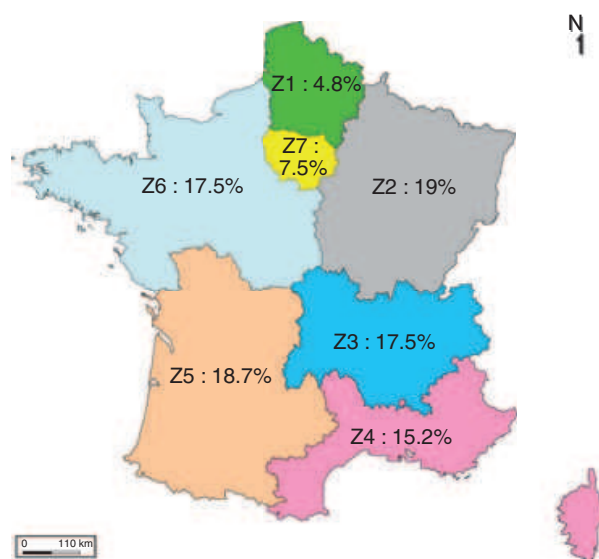


FIG. 1. Distribution of samples collected from pregnant women according to the French Defence Zones.

sera, group O human erythrocytes (French Blood Bank), and Eppendorf epMotion working stations. The HI-titre was determined as the highest dilution providing clear inhibition of haemagglutination. All experiments included the same negative and positive controls, and a serum agglutinating activity control.

Microneutralisation assay

The relationship between HI and seroneutralization results was examined for 446 sera exhibiting various HI-titres. Microneutralization was performed in a 96-well microplate format using MDCK cells, two-fold serial dilutions (1/10–1/1280) of heat-inactivated sera and 4.10^3 TCID₅₀/ml of strain OPYFLU-1. Positive and negative controls were included in each plate. Serum dilution causing 90% inhibition of viral infection (i.e. IC₉₀-neutralizing titre) was determined by immunofluorescence (Argene anti-influenza A 650 assay).

Results

Pre-epidemic samples

HI-titres for 1693 sera sampled in 2007–2008 are provided in Table 1 and Fig. 2(a), which show that antibodies to pH1N1 are observed in all age groups, the seroprevalence increasing from 40.5% in individuals 0–24 years old to nearly 70% in the elderly. Fig. 2(a) illustrates the different distribution of low and high pH1N1 HI-titres according to age groups: the prevalence of antibodies at low titre (1/40) increases with age, except in the elderly where it decreases.

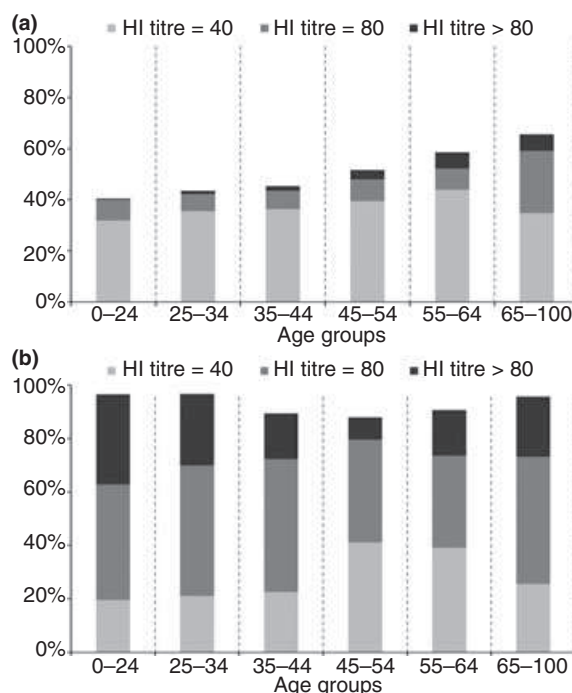


FIG. 2. Results of haemagglutination inhibition (HI) assays amongst pre-pandemic sera according to age groups. (a) HI assay using pandemic H1N1 antigen ($n = 1693$). (b) HI assay using seasonal H1N1 antigen ($n = 1020$).

By contrast, HI-titres $\geq 1/80$ are much less prevalent, and more frequent in individuals >65 years old than in younger age groups (chi-squared test, $p < 0.01$), in agreement with previous findings [8,11,12]. Amongst individuals aged >65 , the prevalence of HI-titres $\geq 1/80$ increases constantly with age, and exceeds 40% in those aged >85 .

The situation was markedly different for sH1N1 serology. High seroprevalence values were observed in all groups with specific characteristics: (i) high titres (>40) were frequent in all age groups (Fig. 2b) and (ii) the lowest values of both seroprevalence and HI-titres were observed for individuals 45–54 years old. Individuals who were 50 years old at the time of our study were 0–20 years old in the 1957–1977 period characterized by the absence of H1N1 viruses circulating in Europe. The serological pattern observed in this age group may be related to the ‘antigenic sin’, which possibly coloured all subsequent responses to influenza [21,24,25].

Post-epidemic samples

One thousand three hundred and ninety-six samples collected in 2010 were tested for the presence of antibody to pH1N1 and the difference between seroprevalence values measured in post- and pre-epidemic panels was used as an estimate of seroconversion rate in different age groups, using

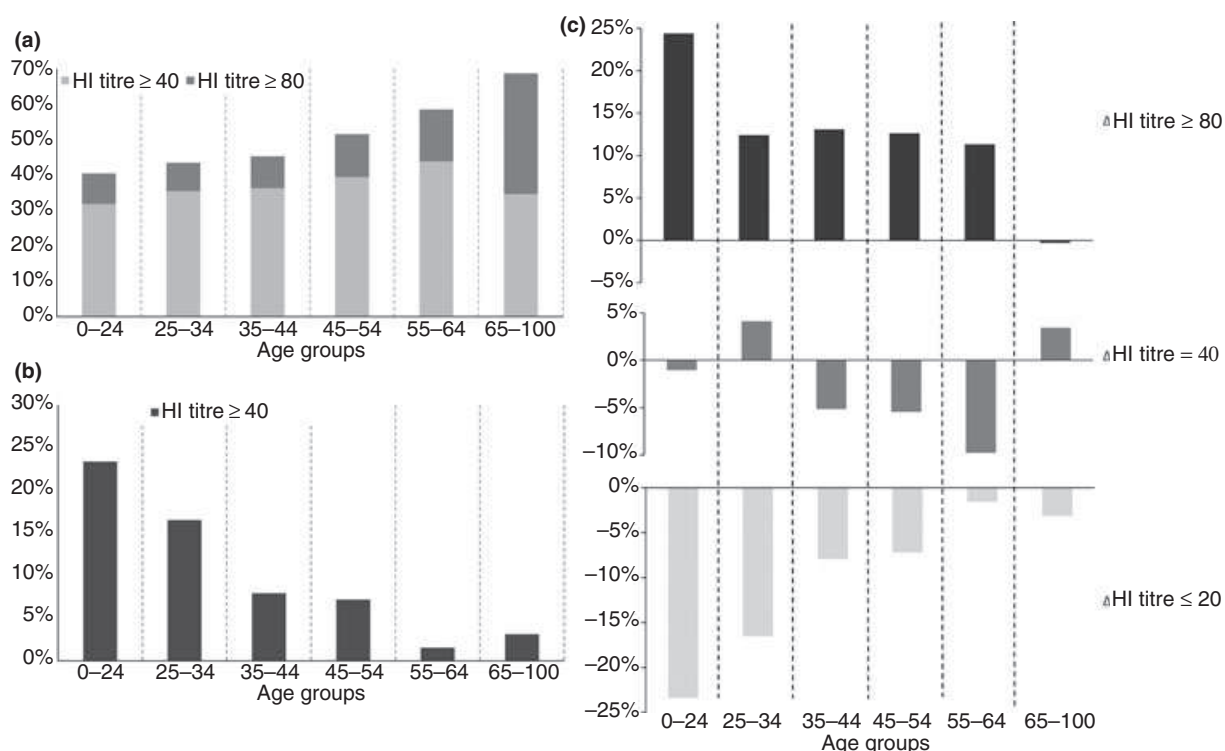


FIG. 3. Evolution of pHINI seroprevalence in pre- and post-pandemic panels according to age groups and haemagglutination inhibition (HI) titre. (a) pHINI seroprevalence in pre-pandemic panel. (b) Estimates of seroconversion rates. (c) Evolution of pHINI seroprevalence between pre- and post-pandemic panels according to HI-titre.

a threshold titre at 1/40 (Table 1): (i) the highest seroprevalence increase was observed in individuals <25 years old and it was low in individuals >55 years old; (ii) a global inverse relationship between pHINI seroprevalence in the pre-pandemic period and rate of seroconversion was observed amongst age groups (Fig. 3).

The comparison of pre- and post-epidemic periods (Fig. 3c) shows that the prevalence of titres $\leq 1/20$ decreased, and that of titres $\geq 1/80$ increased. The prevalence of the 1/40 titre decreased in most age groups. A plausible interpretation is that a large proportion of the patients who were infected reached high antibody titres after the pandemic, including individuals with a 1/40 pre-epidemic HI-titre. This implies that a proportion of those with 1/40 pre-epidemic HI-titre were not efficiently protected against infection.

The distribution of cases in age groups was in line with results previously obtained from biologically confirmed pHINI infections in the region of Marseille [8]. A rough evaluation of the distribution of cases in the French metropolitan population, extrapolated from the results of our samples, suggests that more than 50% of cases occurred in individuals younger than 25 (Table 1), and that the global attack rate was in the order of magnitude of 12%.

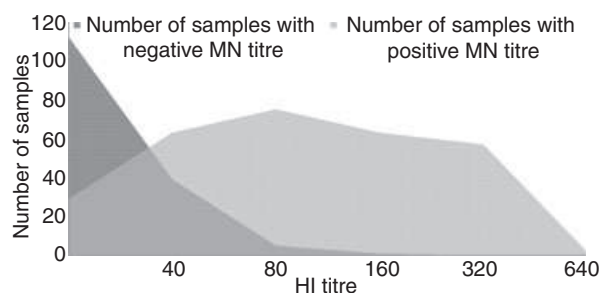


FIG. 4. Relationship between haemagglutination inhibition (HI) and microneutralization (MN) titre tested with pandemic H1N1.

Interpretation of HI-assay

In a sample of 446 sera, we performed seroneutralization analysis. The number of positive (titre $>1/10$, which may be associated with protective seroneutralizing activity [26]) and negative microneutralization results was reported for each HI-titre (Fig. 4). A standard threshold set-up at 1/40 was associated with high sensitivity and negative predictive values (90% and 79%, respectively) but poor positive predictive and specificity values (85% and 72%, respectively) for the detection of seroneutralizing antibodies (Fig. 4). A cut-off value at 1/80 for the HI-assay resulted in giving clear priority

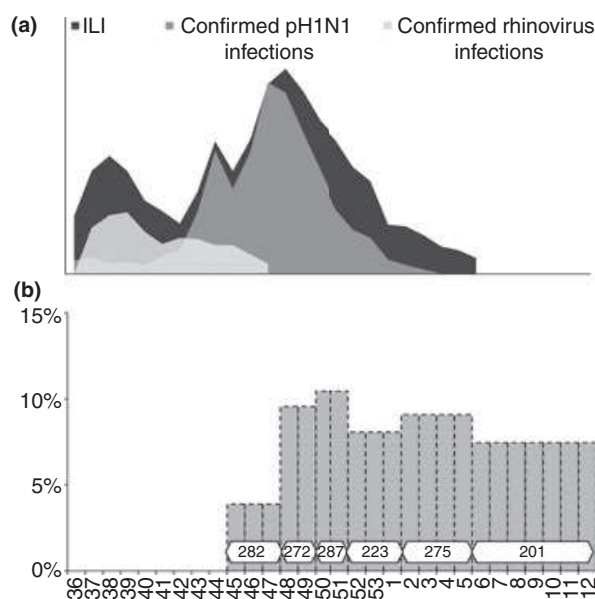


FIG. 5. Evaluation of pandemic H1N1 seroprevalence in French metropolitan pregnant women ($n = 1541$). (a) Sequences of influenza-like illness (ILI), confirmed rhinovirus infections and confirmed pandemic H1N1 are shown using an arbitrary scale. (b) Grey rectangular areas show the evolution of pandemic H1N1 haemagglutination inhibition (HI) seroprevalence.

to specificity (>96%) and positive predictive value (>97%) of antibody detection over sensitivity (68%) and negative predictive value (62%). This indicates that titre at 1/80 may represent a relevant threshold for the specific diagnosis of recent pH1N1 infections.

Per-epidemic samples

The evolution of pH1N1 seroprevalence in 1541 non-vaccinated pregnant women is shown in Fig. 5, together with the sequence of influenza-like illnesses during the period, which included a peak of rhinovirus infections just before the influenza epidemic peak. It was evaluated over six time-intervals with comparable enrollment. In the absence of a significant serological baseline in this specific epidemiological group, the threshold titre providing the highest positive predictive value (1/80) was used to detect recent cases. The pH1N1 seroprevalence rapidly increased (following at a 2.5-week interval the curve of confirmed pH1N1 infections), peaked at weeks 50–51 and slightly decreased afterwards.

The first seroprevalence value was obtained at week 45 (3.9%) and provides a picture of the proportion of individuals infected at week 42 (considering a 2.5-week interval for seroconversion). It may slightly overestimate the actual seroprevalence baseline, because approximately 14% of confirmed cases were observed before week 42 in the 20–39

years age group according to hospital numbers. A corrected baseline value (according to the number of cases recorded at week 42) could be evaluated around 2.4%. Accordingly, the difference between seroprevalence at the peak (10.5%) or in the post-epidemic period (8.5%) and the corrected baseline value was estimated to be around 8.1% and 6.1%, respectively.

Discussion

We present here the first pH1N1 serological study in the French metropolitan population that allows us to propose an estimate of seroconversion rates during the 2009 pandemic waves. The panels studied (patients hospitalized in the public hospitals of Marseilles) cannot be considered to be representative of the French metropolitan population but provided relevant information regarding the distribution of cases in age groups and its possible mechanisms.

Our study confirms that a large proportion of the population tested in the pre-pandemic period had antibodies cross-reacting with the new virus (up to approximately 70% in the elderly). In addition, a global inverse relationship between prevalence of antibodies to pH1N1 in the pre-pandemic period and estimates of seroconversion was observed amongst age groups. However, this relationship deserves careful interpretation because the distribution of high-titre antibodies is very different according to age groups in the pre-epidemic period. For example, in individuals <25 years old, the presence of antibodies in more than 40% of individuals was associated with a low prevalence of high-titre HI antibodies (only 8.6% of individuals in this group had pH1N1 HI-titres $\geq 1/80$ before the pandemic) and with limited level of protection (the estimates of seroconversion rate are over 20% in this age group). Because (i) there is considerable epidemiological evidence that this specific population had no opportunity for previous contact with the pandemic virus or closely related variants and (ii) the level of vaccine immunisation is low in this group (<7%, Groupe d'Expertise et d'Information sur la Grippe, GEIG, source), it is likely that antibodies to pH1N1 are cross-reacting antibodies, previously acquired following seasonal influenza infection. In support of this hypothesis, Fig. 2(b) shows that such antibodies are frequent in this age group, and frequently with high HI-titres. However, this cross-reactivity was mostly associated with low-titre (1/40) antibodies to pH1N1, which appear to be associated with significant seroneutralizing titres in a limited proportion of cases (Fig. 4).

With different numbers, this observation globally stands for individuals in the 25–54 years old age groups, but not for the elderly. In individuals older than 54 years, the prevalence of

antibodies to pH1N1 was high in the pre-epidemic period, but most importantly, the prevalence of high-titre antibodies was much higher than in other age groups (Fig. 3a) and seems to have been associated with a significant level of protection, considering both seroconversion estimates and epidemiological data (numbering of clinical cases) collected in metropolitan France [23]. This hypothesis is further supported by the fact that, in our study, HI-titres $\geq 1/80$ were strongly associated with significant seroneutralization titres (Fig. 4). Indeed, in a previous study, Chen and collaborators observed that, in a group of subjects with confirmed pH1N1, none had neutralizing antibodies at titres >10 before the infection [26].

A possible explanation for the efficient protection observed in the elderly may be iterative vaccination against seasonal influenza, because this age group benefits from the highest vaccine coverage in France (25% (55–59), 35% (60–64) and around 70% in the >65 age group; GEIG source). Antibodies to sH1N1 are frequent in this group but this level and the proportion of individuals with high-titre antibodies is not markedly different from the youngest age groups. Another plausible explanation is that these individuals may have had past exposure to H1N1 variants that share more antigenic similarity with the novel pandemic variant than recent sH1N1 strains. An important antigenic drift of H1N1 viruses occurred at the end of the 1940s, and patients over the age of 60 had the opportunity to be in contact with 'pre-drift' viruses (Spanish flu-related H1N1 strains) [3,7,11,12,27]. Because antigenic relatedness between the 2009 pH1N1 and the 1918 virus has been reported [3,18], this original immunisation may explain the paucity of infections reported in this age group in Mexico, the United States, Australia and other regions of the world where serological and epidemiological data could be evaluated [24].

Despite the aforementioned reservations regarding the representativeness of the populations examined, our study demonstrates that the HI method provides, in the case of pH1N1, results in line with those obtained by compiling clinical data [7,8,23]. Distribution in age groups is similar in our seroprevalence series and in biologically confirmed pH1N1 cases, demonstrating: (i) that the global attack rate was in the order of magnitude of 12% in the French metropolitan population; (ii) that the very first target of the pandemic wave was the population under the age of 25 (the estimated seroconversion rate reached approximately 24% in the 0–24 age group and, according to the French metropolitan pyramid of ages, this means that more than one half of cases presumably occurred in individuals younger than 25); and (iii) that the number of cases in individuals older than 54 years was limited. This distribution of cases is similar to that previously observed for sH1N1 infections and is different to that of seasonal H3N2

infections, which are characterized by a larger proportion of cases occurring in patients older than 60 years [28].

In addition, the follow-up of a population of pregnant women tested during the first term of pregnancy showed that, during the winter 2009 pH1N1 outbreak, the increase of seroprevalence followed that of confirmed cases in the general population. It also revealed that the seroprevalence peaked a few weeks after the peak of confirmed cases and then stabilized at a lower post-pandemic level. This suggests that a number of individuals who had contact with the pandemic virus may have displayed an antibody response detectable by HI, but subsequently reverted to undetectable antibody levels, in agreement with previous studies of natural or vaccinal immunisation [26,29,30]. This implies that post-pandemic serological studies may underestimate the actual number of cases. A similar phenomenon was recently observed during the prospective follow-up of a household cohort in Reunion Island (Dellagi *et al.* submitted data).

The global picture drawn at the end of this study is evocative of that of a classical seasonal H1N1 outbreak. In particular, the low number of cases observed in the elderly may explain the limited over-mortality observed in metropolitan France following the 2009 influenza outbreak. This should not ignore the issue of severe clinical presentations in young and middle-age individuals observed during the 2009 epidemic (which constitute an important difference between this epidemic and the classical epidemiology of seasonal H1N1 influenza) and the need for further identification of the underlying risk factors.

Acknowledgements

This study was supported by grants from (i) the 'Programme de Recherche A (H1N1)' coordinated by the French 'Institut de Microbiologie et Maladies Infectieuses' (IMMI), (ii) the French National Institute for Public Health Surveillance (InVS) and (iii) the EHESP School of Public Health. The authors are indebted to members of the RBML (Réseau de Biologie Moléculaire Libérale) for providing serum samples from pregnant women and to the CNGOF (Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français) for support and advice. They are grateful to Dr J-C Desenclos (InVS) and B. Murgue (IMMI) for supporting the programme in pregnant women, to Pr. EA Gould for critical review of the article, and to S. Romagny and F. Aubry for technical collaboration.

Transparency Declaration

Conflicts of interest: nothing to declare.

References

1. Garten RJ, Davis CT, Russell CA et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 5937: 197–201.
2. Sinha NK, Roy A, Das B, Das S, Basak S. Evolutionary complexities of swine flu H1N1 gene sequences of 2009. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 3: 349–351.
3. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE Jr, Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 2010; 5976: 357–360.
4. CDC. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 19: 521–524.
5. Clark TW, Pareek M, Hoschler K et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *N Engl J Med* 2009; 25: 2424–2435.
6. Dawood FS, Jain S, Finelli L et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 25: 2605–2615.
7. Hancock K, Veguilla V, Lu X et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* 2009; 20: 1945–1952.
8. Nougairède A, Ninove L, Zandotti C et al. Novel virus influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April–August 2009. *PLoS ONE* 2010; 2: e9214.
9. Pascua PN, Song MS, Lee JH et al. Evaluation of the efficacy and cross-protectivity of recent human and swine vaccines against the pandemic (H1N1) 2009 virus infection. *PLoS ONE* 2009; 12: e8431.
10. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 2009; 5934: 1557–1561.
11. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet* 2010; 9720: 1100–1108.
12. Ross T, Zimmer S, Burke D et al. Seroprevalence Following the Second Wave of Pandemic 2009 H1N1 Influenza. *PLoS Curr* 2010; RRN1148, Available at: <http://knol.google.com/k/seroprevalence-following-the-second-wave-of-pandemic-2009-h1n1-influenza#> (last accessed on 17 May 2011).
13. Chen MI, Lee VJ, Lim WY et al. 2009 influenza A(H1N1) seroconversion rates and risk factors among distinct adult cohorts in Singapore. *JAMA* 2010; 14: 1383–1391.
14. Zimmer SM, Crevar CJ, Carter DM et al. Seroprevalence following the second wave of Pandemic 2009 H1N1 influenza in Pittsburgh, PA, USA. *PLoS ONE* 2010; 7: e11601.
15. Skowronski DM, Hottes TS, Janjua NZ et al. Prevalence of seroprotection against the pandemic (H1N1) virus after the 2009 pandemic. *CMAJ* 2010; 17: 1851–1856.
16. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol* 2010; 2: 117–121.
17. Itoh Y, Shinya K, Kiso M et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009; 7258: 1021–1025.
18. Khiabani H, Trifonov V, Rabadan R. Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS Curr* 2009; RRN1008, Available at: <http://knol.google.com/k/reassortment-patterns-in-swine-influenza-viruses> (last accessed on 17 May 2011).
19. Wei CJ, Boyington JC, Dai K et al. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci Transl Med* 2010; 24: 24ra21.
20. Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 48: 20365–20370.
21. Skowronski DM, Hottes TS, McElhaney JE et al. Immuno-epidemiologic correlates of pandemic H1N1 surveillance observations: higher antibody and lower cell-mediated immune responses with advanced age. *J Infect Dis* 2011; 2: 158–167.
22. Labrosse B, Tourdjman M, Porcher R et al. Detection of extensive cross-neutralization between pandemic and seasonal A/H1N1 Influenza Viruses using a pseudotype neutralization assay. *PLoS ONE* 2010; 6: e11036.
23. Nougairède A, Ninove L, Zandotti C et al. Interim report on the A/H1N1 influenza virus pandemic in Marseille, France, April–November 2009. *Clin Microbiol Infect* 2010; 4: 322–325.
24. Adalja AA, Henderson DA. Original antigenic sin and pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* 2010; 6: 1028–1029.
25. Kim JH, Skountzou I, Compans R, Jacob J. Original antigenic sin responses to influenza viruses. *J Immunol* 2009; 5: 3294–3301.
26. Chen MI, Barr IG, Koh GC et al. Serological response in RT-PCR confirmed H1N1-2009 influenza a by hemagglutination inhibition and virus neutralization assays: an observational study. *PLoS ONE* 2010; 8: e12474.
27. Lee VJ, Tay JK, Chen MI et al. Inactivated trivalent seasonal influenza vaccine induces limited cross-reactive neutralizing antibody responses against 2009 pandemic and 1934 PR8 H1N1 strains. *Vaccine* 2010; 42: 6852–6857.
28. Khiabani H, Farrell GM, St George K, Rabadan R. Differences in patient age distribution between influenza A subtypes. *PLoS ONE* 2009; 8: e6832.
29. Kitphati R, Pooruk P, Lertsamran H et al. Kinetics and longevity of antibody response to influenza A H5N1 virus infection in humans. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 7: 978–981.
30. Halliley JL, Kyu S, Kobbie JJ et al. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine* 2010; 20: 3582–3587.

3. Discussion

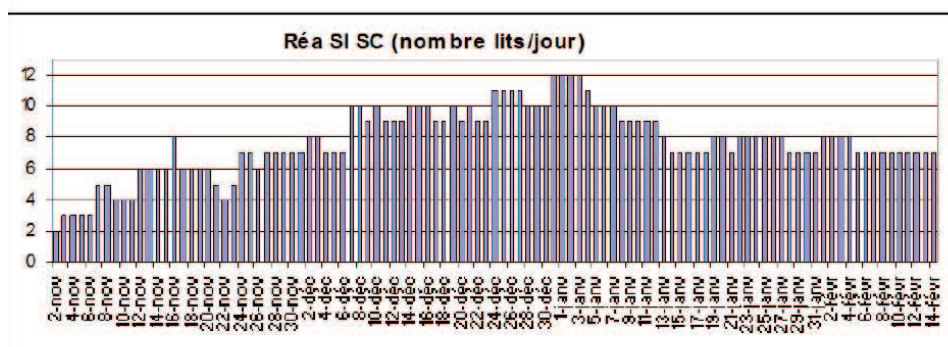
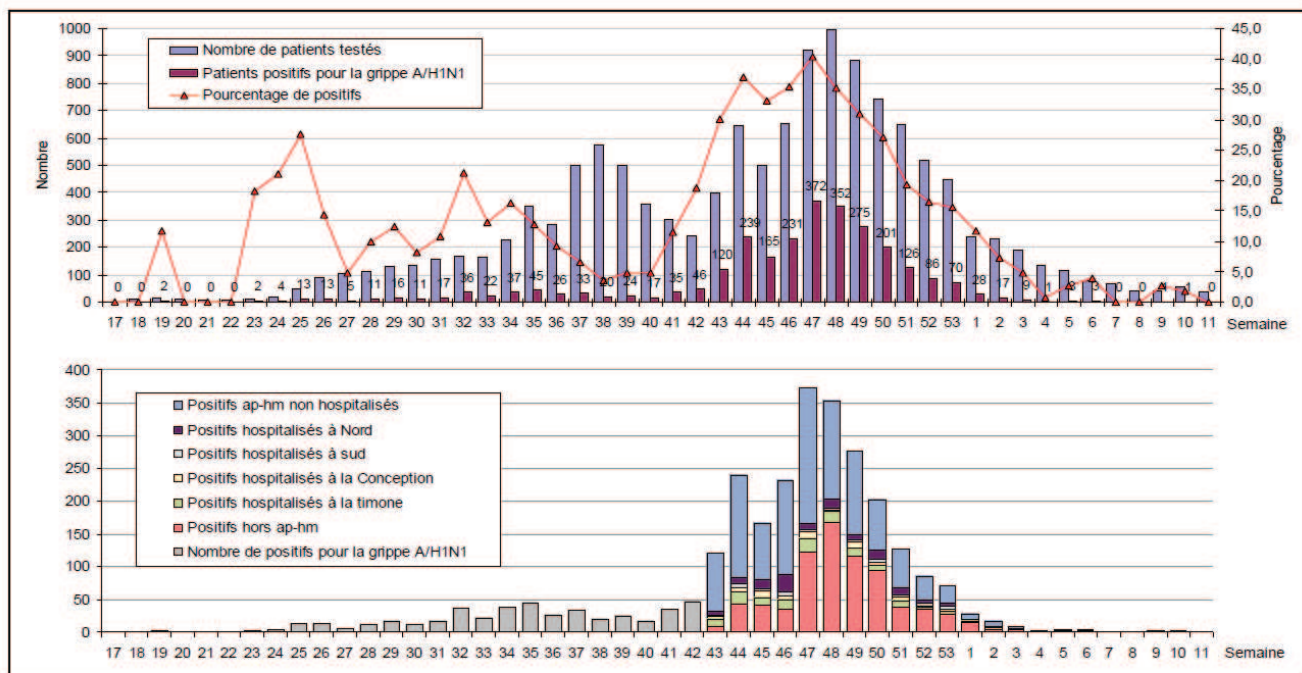
Cette étude montre qu'environ 7.5 millions de personnes ont été infectées par le virus A/H1N1pdm en France en 2009-2010. Parmi elles, 75% avaient moins de 35 ans et moins de 5% d'entre elles avaient plus de 65 ans. Le taux d'attaque global mesuré est de 12%, avec des valeurs autour de 25% chez les enfants et les jeunes adultes. Ces résultats confirment que les enfants ont été un important vecteur du virus durant cette pandémie, ce qui a été le cas également durant les épidémies de grippe saisonnière et les pandémies précédentes (Chin *et al.*, 1960; Collins & Lehmann, 1951; Glezen *et al.*, 1991). De plus, ces résultats ont été confirmés par de nombreuses autres études de séroprévalence menées dans le monde qui montrent toutes que les taux de séroconversion globaux ont été d'environ 10-20% (Bautista *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011a; Maltezou *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Zimmer *et al.*, 2010).

Cette étude confirme qu'une partie de la population était préalablement protégée contre ce nouveau virus. De nombreuses études ont confirmé que les adultes et surtout les personnes âgées étaient partiellement protégées contre ce virus (Dellagi *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2010; McVernon *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Cependant, lorsque l'on regarde plus dans le détail, les résultats des différentes études en termes de pourcentage et de classe d'âge varient beaucoup entre ces différentes études. Ces différences peuvent être dues à des différences méthodologiques : méthodes pour déterminer les seuils de positivité et pour calculer le taux de séroconversion. Nos résultats montrent bien à quel point il est difficile de différencier les anticorps préexistants (contre des virus A/H1N1 circulants auparavant) et des réactions non spécifiques. De plus, la nature des échantillons utilisés (donneurs de sang, sérums des laboratoires d'analyse médicale, études de cohorte etc.) et le design des différentes études peuvent également influencer les résultats (date de collection des sérums). Enfin, la localisation géographique des différentes populations étudiées influence bien entendu également les résultats.

C. Bulletin grippe hebdomadaire du 23 mars 2010

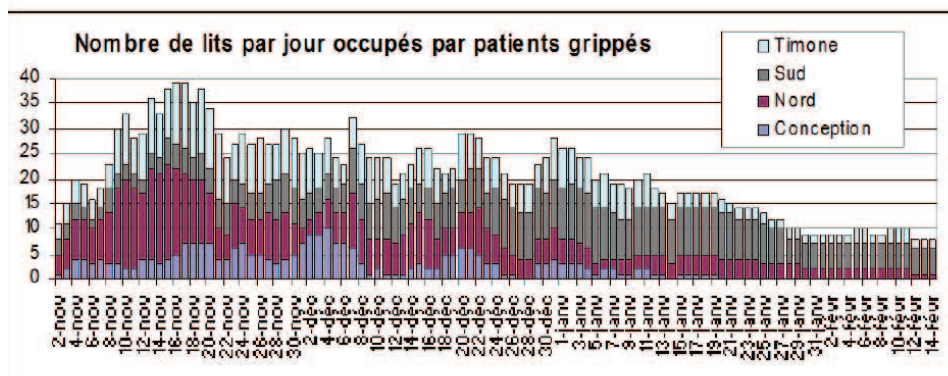
Bulletin grippe A, 23/03/2010

Pôle hospitalier de Microbiologie et Maladies Infectieuses, AP-HM
NOUGAIREDE Antoine



-Semaine 10 (8 au 14 Mars)
1 patient positif à l'AP-HM non hospitalisé.

-Semaine 11 (15 au 21 Mars)
Pas de positif.



-Du 02/11/09 au 14/02/10
294 patients hospitalisés à l'AP-HM, dont 33 (11.2%) hospitalisés en unité de SI/SC/Réanimation (15 à Sud, 10 à Nord, 4 à la Timone et 4 à la Conception). 10 patients sont décédés (3.4% des patients hospitalisés).

D. Point of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.

Nougairede A, Ninove L, Zandotti C, De Lamballerie X, Gazin C, Drancourt M, La Scola B, Raoult D, Charrel RN.

Version publiée dans **PLoS Current Influenza** le 21 septembre 2009.

Fédération de microbiologie, Assistance publique-hôpitaux de Marseille, Marseille, France ;
Unité des virus Emergents, UMR 190 "Emergence des pathologies virales", Université de la Méditerranée & Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France.

Résumé:

In late June 2009, we implemented for public hospitals of Marseille Point Of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus. During two months, we have tested more than 900 specimens in both Point Of Care laboratories. We believe that implementation of Point of Care strategy for the largest number of suspected cases may improve quality of patients care and our knowledge of the epidemiology of the pandemic.



PLoS Curr. 2009 September 21; 1: RRN1039.
doi: 10.1371/currents.RRN1039

PMCID: PMC2762773

Copyright notice

Influenza

Point of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus.

Antoine Nougairède,^{*} Laetitia Ninove,^{*} Christine Zandotti,[‡] Xavier De Lamballerie,^{*} Celine Gazin, Michel Drancourt,[¶] Bernard La Scola,[¶] Didier Raoult,[¶] and Remi N. Charrel

^{*}Fédération de microbiologie, Assistance publique-hôpitaux de Marseille, Marseille, France ; Unité des virus Emergents, UMR 190 "Emergence des pathologies virales", Université de la Méditerranée & Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, France.; [‡]Fédération de microbiologie, Assistance publique-hôpitaux de Marseille, Marseille, France. and [¶]Fédération de microbiologie, Assistance publique-hôpitaux de Marseille, Marseille, France ; Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes UMR CNRS 6236 IRD 3R198, IFR 48, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France.

Accepted September 22, 2009.

This research note is distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 License.

► This article has been updated. "Point of Care Strategy for Rapid Diagnosis of Novel A/H1N1 Influenza Virus" in *PLoS One*, volume 5, e9215.

► This article has been cited by other articles in PMC.

Abstract

In late June 2009, we implemented for public hospitals of Marseille Point Of Care strategy for rapid diagnosis of novel A/H1N1 influenza virus. During two months, we have tested more than 900 specimens in both Point Of Care laboratories. We believe that implementation of Point of Care strategy for the largest number of suspects cases may improve quality of patients care and our knowledge of the epidemiology of the pandemic.

Introduction

In late April 2009, The World Health Organization (WHO) announced the emergence of a novel A/H1N1 influenza virus. This virus spread rapidly, and after two months the WHO raised the alert level from phase 5 to phase 6 defining the first influenza pandemic of the 21st century [1]. At the beginning of the pandemic, some countries established measures to identify all possible cases, but rapidly and due to the constant increase of suspected cases, they decided to stop the systematic screening.

In France, the initial strategy started at the end of April 2009 was relying on the early identification of suspect cases which were directed into the hospital system to be tested for A/H1N1 virus, the positive cases being further hospitalized in isolation ward to prevent secondary transmission. This approach allowed a good knowledge of the kinetics of the pandemic when the large majority of positive cases are acquired abroad. The systematic screening of all suspect cases was stopped the July 7th and replaced by sentinel systems to estimate the number of cases from surveillance of certain populations and to target groups with higher risk of morbidity or mortality [2]. The recent loss of laboratory-confirmed cases has rendered impossible to have now a reliable estimation of the evolution of the pandemic in France. Figures varying from 20,000 (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, France) to 5,000 (Institut de veille sanitaire, France) cases weekly are claimed depending on the source data [3]. The data gathered at the beginning of the pandemic clearly indicate that the positive predictive value of the consultation by general practitioners or infectious diseases specialists is very low (15%). This is a strong argument to maintain laboratory confirmation of A/H1N1 suspect cases to provide solid epidemiological data. Even if there may be bias, the calculated proportion of laboratory-confirmed A/H1N1 cases amongst suspect cases allows to extrapolate the total number of cases occurring during the study period. Because of the innate evolutive nature of an epidemic/pandemic of transmissible disease, this extrapolation must be updated periodically from unambiguous data such as laboratory-confirmed diagnostics.

Moreover to assess influenza morbidity and mortality, the approach based on systematic screening is more efficient than passive methods that produce under-estimate data [4]. Specifically, they cannot consider the role of unrecognized influenza infection as decisive co-morbidity factor in patients with underlying cardiovascular disease, hypertension, chronic pulmonary diseases and endocrine disorders. Therefore passive surveillance tends to hinder the knowledge of epidemiology of this pandemic [4]. Systematic detection for each patient with severe influenza-associated pathology like acute respiratory distress syndrome [5] or for each patient with high mortality risk like pregnant woman [6] may contribute to appreciate the incidence of influenza infection in this specific groups.

In this context, we believe that implementation of a rapid A/H1N1 influenza diagnostic for the largest number of suspects cases may improve the level of quality of patients care, the monitoring of pandemic through the reduction of secondary cases, and our knowledge of the epidemiology of the pandemic.

Point of Care strategy and results

In Marseille, the recent reorganization of the health structures (4 public hospitals) was achieved through a unique core laboratory for Clinical Microbiology. Centralization of laboratories such that they serve several hospitals allow to maximize the efficiency of testing at the lower cost but also have disadvantages like poor communication with clinical physicians and problems of specimens transport [7]. As countermeasures, we decided to build up two Point Of Care (POC) laboratories which are located in the vicinity of emergency units (see Figure 1) permit to shrink delays due to sample transport and to drastically reduce times for results for selected analyses. Open 24h/24 and operated by one person, POC laboratory can perform rapidly a large panel of analyses (see table 1). For selected parameters, the results were confirmed by the core laboratory.

From April 25th 2009 to August 31th, the core laboratory received and processed 1115 samples to be tested for the presence influenza A/H1N1 virus. A total of 236 samples were positive (13%). During the entire period, our laboratory was in charge of testing human samples corresponding to 9 French departments (south-eastern France) representing 1.5 millions of inhabitants. From April 25th and late June, the attitude recommended by the authorities was to test all suspect cases. During this period a maximum of 50 specimens were received weekly. On June 23th 2009, we began to implement the POC strategy for all samples received from Marseille public hospitals, while samples received from hospitals and practitioners outside of Marseille were processed directly in the core laboratory. This strategic change was synchronous with a drastic increase of weekly volume of samples. At this period, about 100-150 samples were received per week until late August which witnessed a novel obvious increase in the activity with 230 and 350 samples for the two latest weeks (see figure 3).

From June 23th 2009 to August 31th 2009, 990 samples were analyzed in POC laboratories (see figure 4). A majority of samples originated from emergency wards (pediatrics and adults) (66.3%) and from the specific influenza consultation located in the North Hospital (19.2%). The respective activity of the two POC laboratories was similar. Each laboratory tested about 30-40 samples per week, but the last two weeks showed an increasing activity with respectively 149 and 191 samples tested (see figure 4).

Among the 990 samples tested in POC laboratories, 21 were positive with rapid ICT. After RNA extraction, some samples were tested directly by the core laboratory. A total of 563 samples were tested using the one step qRT-PCR on SmartCycler, of which 33 (5.9%) were positive. Finally, 65 samples were positives after core laboratory confirmation test (6.6%). Therefore, the sensitivity of POC strategy for A/H1N1 was 63.1% after rapid ICT and 14.6% after qRT-PCR assay. We determined the positive and negative predictive value (PPV and NPV) for each step of POC process (see figure 5).

The number of positive samples fluctuated between weeks but increased during the last two weeks. Percentages also fluctuated but increased during the last four weeks with positive results representing more than 10% of tested specimens.

The time necessary to obtain the results was 1-2h for the 21 samples positives with rapid ICT and 4-7h for the others. Computer-based communication of results allowed to save time dedicated to telephone calls for both physician and POC person.

Discussion

POC strategy for A/H1N1 requires minimal training (1 hour with written protocols), necessitates a small dedicated laboratory area which can be implemented in any hospital settings, and can be operated by one person at the time. It allows diagnosis within the clinical time that can help the decision to treat the patient, to isolate the patient or to discharge the patient. It provides reliable data to timely study the local epidemiology and its evolution. It helps to define and to monitor the epidemiology at a larger scale (regional, national, international) via extrapolation based on the percentage of confirmed cases over suspect cases.

The usefulness of POC strategy in the context of A/H1N1 pandemic proves that POC should be implemented throughout the country not only for emergency situations but also as a daily tool to improve the quality of care for hospitalized patients via shortening the delays and allowing decisions within the clinical time. It is likely that hospitalization costs will also directly benefit from POC strategy, through reduction of the duration of hospitalization as previously demonstrated [10],[11].

The decision to abandon systematic laboratory testing of suspect patients has been equivalent to break the thermometer and to attempt to define body temperature curve. We believe that implementing diagnostic tools for pulmonary infections including flu may allow to fight efficiently this group of diseases that is the more common cause of death worldwide [12] and the most neglected cause of life reduction [13]. In the current situation where less than 10% of tested specimens are found positive, the economic impact of rapid testing through the POC strategy is very important. Indeed, all negative patients - the large majority of suspect patients - can

therefore go back to their professional activities immediately. Beside, readmission of suspect students in the educational course is often conditioned by a certificate assessing the absence of contagiousness, which need to be based on specific virological diagnostic such as implemented in the POC strategy.

Funding information

No specific funding was received for the work presented in this manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Organization, W.H., Statement to the press by WHO Director-General Dr Margaret Chan. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1pandemic_phase6_20090611/en/index.html, 2009.
2. Levy-Bruhl, D. and S.aux, Modified surveillance of influenza A(H1N1)v virus infections in France. *Euro Surveill*, 2009. 14(29).
3. Perez, M. and Miserey, Controverse sur le nombre de cas de grippe A, in *Le Figaro.fr*. 2009 Sep.
4. Hanshaoworakul, W., et al., Severe human influenza infections in Thailand—oseltamivir treatment and risk factors for fatal outcome. *PLoS One*, 2009. 4(6):p. e6051. [PMCID:PMC2699035]
5. Intensive-care patients with severe novel influenza A (H1N1) virus infection - Michigan, June 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009. 58(27):p. 749-52.
6. Jamieson, D.J., et al., H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet*, 2009. 374(9644):p. 451-4.
7. Raoult, D., P.E. Fournier, and M. Drancourt, What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol*, 2004. 2(2):p. 151-9.
8. Ninove, C., et al., A Simple Method for Molecular Detection of Swine-Origin and Human-Origin Influenza A Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2009.
9. WHO, Situation updates - Pandemic (H1N1) 2009 in www.who.int.
10. Woo, P.C., et al., Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(6):p. 1579-81. [PMCID:PMC229791]
11. Ninove, C., et al., Impact of diagnostic procedures on patient management and hospitalisation cost during the 2000 and 2005 enterovirus epidemics in Marseilles, France. *Clin Microbiol Infect.*, in press.
12. Morens, D.M., G. Folkers, and A.S. Fauci, The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, 2004. 430(6996):p. 242-9.
13. Enserink, M., Global health. Some neglected diseases are more neglected than others. *Science*, 2009. 323(5915):p. 700.

Figures and Tables

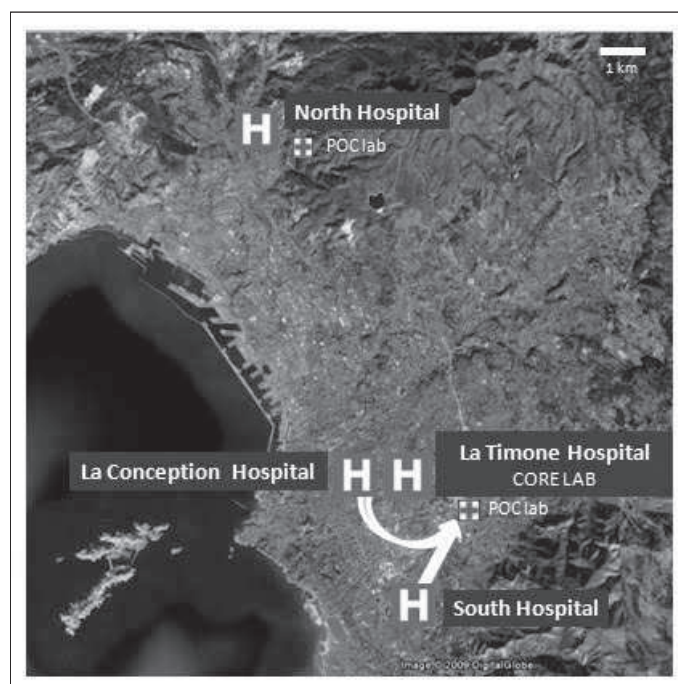


Figure 1 POC laboratories organization in Marseille

	Pathogen agent	Specimen	Test/Target	Time for result
Pharyngitis	Group A Streptococcus	pharyngeal swab	ICT/Antigen	30min
	Epstein Barr Virus	serum	ICT/Antibody	30min
Pneumopathy	Mycoplasma pneumoniae	sputum or nasopharyngeal aspirate	qPCR/Genome	3h30
	Bordetella pertussis	sputum or nasopharyngeal aspirate	qPCR/Genome	3h30
	Legionella pneumophila	urine	ICT/Antigen	30min
	Influenza A/B virus	nasopharyngeal aspirate	ICT/Antigen	30min
	Syncytial respiratory virus	nasopharyngeal aspirate	ICT/Antigen	30min
Diarrhea	Rotavirus and Adenovirus	stool	ICT/Antigen	30min
	Clostridium difficile	stool	ICT/Antigen	30min
Meningitis	Neisseria meningitidis	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3h30
	Streptococcus pneumoniae	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3h30
	Mycoplasma pneumoniae	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3h30
	Herpes Simplex Virus 1/2	Cerebrospinal fluid	qPCR/Genome	3h30
	Enterovirus	Cerebrospinal fluid	qRT-PCR/genome	2h30
	Cryptococcus	Cerebrospinal fluid	ICT/Antigen	45min
Gynecology	Group B Streptococcus	vaginal swab	qPCR/Genome	2h30
	HIV 1/2	serum	ICT/Antibody	30min
Tropical fever	Plasmodium	blood	ICT/Antigen	30min
	Dengue Virus	serum	ICT/Antigen and Antibody	30min
Blood exposure accident	HIV 1/2	serum	ICT/Antibody	30min
Risk of Tetanus	Tetanus	serum	ICT/Antibody	30min
Gastroenterology	Helicobacter pylori	urine	ICT/Antigen	30min
Urinary tract infection	Urinary reactive strip*	stool	colorimetric assay	30min
Procalcitonine	Procalcitonine*	serum	ICT/Antigen	45min
*: non detection of pathogen agent				
ICT: Immuno-Chromatographic test				

Table 1 List of POC analysis.

When secondary cases of influenza A/H1N1 were documented in France, we decided to implement rapid diagnosis of pandemic A/H1N1 virus in POC laboratory to investigate the level of virus circulation. Both POC laboratories were adapted to manage specimens processing in appropriate biosafety conditions, and to perform A/H1N1 virus detection via immuno-chromatographic tests (ICT) and one step qRT-PCR on SmartCycler (Cepheid). POC manipulators were trained to perform these analyses and to work with class II pathogen agents (see figure 2). For PCR testing we selected the qRT-PCR assay recommended by the French Influenza Reference National Center which was adapted to be run on SmartCycler. In parallel, all specimens were spiked with an internal control which allowed to monitor all steps through specific qRT-PCR detection. Comparative evaluation with the same protocol operated onto thermocycler M3005P (stratagene) showed a lower sensitivity for low copy number specimens, but no significant difference in term of specificity. The core laboratory was processing all samples received at POC laboratories with (i) the qRT-PCR A/H1N1 assay aforementioned and (ii) a qRT-PCR SBR Green system which detect all Influenza A viruses [1]. Both reactions were performed onto either Mx3005p thermocycler (Stratagene) or C40 thermocycler (Roche). The maximal flow capacity (upper limit) of the POC laboratory for detection of A/H1N1 virus is 36 samples per day (see figure 2).

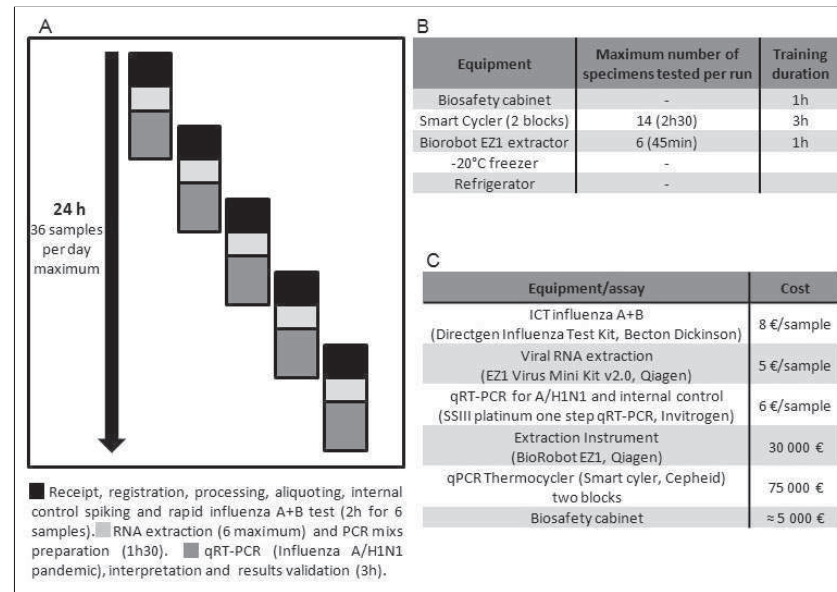
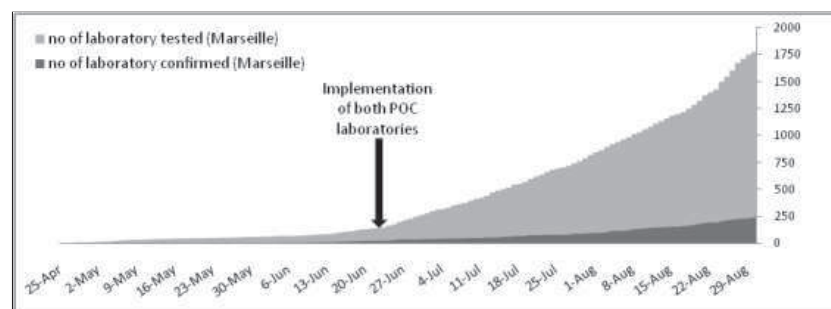


Figure 2 Flow capacity in POC lab for detection of Influenza A/H1N1 pandemic virus (A), and equipment/cost required for POC lab (B,C).



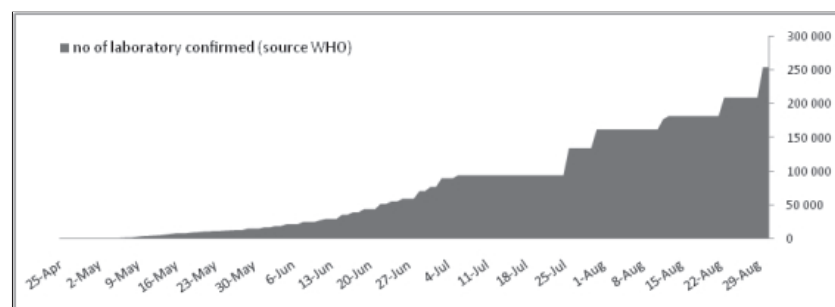


Figure 3 Cumulative number of laboratory confirmed cases of Influenza A/H1N1 pandemic infection announced by WHO [9](panel 1) and observed in Marseille virology laboratory (panel 2).

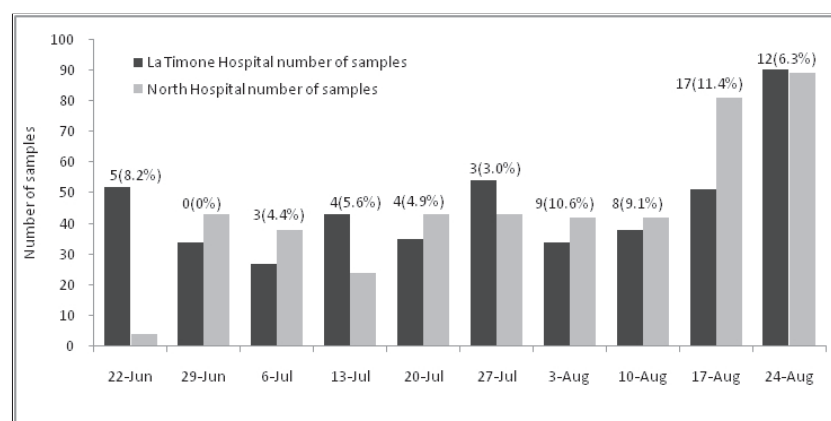


Figure 4 Time distribution of samples tested for each POC. The number upon the bar chart represents the number of positive samples (% of positives samples).

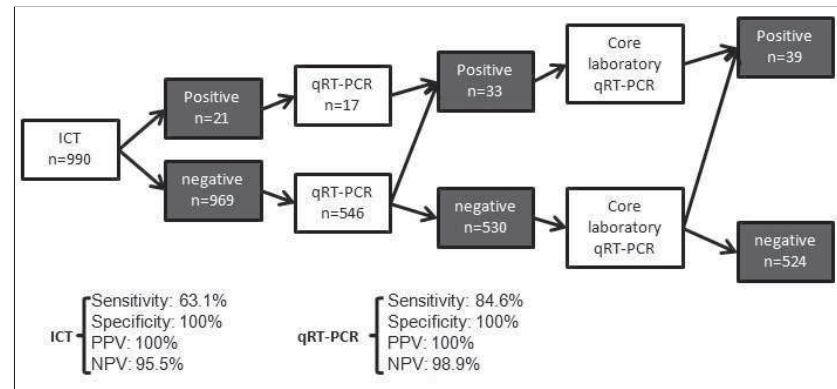


Figure 5 Flow chart of POC samples with sensitivity, specificity, PPV and NPV of each step.

Articles from *PLoS Currents* are provided here courtesy of



Résumé:

Fin avril 2009, un nouveau virus grippal A/H1N1 d'origine porcine émerge dans le monde causant la première pandémie grippale du XXI^{ème} siècle. Les différents travaux présentés dans cette thèse retracent la gestion de cette situation au laboratoire de virologie des hôpitaux publics de Marseille. D'avril 2009 à avril 2010, nous avons analysé plus de 13 000 prélèvements issus de cas suspects. Nous avons dû adapter continuellement les moyens mis en œuvre pour effectuer le diagnostic et la mise en place d'une stratégie 'Point of Care' s'est avérée très utile. Nos résultats montrent que l'usage des tests rapides en complément de la RT-PCR en temps réel permet de réduire significativement le délai de rendu des résultats pour les patients infectés. Les données épidémiologiques sur les nombreux cas suspects dépistés ont également permis d'obtenir en temps réel des informations précieuses sur l'épidémiologie de cette pandémie comme l'estimation de l'incidence par classe d'âge, la proportion de patients hospitalisés et la mortalité. Enfin, nous avons réalisé une étude de séroprévalence qui montre qu'environ 12% de la population française a été infectée par ce nouveau virus en 2009-2010 et que les taux d'attaque les plus élevés ont été observés chez les enfants et les jeunes adultes.

Mots clés : Grippe, virus grippal A, pandémie, H1N1, 2009, diagnostic, PCR en temps réel, test rapide, point of care, épidémiologie, hospitalisation, mortalité, séroprévalence, taux d'attaque.

Abstract:

In late April 2009, a new swine-origin A/H1N1 Influenza virus emerged and spread rapidly worldwide causing the first influenza pandemic of the 21st century. This work describes how we coped with this emergency situation in the virology laboratory of Marseille public hospitals. From April 2009 to April 2010, we analyzed more than 13,000 samples from suspected cases. We needed to adapt continuously the organization to maintain diagnostic capacity and the implementation of a point of care strategy revealed very useful to achieve this goal. Our results support the use of rapid Influenza detection tests in combination with real-time RT-PCR because it reduces significantly the delay from sample to result for positive cases, thus giving the opportunity to improve patient management. Epidemiological data from all suspected cases tested allowed us to obtain timely precious information about the epidemiology of this pandemic as the estimation of (i) the incidence by age group, (ii) the rate of hospitalization and (iii) the mortality rate among tested patients. Finally, we set up a serological study and showed that around 12% of the French population had been infected by this new virus in 2009-2010 with higher attack rates observed in children and young adults.

Keywords : Flu, Influenza A virus, pandemic, H1N1, 2009, diagnosis, real time PCR, rapid influenza detection test, point of care, epidemiology, hospitalization, mortality, seroprevalence, attack rate.