

Rapport annuel d'activité

2019

**Centre National de Référence de la
coqueluche et autres bordetelloses**

**Année d'exercice
2018**



TABLE DES MATIERES

1 Missions et organisation du CNR	6
2 Activités d'expertise	6
2.1 Évolutions des techniques	6
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	7
2.4 Collection de matériel biologique.....	7
2.5 Présentation des activités d'expertise de l'année 2018	7
2.5.1 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR	7
2.5.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2018	8
2.5.3 Niveau de caractérisation des isolats	10
2.5.4 Nombre de PCR et de sérologies réalisées en 2018	10
2.5.4 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA	10
2.5.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux	11
2.6 Activités de séquençage.....	12
3 Activités de surveillance	14
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	14
3.1.1 Surveillance de la coqueluche	14
3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche.....	19
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	20
3.3 Participation aux réseaux de surveillance	20
3.3.1 Europe.....	20
3.3.2 Autre international	20
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	21
4 Alerte.....	21
5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil	22
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	22
6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	23
6.1 Description des activités de recherche en cours notamment uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.	23
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	24
6.2.1 Publications internationales	24
6.2.2 Communications internationales	25
6.2.3 Communications nationales	25
7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux....	25
8 Programme d'activité pour les années suivantes (N+1 et N+2).....	25
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	27
1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR	27
1.2 Organisation du CNR	Erreur ! Signet non défini.
1.3 Locaux et équipements	Erreur ! Signet non défini.
1.4 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence	Erreur ! Signet non défini.
1.5 Description de la démarche qualité du laboratoire	27
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	30
2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux.....	30
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	32

Liste des abréviations/acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANP	Aspiration naso-pharyngée
ARS	Agence Régionale de Santé
BGS	Bordet Gengou au sang
Col.BVH	Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France
CgMLST	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
CQ	Contrôle Qualité
Ct	"Cycle Threshold" ou Cycle seuil
DROM/DOM	Département Régional d'Outre Mer/ Département d'Outre Mer
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
ECP	Electrophorèse en champs pulsés (PFGE est l'acronyme anglais)
EQA/CEQ	External Quality Assessment - Contrôle externe de la Qualité
HCSP	Haut Comité de Santé Publique
LABM	Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale
LREMS	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site
MALDI-TOF	Spectromètre de masse à temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight)
PCR	Polymerase chain reaction (amplification en chaîne par polymérase)
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel (ou quantitative)
RENACQ	REseau National de la COQueluche
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (mutation ponctuelle : polymorphisme nucléotidique simple)
SMQ	Système de Management de la Qualité
SpF	Santé publique France
SPG/BSA	Saccharose Phosphate Glutamate/Bovine Serum Albumine

Résumé analytique

La coqueluche reste un défi de santé publique important en France comme partout dans le monde. Le Centre National de Référence (CNR) a pour mission principale de contribuer au volet microbiologique de la surveillance de cette infection en France. En 2018, le nombre d'isolats reçus au CNR reste faible, reflétant probablement une situation de creux entre deux cycles épidémiques, ou un pic épidémique modéré. La proportion d'isolats de *Bordetella pertussis* qui ne produisent pas la pertactine est stable depuis 2 ans (52% en 2017, 48% en 2018), ainsi que les autres caractéristiques des souches. Une souche ne produisant ni la toxine de pertussis ni la pertactine a néanmoins été observée pour la première fois en France.

Analytical Summary

Pertussis remains a major public health challenge in France and around the world. The main mission of the National Reference Centre (NRC) is to contribute to the microbiological component of the surveillance of this infection in France. In 2018, the number of isolates received by the NRC remains low, possibly corresponding to a gap between two epidemic cycles, or a moderate epidemic peak. In addition, the proportion of *Bordetella pertussis* isolates that do not express pertactin is stable (52% in 2017, 47% in 2018), as are the other characteristics of the isolates. Notably, one isolate that produce neither the pertussis toxin nor pertactin, was isolated for the first time in France.

Introduction

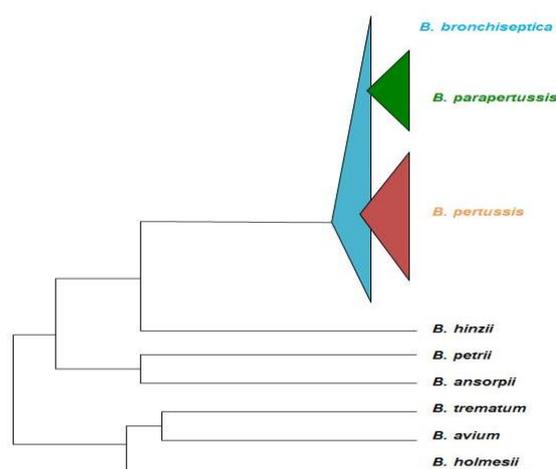
Les bordetelles sont classées en plusieurs espèces (Figure 1) : Quatre d'entre elles infectent l'homme plus fréquemment : *B. pertussis* et *B. parapertussis*, les agents de la coqueluche ; mais aussi *B. holmesii*, agent de bactériémies chez les sujets immunodéprimés en particulier aspléniques, et pouvant aussi être détecté lors d'un syndrome coqueluchoïde ; puis *B. bronchiseptica*, qui peut infecter plusieurs espèces de mammifères et induire chez l'homme immunodéprimé des bactériémies ou des infections respiratoires. *B. avium* et *B. hinzii*, infectent principalement les oiseaux sauvages et volailles; *B. ansorpii* et *B. trematum* infectent l'homme de manière anecdotique. Enfin, *B. petrii* est une bactérie de l'environnement qui peut induire, bien que rarement, une infection respiratoire persistante chez l'homme.

De nouvelles espèces de *Bordetella*, très rares, ont été récemment identifiées et ne sont pas représentées dans la Figure 1. Elles ont été collectées :

- ✓ Chez l'homme (Vandamme et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65 (10)) : *Bordetella bronchialis*, *Bordetella sputigena*, *Bordetella flabilis* ;
- ✓ Chez des souris de laboratoire (Ivanov et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66(12):5452-5459) : *Bordetella pseudohinzii* ;
- ✓ Sur une tapisserie de plus de 1300 ans (Tazato et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2015 Dec; 65(12):4830-8) : *Bordetella muralis*, *Bordetella tumulicola* et *Bordetella tumbae*.

Figure 1. Modèle des relations phylogénétiques des espèces du genre *Bordetella*.

B. pertussis et *B. parapertussis* ont évolué à partir de lignées appartenant à l'espèce *B. bronchiseptica*



Les facteurs de virulence exprimés par les trois espèces classiques du genre *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*) sont classés en (i) adhésines, qui permettent l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte, et (ii) toxines, qui induisent des effets cytopathogènes.

Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse FHA, les protéines fimbriales FIM2 et FIM3 et la pertactine PRN.

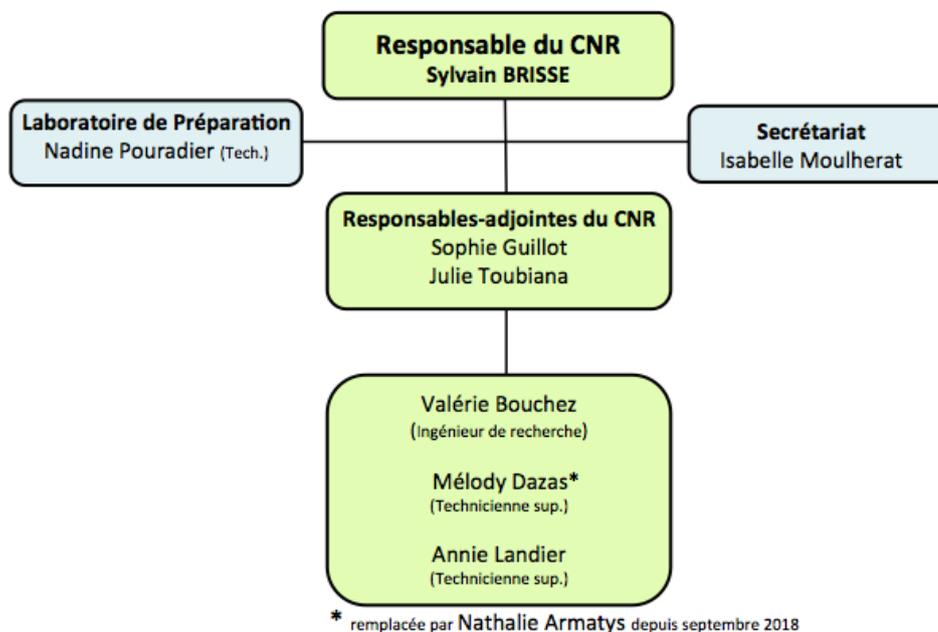
Les principales toxines sont :

- la toxine de pertussis PT, toxine ADP-ribosylante, produite seulement par *B. pertussis*
- l'adényl cyclase-hémolysine AC-Hly, toxine RTX,
- la toxine BteA (effecteur du système de sécrétion III),
- la toxine demonécrotique TDN, et la toxine cytotrachéale TCT.

Seule la toxine PT et les adhésines FHA, PRN, Fim2 et Fim3 entrent dans la composition de vaccins sous-unitaires. Une évolution des populations de *B. pertussis* vers un échappement à la pression de sélection exercée par l'immunité vaccinale a été mise en évidence par de nombreux travaux, dont ceux du CNR. Cette évolution se traduit par une divergence antigénique par rapport aux variants des antigènes utilisés dans les vaccins, ou par la perte d'expression de certains antigènes (notamment PRN). Il est donc important de surveiller ce phénomène, qui impacte potentiellement l'efficacité vaccinale.

1 Missions et organisation du CNR

Le CNR est hébergé au sein de l'unité de recherche « Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, créée en juillet 2017 et placée sous la responsabilité de Sylvain Brisse. Cette équipe assure seule les missions de CNR : il n'y a pas de laboratoire associé. L'organigramme de l'équipe du Centre National de Référence (CNR) est présenté ci-dessous :



Les missions générales du CNR de la coqueluche et autres bordetelloses comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Ces missions sont détaillées plus spécifiquement en **Annexe 1**.

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en **Annexe 2**.

Éléments clés de l'expertise en 2018 :

Nous poursuivons notre expertise microbiologique dans le cadre de la surveillance de la coqueluche en France et en Europe (réseau RENACOQ, PERTINENT). Une extension dans le cadre du réseau SENTINELLES se met en place.

En 2018, nous avons fourni une expertise et un transfert de technologie dans le cadre de la recrudescence de la coqueluche à Mayotte et à Bangui (République Centrafricaine).

2.1 Évolutions des techniques

Depuis 2018 nous utilisons en routine l'approche de génotypage par *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST), qui est basée sur la variation de séquence nucléique de 2038 gènes présents dans la majorité des souches de l'espèce *B. pertussis*. Nous avons montré que cette approche permet de déterminer avec une bonne probabilité, l'appartenance de souches à la même chaîne de transmission (cas groupés familiaux). Nous avons mis en place un site web dédié à la comparaison internationale des souches par cette approche : <http://bigsd.bpasteur.fr/bordetella/bordetella.html>. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans Emerging

Infectious Diseases en juin 2018 (se reporter à la section 6.2.1). De plus en 2019, notre laboratoire est devenu curateur du site web pubmlst *Bordetella* de l'université d'Oxford (<https://pubmlst.org/bordetella/>).

Depuis 2017, le génotypage des facteurs de virulence et en particulier du gène de la pertactine sont réalisés par analyse des séquences génomiques générées par la technologie Illumina, en remplacement des approches PCR en point final et du séquençage Sanger précédemment employées.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2018, nous avons évalué la trousse « VIASURE *Bordetella* (fabriquant CerTest) » commercialisée par la société Orgentec. Le coffret permet la détection multiplexée en temps réel de l'ADN de *Bordetella* à l'aide des cibles IS481 (détecte l'ADN de *B. pertussis*, de *B. holmesii* et de certaines *B. bronchiseptica*), IS1001 (détecte l'ADN de *B. parapertussis*, et de certaines *B. bronchiseptica*) et h-IS1001 (détecte l'ADN de *B. holmesii*). Le coffret contient également un contrôle cellulaire humain (abrégié : ICI). L'utilisation de la trousse VIASURE avec notre thermocycleur LC480 de Roche nécessitait la mise en place d'un fichier de compensation de couleur qui permet d'éliminer les fluorescences croisées.

Nous avons testé différents échantillons d'ADN extraits de prélèvements respiratoires humains ainsi que des contrôles internes de qualité. Des difficultés d'interprétation se sont présentées avec la cible h-IS1001 pour des échantillons qui ne contiennent pas l'ADN de *B. holmesii* mais pour lesquels des valeurs de Ct ont été obtenues malgré une courbe d'aspect aplati. Cela pourrait être la conséquence d'une compensation non optimale lors de l'analyse avec le logiciel du thermocycleur de ROCHE. Des échanges ont eu lieu avec la société qui commercialise la trousse et il a été convenu que le fabricant CerTest améliore le paramétrage pour la mise en place du fichier de compensation de couleur sur LC480. Les tests pourront reprendre après la mise place d'un fichier de compensation optimisé. Ce problème de compensation de couleur ne concerne pas tous les thermocycleurs.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous envoyons systématiquement les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou PCR) aux laboratoires hospitaliers ou LABM qui en font la demande.

Nous avons continué à interagir avec le laboratoire du CHU de Mayotte qui a récemment mis en place la qPCR et la culture pour le diagnostic de la coqueluche. En octobre 2018, le laboratoire mahorais nous a envoyé ses premiers échantillons positifs (extraits d'ADN, prélèvements et souches) pour vérification. Nous avons confirmé les 2 cas d'infection à *Bordetella pertussis* (fratrie : mère et enfant) et un cas d'infection à *Bordetella parapertussis* (autre foyer). Fin décembre 2018, nous avons envoyé au biologiste du laboratoire mahorais un contrôle externe de qualité (CEQ) afin d'évaluer les capacités du laboratoire à identifier correctement les 5 échantillons composant le panel. Il a été convenu que les échantillons du CEQ seront analysés en 2019.

2.4 Collection de matériel biologique

Mises en collection : En 2018, nous avons stocké 87 isolats, décrits dans la section 2.5.2.

Distribution de souches : En 2018, nous avons distribué 20 souches.

Distribution d'ADN : nous avons envoyé des ADN (contrôles positifs de PCR) à Mayotte et à Bangui.

2.5 Présentation des activités d'expertise de l'année 2018

2.5.1 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR

Les échantillons biologiques reçus pour expertise par le CNR comprennent des isolats cliniques et des prélèvements biologiques (aspirations ou écouillons naso-pharyngés, expectorations, sérums, ADN extraits de prélèvements respiratoires) qui proviennent essentiellement de :

- ✓ patients infectés par *B. pertussis* hospitalisés et dont les échantillons sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOQ ;
- ✓ patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) ;
- ✓ patients ou animaux infectés par *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de Bordetelles et envoyées, le plus souvent, par les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France ;

Par ailleurs, l'unité de recherche reçoit des prélèvements dans le cadre de la surveillance organisée via le réseau ACTIV (qui ne sont pas comptabilisés dans les tableaux et figures de ce rapport).

2.5.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2018

En 2018, nous avons reçu 85 isolats du genre *Bordetella*, 2 prélèvements positifs à partir desquels nous avons obtenu une culture positive (soit **87 isolats**) et 133 prélèvements ou ADN extraits sur lesquels des PCR ont été réalisées afin de vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce de *Bordetella*. Parmi ceux-ci, figurent notamment des échantillons reçus dans le cadre du projet PERTINENT (voir section 3.3.1).

Parmi les 133 prélèvements ou ADN extraits analysés, nous avons obtenu (hors doublons) 90 PCR positives à *Bordetella pertussis*, 3 PCR positives à *Bordetella parapertussis*, 1 PCR positive à *Bordetella bronchiseptica* et 15 PCR positives à *Bordetella*.

Les isolats, isolés ou reçus pour confirmation de l'identification au CNR en 2018, sont présentés dans le **Tableau** ci-après.

Tableau 1 : Nombre d'isolats reçus ou isolés au CNR en 2018

Source	Espèces	2018
RENACOQ	<i>B. pertussis</i>	53
	<i>B. parapertussis</i>	5
HORS RENACOQ (dont Col.BVH)	<i>B. pertussis</i>	12*
	<i>B. parapertussis</i>	1*
	<i>B. bronchiseptica</i>	7
	<i>B. holmesii</i>	6
	<i>B. hinzii</i>	1
	<i>B. trematum</i>	1
LABM	<i>B. bronchiseptica</i>	2
	<i>B. petrii</i>	1
Total		87

* = 2 isolats de *B. pertussis* et 1 *B. parapertussis* en provenance de Mayotte (DROM)

Les résultats des caractérisations sont résumés ci-dessous.

- *B. pertussis* et *B. parapertussis* :

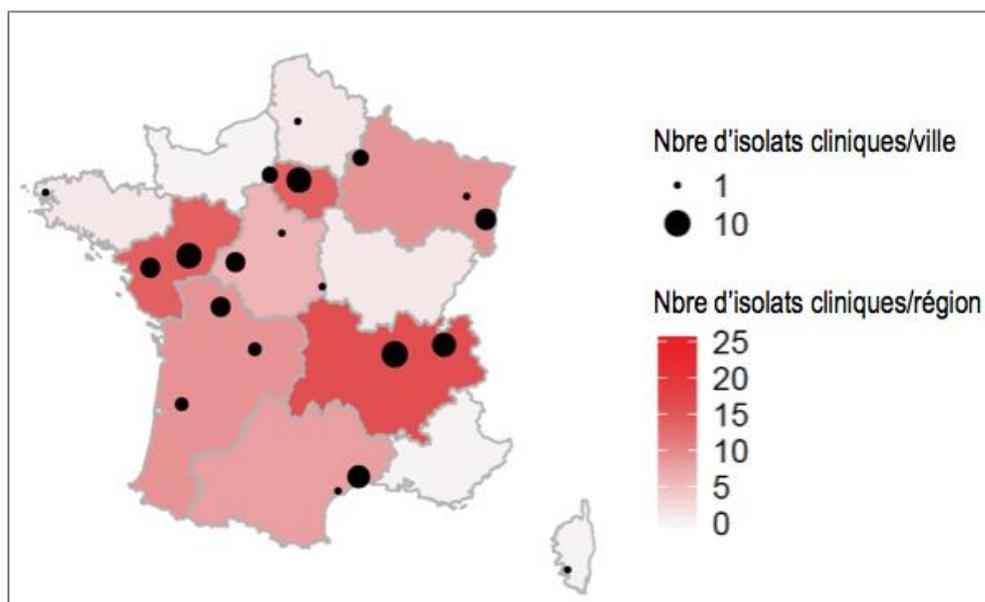
- 63 isolats de *B. pertussis* pour lesquels 84% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ. Les autres isolats ont été envoyés par les hôpitaux d'Annecy (x7), de Poitiers (x1), de Poissy (x1), et du Kremlin Bicêtre (x1). De plus, 2 isolats de *B. pertussis* (collectés chez une mère et son bébé soit 1 souche) ont été envoyés par le laboratoire de l'hôpital de Mamoudzou à Mayotte. Soit un total de **64 souches** de *B. pertussis* collectées en 2018.
- Nous avons reçu 6 isolats de *B. parapertussis* dont 5 en provenance du réseau RENACOQ et 1 en provenance de l'hôpital de Mamoudzou à Mayotte.

- Autres espèces du genre *Bordetella* :

- Les isolats reçus ont été la plupart en provenance du collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux de France :
 - 7 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance des hôpitaux d'Annecy, de Lyon, de Saint Quentin, de Nevers, de Poitiers, et également en provenance de LABM de Boujan-sur-Libron et de Lunéville;
 - 6 isolats de *B. holmesii* en provenance des hôpitaux du Kremlin Bicêtre, de Lyon, de Poissy, de Saint pierre de la Réunion (DOM) et de l'hôpital parisien Bichat
 - 1 isolat de *B. hinzii* en provenance de l'hôpital de Poitiers
 - 1 isolat de *B. trematum* en provenance de l'hôpital d'Orléans
 - 1 isolat de *B. petrii* en provenance de l'hôpital d'Ajaccio

La répartition des isolats, toutes espèces du genre *Bordetella* confondues, envoyés par les correspondants du CNR est présentée dans la **Figure 2**.

Figure 2. Répartition géographique des isolats de Bordetelle envoyés au CNR en 2018



2.5.3 Niveau de caractérisation des isolats

- Vérification de la production par les isolats, des protéines impliquées dans la virulence et présentes dans les vaccins sous unitaires (pertactine, toxine de pertussis, hémagglutinine filamenteuse) par immuno-empreinte ;
- Sérotypie des protéines fimbriales (FIM2, FIM3) par agglutination et le cas échéant, par immunofluorescence ;
- Génotypage des gènes qui codent pour la pertactine (*prn*), pour la sous-unité 1 de la toxine de pertussis (*ptxA*), ainsi que de la région promotrice de la toxine pertussis (*ptxP*), et pour les protéines fimbriales (*fim2* et *fim3*);
- Typage des isolats par séquençage génomique (approche cgMLST).

2.5.4 Nombre de qPCR et de sérologies réalisées en 2018

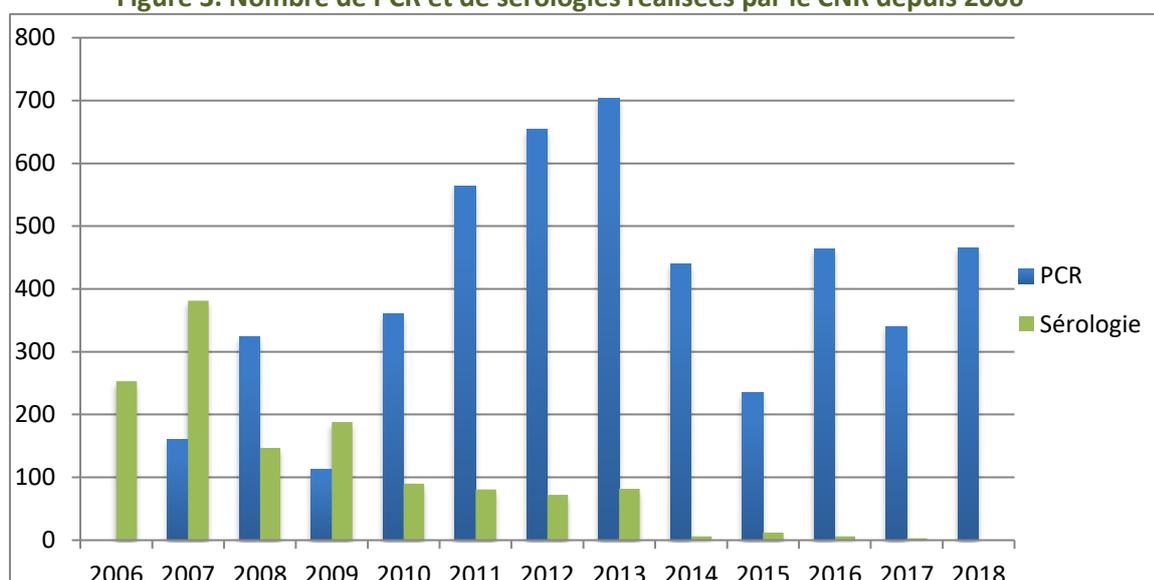
- Le nombre de qPCR effectué par le CNR en 2018 est présenté dans le **Tableau 2**. Pour un échantillon donné, plusieurs qPCR peuvent être réalisées (se reporter à la liste détaillée des cibles PCR dans l'annexe 2) Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance RENACOQ dont l'étude PERTINENT, la demande des ARS (notamment lors de cas groupés de coqueluche dans une école), et dans le cadre du contrôle externe de qualité (QCMD BPDNA2018).

Tableau 2 : Nombres de qPCR réalisées en 2018

Type de qPCR	2018
Surveillance Renacoq dont l'étude PERTINENT	319
Cas groupés	47
Contrôle Externe de Qualité	36
Test trousse diagnostic multiplexée	64
Total	466

- La **Figure 3** montre l'évolution du nombre de PCR et sérologies réalisées par année de 2006 à 2018. On observe que le nombre de sérologies à visée diagnostic demandées au CNR a très nettement diminué depuis 2014. Cette évolution est en accord avec les recommandations du HCSP (http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf).

Figure 3. Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR depuis 2006



2.5.4 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA

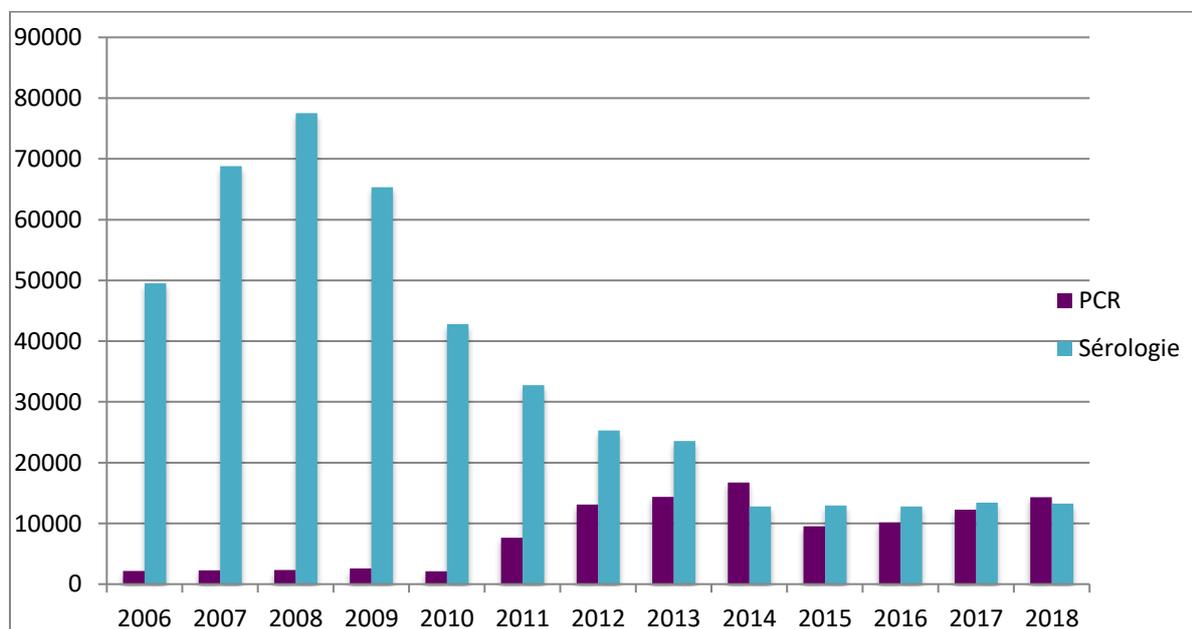
A notre demande, nous recevons chaque année du laboratoire CERBA le nombre annuel de PCR et de sérologies réalisées (et le nombre de résultats positifs). Ces données contribuent à suivre l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France et à la surveillance.

Le nombre de PCR réalisées par ce laboratoire en 2018 est de 14325 ; il a légèrement augmenté par rapport à 2017 (n =12266) (**Figure 4**).

Sur ces 14325 PCR, 8,9% étaient positives pour le genre *Bordetella*, indiquant une diminution de la proportion de PCR positives en 2018 par rapport à 2017 (14,3%). Pour rappel, le pourcentage de PCR positives de 2017 reflétait de ce qui avait été observé dans certaines régions françaises à partir du mois de mars avec une augmentation du nombre de PCR positives et ce jusqu'en juin 2017 puis une diminution cours des 3 derniers mois de l'année, le pourcentage moyen de PCR positives ayant redescendu à 7%.

Les demandes de sérologies adressées au laboratoire CERBA sont de 13246 en 2018 (**Figure 4**).. Depuis 2014, le nombre de sérologies est stable et il fait suite aux recommandations du HCSP indiquant que la sérologie n'a plus sa place dans la stratégie diagnostique de la coqueluche en pratique courante. (hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf).

Figure 4. Nombre de PCR et sérologies réalisées par le laboratoire CERBA, 2006-2018.



2.5.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux

Tous les isolats reçus au CNR ont été testés vis-à-vis des macrolides, antibiotiques qui sont recommandés pour le traitement de la coqueluche ou dans le cadre d'une antibioprofylaxie lors de cas groupés de coqueluche.

2.6 Activités de séquençage

✓ Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

OUI, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR. La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina ; la plateforme prend en charge la fabrication des librairies et le séquençage. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500.

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

Les CNR ont accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Depuis 2018 notre CNR est largement autonome pour l'analyse des séquences génomiques.

✓ Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...

Nous utilisons une combinaison d'outils bioinformatiques en ligne de commande UNIX et en interface graphique. Les outils les plus utilisés sont la plateforme BIGSdb (pour le génotypage cgMLST), et BLASTN (extraction des gènes de virulence pour le génotypage).

✓ Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

OUI, nous surveillons les génotypes des souches (séquençage génomique puis extraction des informations en relation avec la perte de production de la pertactine, et génotypage des antigènes vaccinaux).

✓ Si OUI, pour quelles activités :

- Investigations d'épidémies ?

Nos méthodes de génotypage cgMLST nous permettent de tester l'hypothèse que certaines souches sont reliées épidémiologiquement (cas groupés).

- Surveillance ?

Nous génotypons les souches pour surveiller l'émergence de lignées particulières.

- Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, sérotype/sérogroupe prédiction, résistome prédiction, analyse phylogénétique...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles).

Typiquement, les séquences sont assemblées (logiciel SPAdes) puis l'allèle des 2038 gènes du schéma cgMLST (Bouchez et al., EID 2017) est déterminé en utilisant notre base de données d'allèles sur l'application informatique BIGSdb ; une classification phylogénétique avec les séquences présentes dans la base de données des génomes peut ainsi être réalisée à la demande.

Nous déterminons également le statut intègre ou non du gène de la pertactine (PRN) et les allèles des antigènes impliqués dans les vaccins. Nous procédons à l'analyse génomique du gène de la pertactine, en particulier, pour comprendre les bases génétiques chez les isolats de *B. pertussis* ne produisant pas plus cet antigène. Nous constituons ainsi une base de données génomiques pour les isolats de *B. pertussis* PRN-.

- Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année.

En 2018, nous avons poursuivi les investigations génomiques suite à l'observation d'un léger pic sur le printemps été 2017.

- Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :
 - Nombres de séquences réalisées dans l'année : 87
 - Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées : Aucune sélection - Séquençage exhaustif.
- Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files) :

A l'occasion de nos publications nous déposons les séquences au format fastq dans ENA, et les assemblages sont rendus publics dans notre plateforme BIGSdb (<http://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/bordetella.html>).

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2018, nous avons poursuivi nos collaborations avec :

- Santé publique France et les 42 hôpitaux du réseau RENACOQ (Réseau hospitalier, initié en 1996). Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.
- Le Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France

En 2016, nous avons participé à la rédaction du protocole de surveillance des cas confirmés de coqueluche en population générale menée par le réseau Sentinelles, en partenariat avec SpF et le CNR. La surveillance a commencé en janvier 2017 et une réunion présentant les premiers résultats s'est déroulée le 15 mai 2018.

Au titre de l'unité de recherche, nous participons de plus :

- Au réseau ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne), réseau de 55 pédiatres en ambulatoire.

3.1.1 Surveillance de la coqueluche

Afin de fournir une perspective historique, l'évolution du nombre d'isolats par espèce de *Bordetella* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans les **Figures 5a** et **5b**.

En 2018, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et *B. parapertussis*. L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles de 3 à 5 ans. Le dernier pic épidémique a eu lieu en France en 2012 – 2013 (**Figure 5a**).

B. pertussis : Le nombre de souches de *B. pertussis* (n = 64, avec Mayotte), voir **Tableau 1** en 2018 est stable par rapport à 2017, et peu élevé par rapport au dernier pic épidémique (**Figure 5a**).

B. parapertussis, le second agent de la coqueluche, montre une incidence qui reste faible par comparaison avec celle de *B. pertussis*. En 2018, le nombre de souches de cette espèce est de 6 dont 1 en provenance de Mayotte (**Figure 5a**). En 2017, une souche avait été isolée à partir d'une hémoculture effectuée chez un enfant de 3 ans originaire d'Algérie avec fièvre et notion de toux, hospitalisée dans un hôpital parisien. Il est très rare d'isoler une *Bordetella parapertussis* du sang et les investigations sur ce cas ont donné lieu à une publication qui vient d'être acceptée dans le journal *Open Forum Infectious Diseases* (Toubiana *et al.*, 2019 *in press*).

Tendances :

La stabilité du nombre d'isolats de *Bordetella pertussis* isolés ou reçus au CNR en 2018 par rapport à 2017 reflète soit une situation de creux entre deux pics épidémiques de coqueluche, soit un pic 2017-2018 modéré par rapport aux pics précédents. Les nombres de cas des années suivantes permettront de distinguer ces deux possibilités.

Figure 5a : Nombre d'isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR depuis 1995

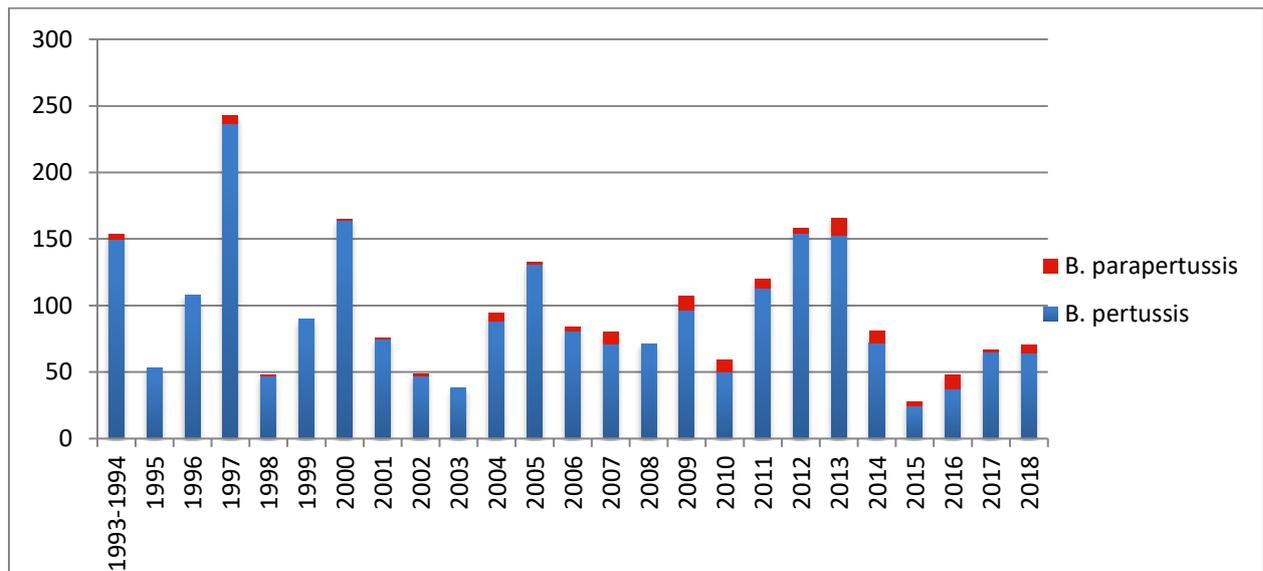
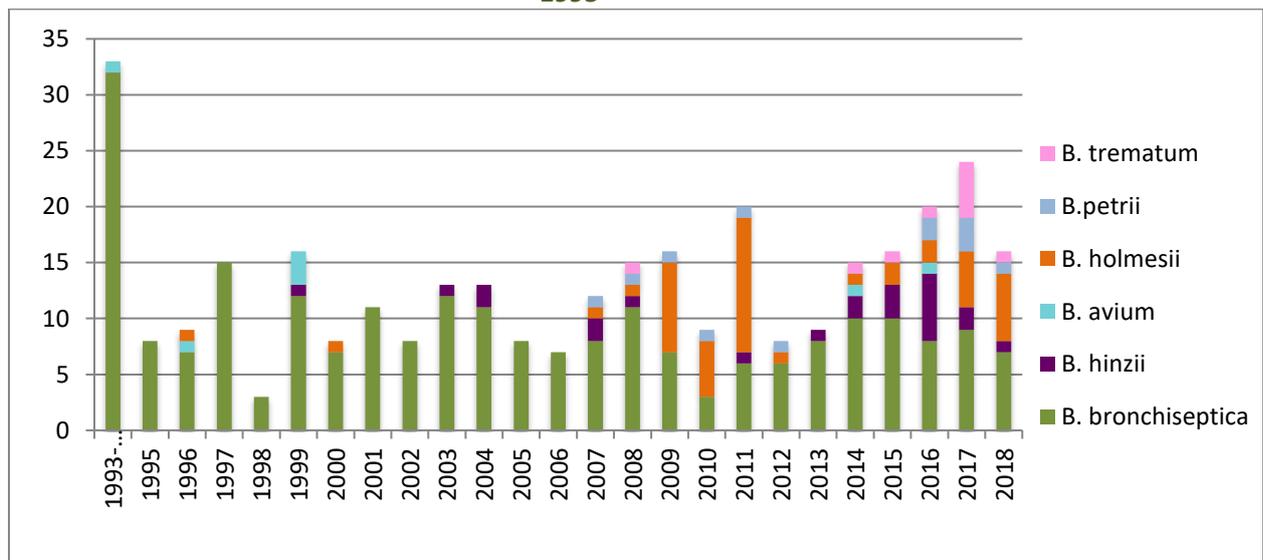


Figure 5b : Nombre d'isolats des autres espèces de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1995



Répartition par classe d'âge : Comme lors des années précédentes, la proportion la plus élevée des isolats de *B. pertussis* est collectée chez des nouveau-nés âgés de moins de 6 mois (52%). Cette proportion fluctue légèrement (59% en 2017, 46% en 2016, 65% en 2015, 55% en 2014, 60% en 2013). De façon symétrique, la proportion des isolats collectés en 2018 (15%) chez les enfants âgés entre 2 et 8 ans a très légèrement diminué par rapport à 2017 (17% en 2017 ; 22% en 2016 ; 4% en 2015 ; 12% en 2014 ; 12% en 2013).

Surveillance de l'évolution des antigènes :

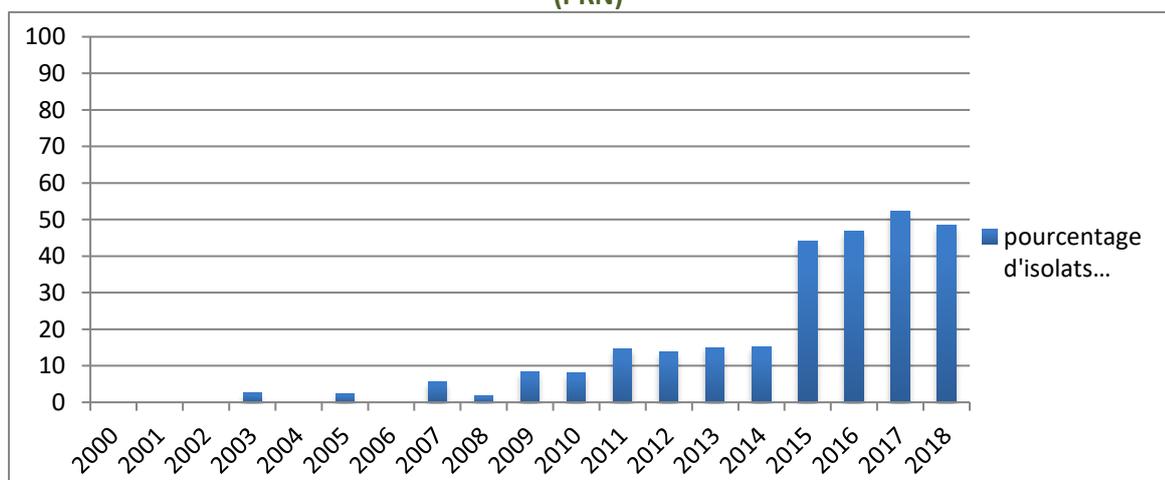
La surveillance des antigènes vise à caractériser une possible évolution des s par divergence antigénique ou perte de l'expression des antigènes, sous pression de sélection induite par la vaccination des populations.

Les vaccins sous-unitaires utilisés en France sont soit bi-valents (PT + FHA ; *PENTAVAC/TETRAVAC*®, *HEXYON*), tri-valent (PT, FHA, PRN ; *INFANRIX*®, *BOOSTRIX*®), soit penta-valents (PT + FHA + PRN + FIM2 + FIM3 ; *REPEVAX*®). Le vaccin *VAXELIS*® récemment introduit en France inclut un vaccin contre la coqueluche de type pentavalent.

- **Pertactine.** Depuis 2007, des souches de *B. pertussis* ne produisant plus l'antigène vaccinal pertactine (PRN) sont observées en France. En 2018, la proportion des souches qui ne produisent pas PRN, a légèrement diminué : de 52,3% en 2017, la proportion d'isolats PRN- est passée en 2018 à 48,4 % (**Figure 6**). De multiples lignées PRN- ont évolué indépendamment. La non-production de la pertactine est due, pour plus de la moitié des souches PRN-, à deux principaux événements génomiques : l'insertion d'une IS481 au sein du gène *pm* ou une inversion de séquence (22 kb) qui affecte la séquence promotrice de la pertactine. D'autres événements génomiques minoritaires (délétions, mutations) sont observés au sein du gène *pm* ou de son promoteur pour les autres isolats PRN-.

Concernant *B. parapertussis*, les 6 souches isolées en 2018 ne produisent pas la pertactine ; 99% des souches de *B. parapertussis* circulant depuis 2007 ne produisent pas la PRN.

Figure 6. Pourcentage des souches de *B. pertussis* analysés qui ne produisent pas la pertactine (PRN)



- **Toxine pertussique.** De plus, une des souches de *B. pertussis* PRN- ne produit pas non plus la toxine de pertussis (PT). C'est une observation rare et importante en terme de surveillance, sachant que la PT est systématiquement présente dans les vaccins sous unitaires. Cette souche a été isolée chez une petite fille de 3 ans avec toux et quintes depuis 15 jours. Il n'y a pas de notion de contagion avec son entourage. La non production de PT est due à une délétion observée au sein du gène codant la sous-unité 1 de la PT. Les isolats PT- sont très rares en France et dans le monde et seuls 2 cas ont été reportés en France (isolat PT- ; Bouchez et al, Vaccine 2009;27:6034-6041) et aux USA (isolat PT-/PRN- ; Williams et al, EID. 2016 ;22(2):319-322).

- **Fimbriae de type 2 et 3 :** les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux fimbriae différentes, le plus souvent de manière exclusive, ou parfois en combinaison. Les isolats de 2018 produisent majoritairement (70%) FIM3, de façon similaire à 2017 (69%). La proportion des isolats qui produisent FIM2 en 2018 (30%) a légèrement augmenté par rapport à 2017 (22%).

- **Allèles de *Fim2* et *Fim3* :** toutes les souches de *B. pertussis* sauf 2 (nouvel allèle) portent l'allèle *fim2-1*. 56% des souches de *B. pertussis* portent l'allèle *fim3-1*, 42% des souches portent l'allèle *fim3-2* et une souche porte l'allèle *fim3-4* (2%).
- **Allèles des gènes codant la toxine PT et la pertactine.** En 2018, l'allèle de la sous-unité S1 de la toxine de pertussis (PT) est pour la majorité des souches de type *ptx1A* et celui de la PRN (pour les souches qui la produisent) est pour la majorité des isolats de type PRN2, comme la plupart des souches circulant depuis 1990.
- **Allèles du promoteur de la toxine PT.** Le promoteur *ptxP* (situé en amont de l'opéron *ptx* codant les différentes sous-unités de la toxine de pertussis) montre une variation de séquence dont il a été suggéré

(bien que cette proposition soit débattue) qu'elle pourrait entraîner une variation du niveau d'expression du gène et donc de la production de la toxine. Depuis 1993, une augmentation régulière des souches possédant l'allèle *ptxP3* du promoteur de l'opéron codant la PT est observée. En 2018, toutes les souches sont de type *ptxP3* sauf un isolat (*ptxP1*).

Analyses phylogénétiques

La diversité des souches de *B. pertussis* reçues au CNR en 2018 a été étudiée par notre méthodologie basée sur le cgMLST publiée dans Bouchez et al, EID 2018;24(6):988-994. La **Figure 7** présente un arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences des 2038 gènes constituant le schéma cgMLST. L'arbre est enraciné sur la souche de référence Tohama. A part un isolat de type *ptxP1*, tous les isolats 2018 sont de type *ptxP3*. Ils présentent en moyenne 66 gènes (allèles) différents par rapport à la souche Tohama et en moyenne 35 avec la souche *ptxP1*. On distingue deux clades principaux, identifiés chacun par leur allèle du gène *fim3* (clade *fim3-1* en noir sur la Figure 7 et clade *fim3-2* en vert). Les isolats PRN-négatifs sont présents dans les deux clades. L'isolat PT-/PRN- se situe dans le clade *fim3-2*.

Le nombre d'allèles distincts entre les isolats de type *ptxP3* varie de 0 à 16 maximum. Les groupes d'isolats pour lesquels le nombre de différences alléliques est égal à 0 (identité totale sur les 2038 gènes) peuvent correspondre à des transmissions récentes du même type génomique. La localisation géographique locale de ces groupes soutient cette possibilité.

Un cas groupé mère/enfant et deux chaînes de transmission locales sont indiquées sur la **Figure 7** (page 18).

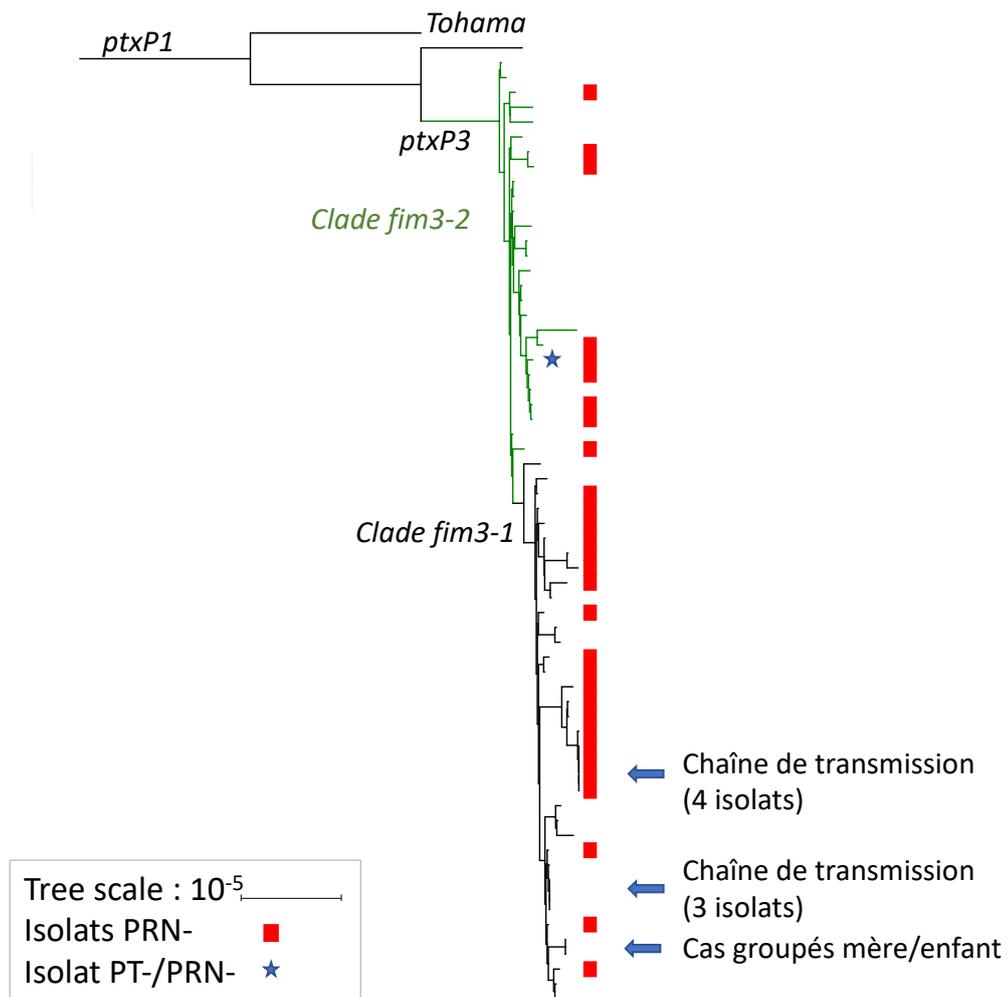
Conclusions

En résumé, les caractéristiques des souches circulantes de *B. pertussis* sont stables, malgré l'observation rare d'une souche ne produisant plus la toxine de pertussis. Pour la première fois, nous sommes en mesure de détecter des événements probables de transmission locale, grâce au séquençage génomique.

Figure 7. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des isolats de *B. pertussis* reçus au CNR en 2018.

L'arbre a été enraciné avec la souche de référence Tohama. Tous les isolats sauf un (et la référence) appartiennent à la branche 'moderne' *ptxP3*, et se répartissent en deux lignées identifiées par leur allèle du gène *fim3*. Les isolats pertactine-négatifs sont indiqués par les carrés rouges dans la colonne de droite. L'isolat toxine-négatif est marqué d'une étoile bleue. Trois chaînes de transmission locale sont indiquées.

L'échelle correspond au nombre de substitutions nucléotidiques par position dans l'alignement des 2038 séquences des gènes du schéma cgMLST (les plus petites branches visibles correspondent à une seule substitution).



3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

✓ Infections humaines à *B. bronchiseptica*

B. bronchiseptica est un agent pathogène du tractus respiratoire de nombreux mammifères, dont l'homme. Chez ce dernier, la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable. La bactérie, dans le cas de sujets immunodéprimés, peut induire des infections persistantes, à la différence de *B. pertussis* et *B. parapertussis*.

En 2018, nous avons reçu 7 isolats de *B. bronchiseptica* au CNR, un nombre stable par rapport aux années précédentes (**Figure 6b**). Il s'agit principalement de cas d'infections chez des adultes âgés de plus de 50 ans (les âges se répartissent entre 53 et 85 ans) avec une comorbidité sous-jacente (ex. BPCO). Dans la majorité des cas, les patients ont été hospitalisés pour une infection respiratoire basse.

✓ Autres bordetelloses humaines

B. hinzii :

Bordetella hinzii est une espèce du genre *Bordetella* qui est impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive et de bactériémies ont été décrits chez l'homme. En 2018, nous avons reçu 1 souche de *B. hinzii* isolée d'une expectoration chez une patiente âgée de 80 ans.

B. holmesii :

C'est une espèce du genre *Bordetella* qui a été décrite pour la première fois en 1995 par le CDC et qui est généralement décrite comme causant des bactériémies chez des patients immunodéprimés, notamment aspléniques ou drépanocytaires, mais elle peut aussi être occasionnellement isolée ou détectée, par PCR, à partir de prélèvements respiratoires chez des patients présentant des symptômes coqueluchoïdes.

En 2018, nous avons reçu 6 souches de *B. holmesii* isolées chez des patient(e)s adolescent(e)s ou adultes (14, 16, 19, 67 et 71 ans) et pour la première chez une enfant âgée de 1,4 mois.

- Trois patientes âgées entre 14 et 19 ans sont drépanocytaires et ont été hospitalisées dans 2 hôpitaux franciliens et dans un hôpital d'un département d'outre mer. Chez ces 3 patientes, la souche a été isolée d'une hémoculture.
- Le patient âgé de 67 ans avait été admis dans un hôpital parisien pour une décompensation de BPCO.
- La patiente âgée de 71 ans avait été admise à l'hôpital pour une suspicion de spondylodiscite. La souche de *B. holmesii* a été collectée à partir d'une ponction disco-vertébrale. C'est très rare et des investigations sont un cours pour caractériser la souche.
- La jeune enfant âgée de 1,4 mois a été admise à l'hôpital pour une toux quinteuse avec recrudescence nocturne. La souche de *B. holmesii* a été collectée à partir d'une aspiration naso-pharyngée. C'est le premier cas d'une *Bordetella holmesii* isolée chez une patiente très jeune et des investigations sont en cours pour caractériser la souche et vérifier l'éventuelle présence d'un autre pathogène qui pourrait expliquer les symptômes cliniques.

B. petrii :

B. petrii est une bactérie de l'environnement qui est décrite comme pouvant, bien que rarement, produire une infection respiratoire persistante chez l'homme.

Entre 2018, nous avons reçu 1 souche isolée chez un patient, âgé de 70 ans, souffrant d'une otite chronique et ayant une co-infection avec un *staphylococcus aureus*. L'isolat a été envoyé au CNR par un LABM insulaire.

B. trematum :

La première description de *B. trematum* a été faite en 1996. La bactérie avait été isolée à partir d'infections auriculaires chroniques. Elle est très occasionnellement isolée dans des cas de bactériémies ou d'ulcères chroniques.

Entre 2018, nous avons reçu 1 souche isolée chez un patient âgé de 55 ans paraplégique, ayant plusieurs escarres, apyrétique. La souche a été isolée d'une escarre du sacrum.

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

Un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides avait été isolé en 2011, pour la première fois en France et en Europe (Guillot S. et al. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (6):966-8). Depuis, nous n'avons pas observé de nouveau cas d'isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France, y compris en 2018. Cependant, plusieurs isolats de *B. pertussis* résistants aux macrolides ont été trouvés en Chine et en Iran. Il est important de surveiller l'émergence, l'introduction et la diffusion de telles souches en France.

En 2018, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *B. pertussis* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine, *in vitro*. Il est important de surveiller la résistance des isolats à cet antibiotique car il est ajouté dans les milieux sélectifs pour la culture des bordetelles. Au CNR nous cultivons les isolats en parallèle avec et sans cet antibiotique.

Les 6 isolats de *B. parapertussis* de 2018 étaient résistants *in vitro* à la céfalexine, comme précédemment.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

3.3.1 Europe

Projet PERTINENT. Nous participons au projet Pertinent de surveillance de la coqueluche à l'échelle européenne qui a démarré en 2016 (en mars 2016 pour la France). Les objectifs principaux du projet sont a) d'estimer le poids de la coqueluche chez les nourrissons hospitalisés âgés de moins d'un an (0-11 mois inclus), et b) d'estimer l'efficacité du vaccin coquelucheux contre l'hospitalisation pour coqueluche confirmée au laboratoire chez les nourrissons âgés de moins d'un an. Nous continuons à contribuer à la validation des données biologiques pour une vingtaine de centres hospitaliers français qui font partie du réseau RENACQ et qui participent à Pertinent. En 2018, nous avons continué à confirmer rétrospectivement la présence de *B. pertussis* (par culture ou/et PCR spécifique selon le laboratoire) dans les échantillons envoyés au CNR.

Projet EUpertStrain. Nous continuons à participer au réseau européen de laboratoires de référence EUpertStrain. Dans ce cadre, nous échangeons des isolats cliniques et des modes opératoires. Nous nous réunissons une fois par an. Sylvain Brisse a fait une présentation des projets de génomique des populations en cours au CNR lors de la réunion qui a eu lieu à Copenhague les 12 et 13 septembre 2018.

Réseau EUpertLabNet. Nous participons au projet EUpert-LabNet, visant à coordonner un réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche et à intégrer les activités de surveillance microbiologique avec la surveillance épidémiologique. Les objectifs plus spécifiques de ce réseau sont d'évaluer, d'améliorer, d'harmoniser et de diffuser les méthodes de diagnostic et de caractérisation des souches dans les laboratoires de référence européens. Cette étude est financée par l'ECDC. Nous avons participé à la réunion de ce réseau à Copenhague les 12 et 13 septembre 2018.

3.3.2 Autres collaborations internationales

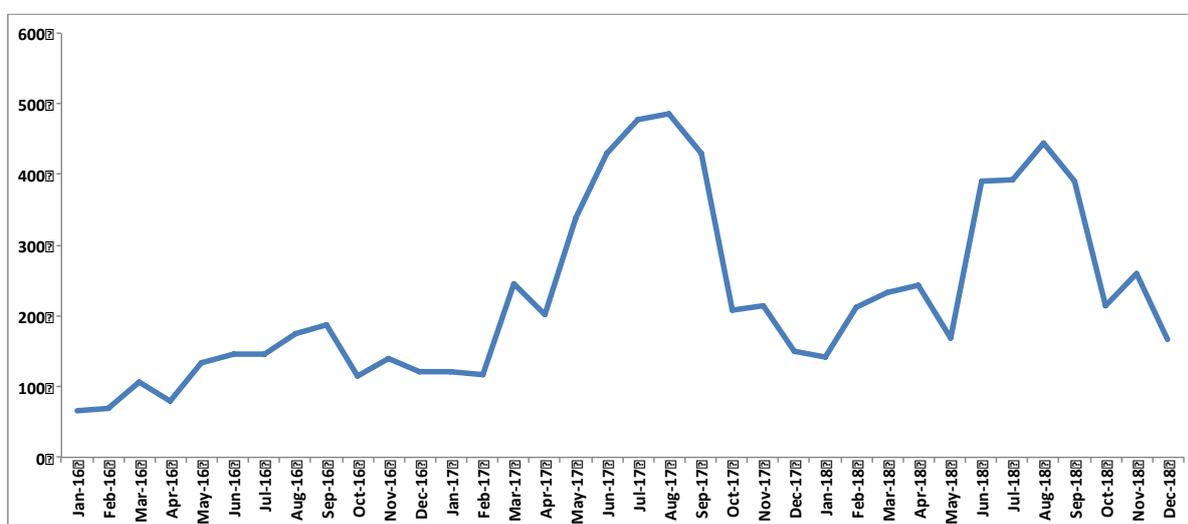
L'unité de recherche qui héberge le CNR, continue sa mission de formation internationale, avec une perspective d'application à la clinique, en s'appuyant en particulier sur des instituts Pasteur du Réseau international (RIIP). Ainsi, depuis 2016, l'Unité participe au projet **PERILIC** (PERTussis Immunization programs in Low and middle

Income Countries), en collaboration avec le Centre de Recherche Translationnelle (CRT) de l'Institut Pasteur et Nicole Guiso. Les objectifs du projet sont d'assurer un transfert des méthodes de laboratoire et de surveillance dans différents pays (Cambodge, Iran, Madagascar et Togo) et d'obtenir des données épidémiologiques sur la coqueluche dans ces pays. Ce projet permettra d'améliorer les recommandations vaccinales dans ces pays en les adaptant à l'épidémiologie locale.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

La biologiste en charge du diagnostic de la coqueluche au sein du laboratoire CERBA avait contacté le CNR début juillet 2017 pour l'informer d'une recrudescence des cas de coqueluche diagnostiqués par PCR. L'augmentation du nombre et de la proportion de PCR IS481 positives avait été observée à partir du mois de mars 2017. Fort de ces observations, le CNR avait alerté SpF et une réunion avait été organisée début décembre 2017 entre les membres du CNR et de SpF impliqués dans la surveillance de la coqueluche pour discuter des tendances observées au courant de l'année 2017. En 2018, suite à une réunion avec les laboratoires CERBA et BIOMNIS, ces laboratoires ont envoyé régulièrement au CNR les données de PCR *Bordetella*. Nous avons donc pu analyser les données de PCR des laboratoires CERBA et BIOMNIS des années 2016, 2017 et 2018. Ces données montrent que le nombre de PCR IS481 positives a augmenté en 2017 avec un pic en juin-septembre 2017, suivi d'une nette diminution de septembre à mai 2018 sans revenir pour autant aux chiffres de 2016, puis un pic équivalent en juin-septembre 2018. (Figure 8). Ces données correspondent à une population différente des patients du réseau Renacoq, population plus âgée avec une médiane d'âge aux alentours de 19 ans.

Figure 8. Nombre de PCR positives IS481 issues des données des laboratoires CERBA et BIOMNIS entre janvier 2016 et décembre 2018.



4 Alerte

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande aux personnels médicaux concernés de prévenir SpF et l'ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, l'avis du HCSP et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser. Le CNR est parfois amené à conseiller sur la prise en charge des patients infectés. Les alertes sont heureusement rares :

1) En 2018, à la demande de l'ARS des Pays de Loire, nous avons reçu trois échantillons de cas de coqueluche en école primaire qui ont été signalés fin novembre 2018. Le CNR a effectué les PCR de vérification pour confirmer l'espèce de *Bordetella* mais pour un des trois cas, c'est l'ADN de l'espèce *B. bronchiseptica* qui a été identifié. Il s'agissait d'un garçon âgé de 4 ans.

2) Fin novembre 2018, l'ARS de la Gironde nous a signalé des cas groupés de coqueluche dans une école maternelle de Talence. Sur les 5 cas suspectés de coqueluche, 2 PCR faites par le LABM se sont avérées positives. Notre CNR a confirmé la détection de l'espèce *B. pertussis* pour 1 des 2 cas.

3) SpF nous a informé de plusieurs cas de coqueluche dans une crèche du 17ème arrondissement de Paris. Il s'est avéré que la bactérie responsable des 4 cas de coqueluche n'était pas *B. pertussis* mais *B. parapertussis*. En effet, les LABM qui ont fait les PCRs diagnostic nous ont envoyé 3 prélèvements/ADN et nous avons confirmé l'espèce *parapertussis* avec notre PCR FLA pour 2 des 3 cas. La quantité d'ADN de *Bordetella* présente dans le troisième échantillon était trop faible pour être détectée par la cible FLA.

4) A la demande de l'ARS Océan Indien, nous avons pris contact avec le laboratoire de biologie médicale du centre hospitalier de Mamoudzou à Mayotte en 2017 afin de l'aider à mettre en place la culture et la PCR coqueluche en lui transférant nos techniques de référence et en lui envoyant des contrôles positifs pour la validation des expériences. En 2018, le laboratoire mahorais a effectivement mis en place la culture et la PCR en temps réel pour le diagnostic de la coqueluche. En octobre 2018, à la suite de suspicions de nouveaux cas de coqueluche, le laboratoire mahorais a identifié une souche de *B. pertussis* chez un nourrisson et sa maman ainsi qu'une souche de *B. parapertussis* chez un nourrisson d'un autre foyer. Les isolats et ADNs ont été envoyés au CNR qui a confirmé les résultats obtenus par le laboratoire de l'hôpital de Mamoudzou.

5) Comme mentionné dans la section 3.4, le CNR avait alerté SpF de l'augmentation inquiétante du nombre de PCR coqueluche positives à partir de mars 2017 dans plusieurs régions françaises. Les données ont été fournies par les laboratoires CERBA et BIOMNIS et analysées par notre CNR afin de suivre les tendances. Il a été convenu de continuer à collaborer étroitement avec ces laboratoires afin de suivre l'évolution de la proportion des PCR positives dans les prochains mois.

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

- *Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ;*

Cours par **Sophie Guillot**, dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à la faculté de Chatenay-Malabry : "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux" - le 16 novembre 2018 (3 heures).

Julie Toubiana intervient régulièrement dans le cadre de cours de 2^e et 3^e cycle des études médicales à la Faculté Paris Descartes sur la thématique générale des maladies infectieuses pédiatriques, une partie en 2018 était dédiée à la sensibilisation des futurs médecins, pédiatres et infectiologues à la coqueluche et à ses formes graves chez le nourrisson, et aux recommandations HCSP de pratique autour d'un cas.

- *Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;*

Julie Toubiana a participé à la relecture et à la correction du chapitre Coqueluche de l'ouvrage référentiel français d'infectiologie E-PILLY, version 2018.

- *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :*
 - *Rétro-information aux partenaires ;*
 - *Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le **site internet** (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;*

Les informations concernant la coqueluche et les activités du CNR sont disponibles pour les professionnels de santé et le grand public via notre site web (dernière mise à jour : 01/03/2018) : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>.

Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2017) est en ligne sur le site web du CNR.

En 2018 la fiche maladie de l'Institut Pasteur a été mise à jour par le CNR (<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/coqueluche>).

- *Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...*

Le CNR peut être joint par téléphone, aux heures ouvrables, au poste du responsable, de l'adjointe et du secrétariat. Le CNR peut également être joint par courriel et un numéro de portable est disponible en cas d'urgence. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR. En 2018, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel.

Sollicitations par téléphone ou par courriel en 2018

Hôpitaux	17
Pédiatres, Médecins généralistes, biologiste LABM	13
Collectivités	4
Particulier	1
TOTAL	35

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

6.1 Description des activités de recherche en cours notamment uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

- **Méthode standardisée pour le génotypage génomique des isolats de *B. pertussis***

En 2018, nous avons finalisé le développement d'une méthode cgMLST pour analyser finement le génotype des isolats de *B. pertussis* (Bouchez *et al.*, Emerg Inf. Dis, 2018_voir rubrique 6.2.1). Le système de typage est très reproductible, permet de définir de manière probabiliste des chaînes de transmission de *B. pertussis*, et une base de données d'allèles de référence publiquement accessible a été développée. Ce système commence à être utilisé par nos collègues à l'échelle européenne et facilitera la compréhension commune de la circulation des isolats à l'échelle internationale. Nous prévoyons de former nos collègues Européens à cette approche.

- **Séquençage génomique de *Bordetella pertussis* par technologie Oxford Nanopore (ONT)**

Afin d'obtenir des séquences génomiques complètes (circularisées), nous avons utilisé la technologie ONT. Nous avons obtenu une très bonne qualité d'assemblage grâce à une approche mixte combinant données ONT et Illumina (Bouchez *et al.* MRA, 2018;15;7(19)). Cette approche appliquée pour la première fois à *B. pertussis* permettra d'analyser non seulement la diversité des souches basée sur les mutations ponctuelles, mais aussi les réarrangements chromosomiques, qui pourraient être à l'origine de variation d'expression de gènes de virulence ou d'antigènes vaccinaux.

- **Analyse d'isolats de *B. pertussis* de Tunisie**

Lors de l'accueil d'une jeune chercheuse tunisienne en formation, nous avons appliqué la méthode génomique cgMLST pour l'analyse de souches tunisiennes collectées en 2014 lors d'un pic épidémique dans ce pays, que nous avons décrit en 2018 (Ben Fraj *et al.* JMM 2019;68(2):241-24). Les résultats montrent que les souches sont diverses, différentes des souches vaccinales utilisées en Tunisie (vaccins à cellules entières) et de caractéristiques antigéniques similaires à celles circulant dans les pays (dont la France) utilisant les vaccins acellulaires. Toutefois, aucune souche PRN-négative n'a été observée en Tunisie pour l'instant.

- **Analyse d'isolats Européens de *B. pertussis***

Le CNR a participé à l'étude EUpert IV, qui a consisté à caractériser les isolats de *B. pertussis* collectés entre 2012 et 2015 dans 9 pays Européens (par différentes méthodes : génotypage, sérotypage, électrophorèse en champ pulsé sur gel (ECP) et analyse multilocus à nombre variable de répétitions en tandem) et à comparer les résultats à ceux obtenus lors des études EUpert I à III. Les résultats des 4 études (1998-2015) ont montré que la population Européenne de *B. pertussis* évolue et qu'elle s'est homogénéisée après l'introduction des vaccins coquelucheux acellulaires (Barkoff *et al.* 2018).

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1 Publications internationales

1. Ben Fraj I, Kechrid A, Guillot S, Bouchez V, Brisse S, Guiso N, Smaoui H. Pertussis epidemiology in Tunisian infants and children and characterization of *Bordetella pertussis* isolates: results of a 9-year surveillance study, 2007 to 2016. **J Med Microbiol.** 2019;68(2):241-24. Epub 2018 Dec.
2. Bouchez V, Baines SL, Guillot S, Brisse S. Complete Genome Sequences of *Bordetella pertussis* Clinical Isolate FR5810 and Reference Strain Tohama from Combined Oxford Nanopore and Illumina Sequencing. **Microbiol Resour Announc.** 2018;15;7(19).
3. Bouchez V, Guglielmini J, Dazas M, Landier A, Toubiana J, Guillot S, Criscuolo A, Brisse S. Genomic Sequencing of *Bordetella pertussis* for Epidemiology and Global Surveillance of Whooping Cough. **Emerg Infect Dis.** 2018;24(6):988-994.
4. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, Guillot S, Stefanelli P, van Gent M, Berbers G, Vestheim DF, Greve-Isdahl M, Wehlin L, Ljungman M, Fry NK, Markey K, Auranen K, He Q. Surveillance of Circulating *Bordetella pertussis* Strains in Europe during 1998 to 2015. **J Clin Microbiol.** 2018;25;56(5).

6.2.2 Communications internationales

Sylvain Brisse : Présentation orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée à Copenhague, le 13 septembre 2018 : « Understanding whooping cough resurgence by a population genomics approach »

6.2.3 Communications nationales

Sylvain Brisse et Julie Toubiana ont donné en tandem deux conférences dans le cadre des séminaires Quart d'Heure Pasteur - Médecine du Centre de Recherche Translationnelle de l'Institut Pasteur, le 15 mars 2018 :

- Sylvain Brisse : « L'épidémiologie génomique et ses applications à l'agent de la coqueluche »

- Julie Toubiana : « Coqueluche : le point de vue de la pédiatre, et scientifique à Pasteur »

Ces deux conférences ont donné lieu à diffusion de deux films de 20 minutes sur YouTube :

Julie Toubiana : <https://youtu.be/a7S-AewuBAU>

Sylvain Brisse : https://youtu.be/O2_BHpO91HQ

Sylvain Brisse : présentation à la journée Inception, Institut Pasteur, le 8 novembre 2018 : « Understanding whooping cough resurgence by a population genomics approach »

Julie Toubiana : présentation orale aux Journée Nationales d'Infectiologie sur le thème des pièges en infectiologie pédiatrique qui se sont déroulées du 13 au 15 Juin 2018 à Nantes – présentation de la coqueluche maligne.

Julie Toubiana : dernier auteur d'une présentation orale à la RICAI, le 17 Décembre 2018 : « Recrudescence des cas de coqueluche en 2017 »

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Ces aspects sont peu ou pas pertinents pour la coqueluche, maladie strictement humaine et non transmise par les aliments ou l'environnement.

Bordetella bronchiseptica peut infecter ou être portée par des animaux, mais ces infections sont rarement reportées. Le CNR reste attentif à ces aspects et est ouvert à des collaborations avec des laboratoires vétérinaires.

8 Programme d'activité pour les années suivantes (N+1 et N+2)

- **8.1 Amélioration de l'identification des espèces avec la technologie MALDI-TOF**

Lors de la mandature précédente, nous avons mis en place la méthode d'identification des bordetelles par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il reste nécessaire d'améliorer le contenu de la base de données, surtout pour les espèces moins fréquemment rencontrées. Ce travail de référence sera réalisé en complémentarité de nos recherches sur la diversité phylogénétique par séquençage génomique. En effet l'approche phylogénétique révélera la diversité des lignées et fournira des souches de référence des différentes espèces et lignées évolutives. Cela permettra de tester la capacité de l'approche MALDI-TOF à différencier toutes les bordetelles et, si nécessaire, d'enrichir les bases de données d'identification. Les souches de nouvelles espèces ont été obtenues et ajoutées à la collection du CNR : *B. pseudohinzii* (REF NCTC 13808T), *B. bronchialis* (REF CCUG 56828T), *B. sputigena* (REF CCUG 56478) et *B. flabilis* (REF CCUG 56827T).

- **Dynamique de la transmission des souches à l'échelle européenne et internationale**

L'unité de recherche qui héberge le CNR a obtenu fin 2017 un financement pour un projet de génomique comparative à l'échelle européenne (financement : projet INCEPTION, Institut Pasteur, dans le cadre de l'action « Instituts Convergences » de l'ANR). La comparaison génétique des isolats issus de plusieurs pays européens permettra de mieux caractériser la diffusion des souches à l'échelle internationale et de définir les variations de composition des populations de *B. pertussis* entre pays à l'échelle européenne. Ces variations pourront être reliées aux différentes politiques vaccinales. Ce projet de deux ans a démarré début 2018 par un recensement des collections disponibles auprès de nos partenaires Européens et par le séquençage génomique d'un jeu de données pilote de 30 souches par pays. Une étudiante de M2 (puis thèse) et une post-doc ont été recrutées pour contribuer à ce projet. Les analyses de ce premier jeu de données sont en cours en collaboration avec les équipes de Simon Cauchemez et Henrik Salje (Institut Pasteur) et seront présentées au Symposium International sur *Bordetella* à Bruxelles (9-12 avril 2019). Des séquençages additionnels de souches seront discutés avec les partenaires lors du Symposium.

- *Dynamique évolutive des souches et variation des antigènes vaccinaux*

Comprendre les liens entre la perte d'expression des antigènes et l'efficacité vaccinale est un thème central de recherche appliquée à la santé publique chez *B. pertussis*. Il est lié directement à l'évaluation des vaccins et apporte des informations nécessaires aux politiques vaccinales. Dans le cadre du projet INCEPTION ci-dessus, nous nous intéresserons donc particulièrement à la dynamique évolutive des isolats qui ne produisent pas la pertactine (PRN-), qui sont les plus nombreux. Un objectif sera de mieux caractériser l'émergence et la diffusion de ces isolats depuis leur apparition dans les années 2000.

Nous étudierons également l'évolution des autres gènes d'antigènes vaccinaux à l'échelle internationale, ce qui permettra de comparer les dynamiques évolutives dans les différents pays participants et de les confronter à la variation des politiques vaccinales. Nous espérons contribuer ainsi à améliorer la définition des politiques vaccinales par une analyse à haute résolution et à grande échelle de l'évolution des populations de *B. pertussis*.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

- Continuer à surveiller les isolats de *B. pertussis* et *B. paraptussis* circulants sous pression vaccinale en France.
- Poursuivre le développement de méthodes de détection de la coqueluche.
- Apporter un soutien technique pour la mise en place ou le maintien de la culture au sein des laboratoires de bactériologie qui en feront la demande.
- Confirmer l'identification des souches de *Bordetella* qui circulent en France en différenciant les souches de *B. pertussis*, *B. paraptussis* et *B. bronchiseptica* et autres espèces du genre *Bordetella*
- Suivre l'évolution des souches qui n'expriment pas certains antigènes vaccinaux.
- Continuer à participer au réseau de surveillance européen et participer à la mise en place d'un réseau de surveillance de la coqueluche en population générale, mené par le réseau SENTINELLES et en partenariat avec SpF.

...

Des sections intermédiaires ont été éliminées pour cause de confidentialité.

...

1.5 Description de la démarche qualité du laboratoire

1.5.1. Démarche qualité des CNR de l'Institut Pasteur

Le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multi-site et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-site (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

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

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

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

L'année qualité 2018 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	16 au 20 janvier 2018
Revue qualité	19/03/2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audits internes qualité et technique	27/09 après-midi et 21/09 matin
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	NA

Perspectives 2019 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	janvier-avril 2019
Audite COFRAC S6	15 au 19 Avril 2019
Audits internes qualité et technique	septembre - novembre 2019
Revue de direction LRE-MS	Mai 2019
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

La liste des techniques accréditées du LREMS est disponible en annexe 2.

1.5.2. Participation du CNR à un contrôle qualité externe

Comme le spécifie la Norme ISO 15189, un contrôle qualité externe doit être effectué chaque année. En juin 2018, nous avons participé à un contrôle qualité externe organisé par QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics Organisation, Glasgow, Scotland) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis*. Le QCMD se composait de 10 échantillons à partir desquels il fallait détecter la présence ou non du matériel génétique de bactéries du genre *Bordetella* et dans un deuxième temps identifier l'espèce *pertussis* par typage moléculaire. La première étape a consisté à purifier l'ADN des 10 échantillons. Nous avons ensuite fait les qPCR qui ciblent l'IS481 et l'IS1001 (PCR très sensibles mais pas spécifiques d'une espèce donnée) et effectué une analyse qualitative. Nous avons obtenu des résultats corrects pour les 10 échantillons au niveau de l'identification du genre *Bordetella*.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué le typage moléculaire par qPCR en utilisant différentes cibles spécifiques d'espèce (*ptxA-Pr*, *h-IS1001* et *FLA*). Nous avons aussi obtenu des résultats corrects pour les 10 échantillons quelle que soit l'espèce de *Bordetella* à identifier.

En conclusion, nous avons obtenu 100% de résultats corrects au CQE de 2018.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

✓ Techniques de diagnostic/identification direct

Culture

C'est la seule technique qui est 100% spécifique et qui permet d'analyser l'évolution de la population des Bordetelles. Nous recevons les isolats en provenance principalement des laboratoires du réseau Renacoq et du collège BVH. Nous utilisons le milieu Bordet-Gengou additionné de 15% de sang de cheval, avec ou sans céfalexine, ainsi que le milieu Regan-Lowe additionné de 10% de sang de cheval. Nous confirmons l'identification des isolats avec les techniques suivantes :

- Caractères macroscopiques par observation visuelle des cultures ;
- Caractères microscopiques par la réalisation d'un Gram ;
- Caractères biochimiques permettant de différencier les espèces du genre *Bordetella*
- Confirmation de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker).

Lorsque la confirmation de l'identification de la bactérie est validée, une mise en conserve en SPG/BSA est faite pour assurer un stockage au froid à long terme.

PCR en temps réel (ou qPCR) :

Les PCR en temps réel d'identification du genre *Bordetella* (I) et de confirmation d'espèce(s) (II) sont celles ayant comme cible :

(I) : La séquence d'insertion IS481* qui permet la détection de l'espèce *B. pertussis* avec une grande sensibilité du fait de la présence d'un grand nombre de copies du gène ciblé dans le génome. La spécificité n'est pas totale car on retrouve aussi l'IS481 dans le génome de l'espèce *B. holmesii* et de certaines *B. bronchiseptica*;

(I) : La séquence d'insertion IS1001* qui permet la détection de l'espèce *B. parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *B. bronchiseptica* (séquence présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*);

(II) La séquence d'insertion h-IS1001 qui est spécifique de l'espèce *B. holmesii*.

(II) : La région promotrice de la toxine de pertussis (*ptxA-Pr*) qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481;

(II) : Le gène BP3385 (qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle qui cible l'IS481. Toutefois, il peut détecter aussi l'espèce *B. bronchiseptica* dans de rares cas et c'est pourquoi la PCR FLA est faite en parallèle de cette PCR

(II) La séquence en amont du gène de la flagelline *flaA* (II) ; qPCR FLA en 2 temps qui détecte spécifiquement l'espèce *B. parapertussis* et qui permet de différencier cette espèce de l'espèce *B. bronchiseptica*;

* : Techniques accréditées selon le référentiel ISO15189.

Le diagnostic moléculaire de la coqueluche (recherche de *Bordetella pertussis* et *parapertussis* par amplification génique) est remboursé par la sécurité sociale depuis mars 2011.

✓ *Technique de diagnostic indirect*

Il s'agit du dosage des anticorps dans le sérum de personnes afin de détecter celles qui ont été infectées ou vaccinées. Seul le dosage des anticorps anti-toxine de pertussis (anti-PT) est spécifique d'une infection ou d'une vaccination à *B. pertussis*. La sérologie n'a plus d'indication diagnostique car cette méthode est considérée d'interprétation trop incertaine. Elle n'est plus remboursée par la Sécurité sociale depuis 2011. Lors de cas groupés de coqueluche dans des collectivités, à la demande des ARS principalement, le CNR effectue tout de même la sérologie, en utilisant une méthode ELISA (trousse commerciale validée lors d'une étude collaborative qui a été publiée en 2014 (Dinu et al. 2014, DMID 78:302-6)).

✓ *Vérification de la sensibilité aux anti-infectieux*

Pour les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR, la sensibilité aux anti-infectieux (ampicilline, céfalexine, streptomycine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, triméthoprim/sulfaméthoxazole = cotrimoxazole) est testée par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques (BIORAD). Les antibiotiques clarithromycine et azithromycine ainsi que le cotrimoxazole (alternative en cas de contre-indication des 2 premiers antibiotiques) sont ceux recommandés en prophylaxie lors de contacts avec un cas ou lors de cas groupés de coqueluche.

Concernant les macrolides (érythromycine, azithromycine et clarithromycine), qui sont utilisés en thérapie, un seul isolat de *B. pertussis* a été trouvé résistant à ces trois antibiotiques depuis la création du CNR en 1993. Tous les isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* présentent une résistance naturelle *in vitro* à la céfalexine.

✓ *Techniques de typage et de caractérisation des isolats bactériens*

Typage des gènes d'antigènes vaccinaux.

La détermination de la séquence allélique du promoteur de la toxine pertussis, de la pertactine et de la sous-unité S1 de la toxine pertussis est réalisée. Ce typage est fait depuis 2016 par séquençage à haut débit (technologie Illumina). Le séquençage du génome remplace les multiples PCR dédiées et séquençage Sanger précédemment utilisées. Les séquences des gènes d'intérêt sont analysées pour en déterminer les allèles et sont comparées à celles des souches de référence et des souches vaccinales.

Génotypage des souches par séquençage génomique

Le génotypage des souches est réalisé à partir des données de séquençage Illumina. Le typage fin des isolats est réalisé par core genome multilocus sequence typing (cgMLST), publié en 2017 (Bouchez et al., 2017, Emerging Infectious Diseases).

Vérification de la production des facteurs de virulence

Elle est réalisée :

- pour les protéines fimbriales : avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence ;

- pour la toxine adényl cyclase-hémolysine : par visualisation de l'hémolyse et si nécessaire par le dosage de l'activité adényl cyclase ;

- pour la toxine de pertussis (PT), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la pertactine (PRN) : avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immunoempreinte (Western blot).

Tests de la virulence dans des modèles *in-vivo* et *in-vitro*

Dans le cas où un isolat présente des caractères génomiques ou phénotypiques différents de ceux

généralement décrits, l'unité de recherche a la capacité d'analyser ses interactions avec les macrophages murins (lignée J774.A1) ou les cellules trachéales épithéliales humaines (lignée HTE).

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

✓ Culture :

La culture est recommandée dans tous les cas pour les patients soit nouveau-nés non vaccinés ou incomplètement vaccinés, soit enfants, adolescents ou adultes non vaccinés ou dont le délai depuis la dernière vaccination est supérieur à 5 ans. Elle est recommandée pendant la période catarrhale, c'est-à-dire la phase atypique, pour toute personne ayant été en contact avec un cas confirmé biologiquement dans les 21 jours qui suivent le début de la toux de ce cas, et pour tous les patients symptomatiques dans les deux premières semaines de la phase d'état (toux paroxystique). Ce diagnostic est très important car d'une part, **il est le seul à être 100 % spécifique** et d'autre part, il permet d'analyser l'évolution de la population des Bordetelles et leur susceptibilité vis-à-vis des antibiotiques.

✓ PCR en temps réel (qPCR):

La détection de l'ADN de la bactérie peut se faire directement à partir des prélèvements naso-pharyngés (voir site web du CNR pour les aspects pratiques) de patients suspects de coqueluche. Les diagnostics par qPCR à réaliser sont ceux ayant comme cible :

- La séquence d'insertion IS481 qui détecte l'ADN des espèces *B. pertussis*, mais aussi *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*;
- La séquence d'insertion IS1001 qui détecte l'ADN de l'espèce *B. parapertussis*. La séquence de l'IS1001 est aussi présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*.

Note sur la spécificité des PCR : Ces 2 qPCR ont l'avantage de détecter avec une grande sensibilité l'ADN des espèces *pertussis* (le plus souvent) ou *holmesii* ou *bronchiseptica* (rarement). Cependant cette très grande sensibilité a deux inconvénients (i) des problèmes de contamination dans certains laboratoires (ii) une mauvaise spécificité. Pour rappel, nous avons réalisé, en 2011, une étude rétrospective afin d'estimer la proportion de détection d'ADN de *B. holmesii* dans des prélèvements respiratoires de patients suspects de coqueluche en France et pour lesquels la qPCR ayant pour cible l'IS481 était positive. Il s'avère que sur 177 extraits d'ADN testés (quantité d'ADN suffisante), 7,8% étaient positifs avec la cible spécifique de *B. holmesii* et négatifs avec la cible spécifique de *B. pertussis*. Parmi ces prélèvements, aucun ne correspondait à des patients de moins de 9 ans.

En fonction des résultats des 2 qPCR, le CNR recommande :

- **CAS n°1 : la qPCR IS481 est positive**, le CNR recommande de faire les 2 PCR spécifiques d'espèce permettant de différencier l'espèce *pertussis* de l'espèce *holmesii*.

- La qPCR *ptxA-Pr* qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que la qPCR IS481 dans nos conditions opératoires;
- La qPCR *h-IS1001* qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii* et qui est aussi sensible que la qPCR IS481 dans nos conditions opératoires;

Si ces 2 PCR sont négatives, le laboratoire peut envoyer l'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS481) au CNR afin qu'il teste les qPCR BP3385 et FLA.

Pour les laboratoires qui ne peuvent pas mettre en place les 2 PCR spécifiques, le CNR recommande de lui envoyer un aliquote d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS481) afin qu'il effectue les qPCR *ptxA-Pr* et *l'h-IS1001*.

- **CAS n°2 : la PCR IS1001 est positive.** Si le contexte épidémiologique (par exemple, contacts avec des animaux) et/ou le tableau clinique du patient oriente vers *B. bronchiseptica*, le CNR recommande de lui envoyer un aliquote d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS1001) afin qu'il effectue la qPCR FLA qui permet de faire la distinction entre les 2 espèces, *B. paraptussis* et *B. bronchiseptica*.

Les recommandations pour l'envoi d'un échantillon au CNR, quel que soit sa nature, sont indiquées sur le site web du CNR.