

Rapport annuel d'activité

2021

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

Années d'exercice

2019-2020



Le CNR remercie le réseau de correspondants microbiologistes et cliniciens, et en particulier les membres du réseau RENACOQ, pour l'envoi des échantillons, souches, résultats de tests moléculaires et informations associées, contribuant ainsi à la surveillance de la coqueluche en France.

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence à ce présent rapport (S. Guillot, V. Bouchez, J. Toubiana & S. Brisse. 2021. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence de la Coqueluche et Autres Bordetelloses – Années 2019-2020. Institut Pasteur, Paris, France). Les données issues des tableaux et figures présentées dans ce rapport ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

Résumé analytique

Le Centre National de Référence (CNR) a pour mission principale de contribuer au volet microbiologique de la surveillance de la coqueluche en France. En 2019, peu d'isolats ont été reçus au CNR, reflétant une situation de vallée entre deux cycles épidémiques naturels. L'année 2020, dans un contexte sanitaire exceptionnel dû à la pandémie de COVID-19, a été marquée par une baisse importante du nombre d'isolats de *Bordetella pertussis* et de *B. parapertussis* reçus au CNR. Le suivi de la sensibilité aux antibiotiques montre une absence, en France, de souches résistantes aux macrolides.

Le CNR est le laboratoire de référence français pour la confirmation par culture ou identification moléculaire des différentes espèces de Bordetelles. Ces activités sont réalisées sous assurance qualité selon la norme ISO 15189.

Le CNR surveille la production des antigènes vaccinaux par les souches circulantes. Le CNR a réalisé une étude rétrospective, sur les 23 dernières années, des isolats de *B. pertussis* collectés au CNR via le réseau RENACOQ (Bouchez et al., EuroSurveillance, 2021). Cette étude montre clairement que les isolats ne produisant pas la toxine de pertussis ou l'hémagglutinine filamenteuse, deux composants vaccinaux, sont très peu fréquents et existaient déjà avant l'introduction de la vaccination acellulaire. En revanche, les isolats ne produisant pas la pertactine sont en constante augmentation depuis 2007 et représentent désormais près de 50% des isolats collectés au CNR les dernières années (49% en 2019-2020). Les autres caractéristiques antigéniques ou phylogénétiques des souches sont stables.

Le CNR a poursuivi ses missions de conseil et d'alerte. L'évaluation de méthodes commerciales de diagnostic de la coqueluche a été réalisée (BioFire FilmArray), montrant un taux de détection limité (Guillot et al., 2020).

Le CNR a participé à une étude européenne dans le cadre du consortium EUPert-Labnet (soutenu financièrement par l'ECDC), qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphtérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne et l'Espace économique européen, chez les personnes de 40 à 59 ans (18 pays participants). La proportion de sérums contenant des taux d'anticorps contre la toxine de pertussis ≥ 100 UI / ml (indiquant une exposition récente à la coqueluche) était comparable pour 13 des 18 pays, variant entre 2,7 et 5,8%. Cette étude démontre une circulation active de *B. pertussis* (Berbers et al., Nature Communications 2021).

Analytical Summary

The NRC main mission is to contribute to the microbiological component of the surveillance of whooping cough in France. In 2019, very few isolates were received by the NRC, which reflects the trough between two natural epidemic cycles. Year 2020, in an exceptional health context due to the COVID-19 pandemic, is marked by an important further decrease in the number of *B. pertussis* and *B. parapertussis* isolates received by the NRC. The monitoring of the antibiotics sensitivity reveals a lack of macrolide-resistant strains in France.

The NRC is the French reference laboratory for the confirmation, by culture or by molecular methods, of the identification of the various *Bordetella* species. Such activities are implemented under quality assurance according to norm ISO 15189.

The NRC monitors the production of vaccine antigens by circulating strains. The NRC performed a retrospective analysis of the *B. pertussis* isolates collected at the NRC via the RENACOQ network over the past 23 years (Bouchez *et al.*, EuroSurveillance, 2021). This study clearly demonstrates that isolates which do not produce *pertussis* toxin nor filamentous hemagglutinin, two vaccine components, are very few and already existed prior to the introduction of acellular vaccination.

However, the proportion of isolates that do not produce pertactin has been constantly increasing since 2007; these isolates now represent half of the recent isolates (49% in 2019-2020). Other antigenic or phylogenetic characteristics remain stable.

The NRC continues to fulfill its missions of consultation for clinicians and medical microbiologists, and of warning health authorities of atypical events. The evaluation of commercial whooping cough diagnostic methods is also performed; this year for the BioFire FilmArray system, indicating a limited detection rate (Guillot *et al.*, 2020).

The NRC has participated to a European study in the framework of the ECDC-funded EUPert-Labnet consortium, which aimed to determine the *anti-diphtheria/tetanus/pertussis* antibodies seroprevalence within the European Union and the European Economic Area, amidst 40-59 years patients – involving 18 participating countries. The proportion of sera with pertussis toxin antibodies levels ≥ 100 UI/ml (attesting of a recent exposition to *B. pertussis*) oscillated between 2,7 and 5,8%, consistent with an active circulation of *B. pertussis* (Berbers *et al.*, Nature Communications 2021).

TABLE DES MATIERES

Résumé analytique.....	1
Analytical Summary	4
TABLE DES MATIERES	5
Liste des abréviations/acronymes	6
Introduction.....	7
1 Missions et organisation du CNR.....	8
2 Activités d'expertise	9
2.1. Évolutions des techniques	9
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	9
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4. Collection de matériel biologique	10
2.5. Activités d'expertise dans le cadre de la surveillance, années 2019 et 2020	10
2.6 Activités de séquençage.....	15
3 Activités de surveillance	18
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	18
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	24
3.3 Participation aux réseaux de surveillance.....	24
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	25
4 Alerte.....	26
5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil	27
6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	29
6.1 Description des activités de recherche en cours notamment uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	29
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.....	32
7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	34
8 Programme d'activité pour les années suivantes (N+1 et N+2).....	34
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	36
1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR	36
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	36
1.5 Description de la démarche qualité du laboratoire.....	37
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	40
2.1 Liste des techniques de référence : diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux	40
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	42

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
DMI	Département des Maladies Infectieuses
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
UE/EEE	Union Européenne/ Espace Economique Européen
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)
RENACOQ	REseau NAional 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 Albumin

Introduction

Les bordetelles sont classées en une quinzaine espèces, dont quatre infectent l'homme fréquemment : *B. pertussis* et *B. parapertussis*, les agents de la coqueluche ; *B. holmesii*, agent de bactériémies chez les sujets immunodéprimés en particulier aspléniques, et pouvant aussi être détecté lors d'un syndrome coqueluchoïde ; et *B. bronchiseptica*, qui cause la toux des chenils et peut induire chez l'Homme immunodéprimé des bactériémies ou des infections respiratoires. Au plan génomique, *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont des lignées clonales dérivées de *B. bronchiseptica*, leur espèce ancestrale qui a un mode de vie plus généraliste que ces deux pathogènes, spécialisés à l'homme.

B. petrii est une bactérie de l'environnement qui peut induire, bien que rarement, une infection respiratoire persistante chez l'homme. Finalement, *B. ansorpii* et *B. trematum* infectent l'homme de manière anecdotique. *B. avium* et *B. hinzii* infectent principalement les oiseaux sauvages et volailles.

De nouvelles espèces de *Bordetella*, très rarement rapportées, ont été récemment décrites : *B. bronchialis*, *B. sputigena*, *B. flabilis* ont été décrites chez l'homme ; *B. pseudohinzii* chez des souris de laboratoire ; et *B. muralis*, *B. tumulicola* et *B. tumbae* sur une tapisserie de plus de 1300 ans.

Les principaux facteurs de virulence des agents de la coqueluche, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, sont :

Des adhésines : l'hémagglutinine filamenteuse FHA, les protéines fimbriales FIM2 et FIM3 et la pertactine PRN ; et des toxines :

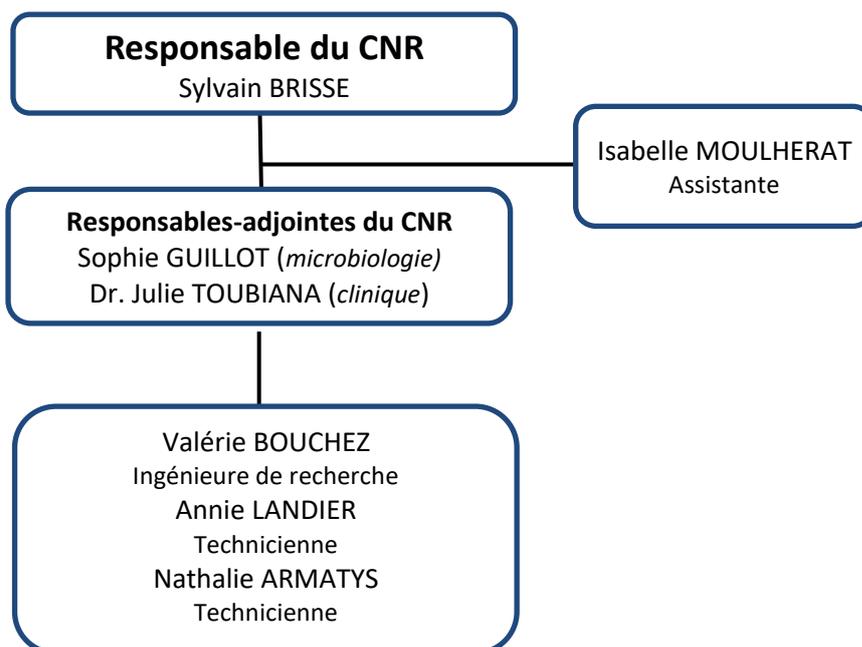
- la toxine de pertussis PT, toxine ADP-ribosylante, produite seulement par *B. pertussis*
- l'adényl cyclase-hémolysine AC-Hly, toxine RTX,
- la toxine BteA (effecteur du système de sécrétion III),
- la toxine dermonécrotique DNT, et la toxine cytotrachéale TCT.

Seule la toxine PT et les adhésines FHA, PRN, FIM2 et FIM3 entrent dans la composition de vaccins sous-unitaires utilisés actuellement en France. 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 la PRN et, très rarement, d'autres antigènes. Il est donc important de surveiller ce phénomène, qui impacte potentiellement l'efficacité vaccinale.

1 Missions et organisation du CNR

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**.

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 :



En France, la surveillance de la coqueluche est réalisée grâce à plusieurs réseaux :

- Le réseau RENACOQ (REseau National de la COQueluche), Réseau de surveillance hospitalière pédiatrique initié en 1996 et coordonné par SpF. Il comprend 42 centres hospitaliers. Le CNR coordonne le volet microbiologique de ce réseau. Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.
- Le réseau du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France.
- Le réseau Sentinelles, en partenariat avec SpF et le CNR.
- Au titre de l'unité de recherche BEBP, nous participons de plus au réseau ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne), réseau de 55 pédiatres en ambulatoire.

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est donnée en annexe 2. Pas de changements de nos activités d'expertise pour 2019 et 2020. Le CNR reste un laboratoire de référence pour l'identification ou la confirmation moléculaire des différentes espèces de Bordetelles. Les demandes de vérification ou de confirmation de l'espèce de *Bordetella* détectée chez un patient proviennent principalement de laboratoires hospitaliers et du secteur privé.

En cas de signalement par l'ARS de cas groupés de coqueluche dans une collectivité comme un établissement scolaire, en lien avec SpF, le CNR apporte son expertise en vérifiant l'espèce de Bordetelle responsable de l'infection. En 2019, le CNR a confirmé une co-infection à *B. pertussis* et *B. parapertussis* dans une école maternelle.

2.1. Évolutions des techniques

Depuis 2018, le CNR utilise en routine l'approche de séquençage génomique et core genome *multilocus* sequence typing (cgMLST). Nous avons montré (Bouchez *et al.*, EID, 2018) que cette approche permet de déterminer avec une bonne probabilité, l'appartenance de souches à la même chaîne de transmission (cas groupés familiaux).

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

a) Trousse « VIASURE Bordetella : suite de l'évaluation commencée en 2018

En 2018, nous avons évalué la trousse Viasure (Certest) distribuée 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*). L'utilisation de la trousse VIASURE avec notre thermocycleur de référence LC480 de Roche nécessitait la mise en place d'un fichier de compensation de couleur permettant d'éliminer les fluorescences croisées (protocole disponible avec la trousse Viasure). Des difficultés d'interprétation s'étaient présentées avec la cible h-IS1001 pour des échantillons ne contenant pas l'ADN de *B. holmesii* mais pour lesquels des valeurs de Ct avaient été obtenues malgré une courbe d'aspect aplati. C'était probablement la conséquence d'une compensation non optimale lors de l'analyse avec le logiciel du thermocycleur de ROCHE. Il avait été convenu que le fabricant CerTest améliore le paramétrage pour la mise en place du fichier de compensation de couleur sur LC480. La société n'a pas amélioré le paramétrage et par conséquent les tests n'ont pas été poursuivis au niveau du CNR.

Ce problème de compensation de couleur ne concerne pas tous les thermocycleurs. Le laboratoire Cerba, désireux de pouvoir détecter spécifiquement l'ADN de *B. holmesii*, a testé cette même trousse Viasure avec un autre thermocycleur. Disposant de peu d'échantillons positifs à *B. holmesii*, le laboratoire Cerba nous a demandé des échantillons afin de compléter leur validation. Ce travail a fait l'objet d'un poster, qui a été présenté à la RICAI en décembre 2019 et dans lequel le CNR été remercié.

b) FilmArray RP2plus de Biofire (bioMérieux)

En 2019, nous avons évalué la technologie filmArray RP2plus de Biofire (bioMérieux) en collaboration avec l'hôpital de St Joseph (Paris). Le FilmArray Respiratory Panel 2plus (RP2 +) est un test de diagnostic in vitro multiplexé avec une courte durée d'exécution pour la détection simultanée de 22 pathogènes respiratoires, dont *B. pertussis*. Le but de cette étude était d'évaluer les performances du FilmArray RP2 + pour la détection de *B. pertussis*, par rapport à un test de PCR en temps réel simplex (qPCR) ciblant la même séquence (ptxP). Pour cela, dix-huit échantillons (aspirations/écouvillons nasopharyngés et échantillons de contrôle externe de qualité) positifs avec la qPCR IS481 (comparateur) et représentant une gamme de charge bactérienne décroissante, ont été analysés en utilisant les deux approches. 12 échantillons positifs pour *B. pertussis* avec la ptxP qPCR (valeur de Ct entre 18 et 35) ont été trouvés positifs avec RP2 +. 4 échantillons positifs avec la ptxP qPCR (valeur Ct entre 37 et 40) se sont avérés négatifs avec RP2 +. Enfin, 2 échantillons négatifs avec la ptxP qPCR, étaient également négatifs avec RP2 +. Parmi les 18 échantillons positifs avec la qPCR IS481 utilisés comme test de référence, les taux de détection de *B. pertussis* par ptxP qPCR et RP2+ étaient donc de 89% et 67%, respectivement. En conclusion, le test FilmArray RP2+ peut conduire à des résultats faussement négatifs et ne peut détecter que des échantillons fortement chargés (valeur ptxP qPCR Ct \leq 35 ; valeur IS481 qPCR Ct \leq 28).

Ces résultats nous permettent de suggérer aux microbiologistes qu'un résultat négatif avec la technique RP2+ ne doit pas être interprété comme une absence de *B. pertussis* dans les échantillons cliniques. Si le contexte clinique et épidémiologique du patient est en faveur d'une coqueluche, il est conseillé de compléter la recherche de *Bordetella* par une qPCR. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans OFID en 2020 (Guillot et al., 2020 ; cf. section 6.2).

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous envoyons les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou PCR) aux laboratoires hospitaliers ou LABM qui en font la demande. En 2019 et 2020, nous n'avons pas eu de demande.

2.4. Collection de matériel biologique

Mises en collection : En 2019 et 2020, nous avons stocké respectivement, 73 et 25 isolats décrits dans la section 2.5.2.

Distribution de souches : En 2019, nous avons envoyé 1 souche au laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Poitiers.

Description collection en annexe.

2.5. Activités d'expertise dans le cadre de la surveillance, années 2019 et 2020

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 écouvillons naso-pharyngés, expectorations, sérums, ADN

extraits de prélèvements respiratoires) qui proviennent essentiellement de :

- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* hospitalisés et dont les échantillons sont collectés 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 (COL.BVH).

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 2019 et 2020

En 2019, nous avons reçu et caractérisé :

- 72 isolats du genre *Bordetella* ;
- 1 prélèvement positif à partir desquels nous avons obtenu une culture positive ;
- 84 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*.

En 2020, nous avons reçu et caractérisé :

- 23 isolats du genre *Bordetella* ;
- 3 prélèvements positifs à partir desquels nous avons obtenu une culture positive ;
- 7 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*.

L'année 2020 a donc été marquée par une forte diminution du nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR.

Parmi les 91 prélèvements ou ADN extraits analysés au total en 2019 et 2020, nous avons obtenu (hors doublons) 42 PCR positives à *B. pertussis* (dont 4 en 2020), 11 PCR positives à *B. holmesii*, 4 PCR positives à *B. parapertussis*. Nous avons également obtenu 5 PCR positives à la fois à 2 espèces de Bordetelles (le plus souvent *B. pertussis* et *B. parapertussis*) et 18 PCR positives à *Bordetella* pour lesquelles l'espèce n'a pas pu être précisée.

Les isolats, isolés ou reçus pour confirmation de l'identification au CNR en 2019 et 2020, sont présentés dans le **Tableau** ci-dessous :

Tableau : Nombre d'isolats reçus ou isolés au CNR en 2019 et 2020

Source	Espèces	2019	2020
RENACOQ			
	<i>B. pertussis</i>	41	9
	<i>B. parapertussis</i>	3	0
HORS RENACOQ (dont COL.BVH)			
	<i>B. pertussis</i>	7	2
	<i>B. bronchiseptica</i>	5	6
	<i>B. holmesii</i>	6	2
	<i>B. hinzii</i>	3	3
	<i>B. trematum</i>	4	0
	<i>B. petrii</i>	2	2
LABM			
	<i>B. hinzii</i>	2	0
	<i>B. bronchiseptica</i>	0	1
Total		73	25

Les origines des isolats sont résumées ci-dessous.

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

- *B. pertussis* : En 2019, 73 isolats pour lesquels 86% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ. Les autres isolats ont été envoyés par les hôpitaux de Poitiers et d'Annecy.

En 2020, 11 isolats pour lesquels 82% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ. Les autres isolats ont été envoyés par les hôpitaux de Poitiers et de Chambéry.

- *B. parapertussis* : En 2019, nous avons reçu 3 isolats en provenance du réseau RENACOQ. Nous n'avons pas reçu d'isolats de *B. parapertussis* en 2020.

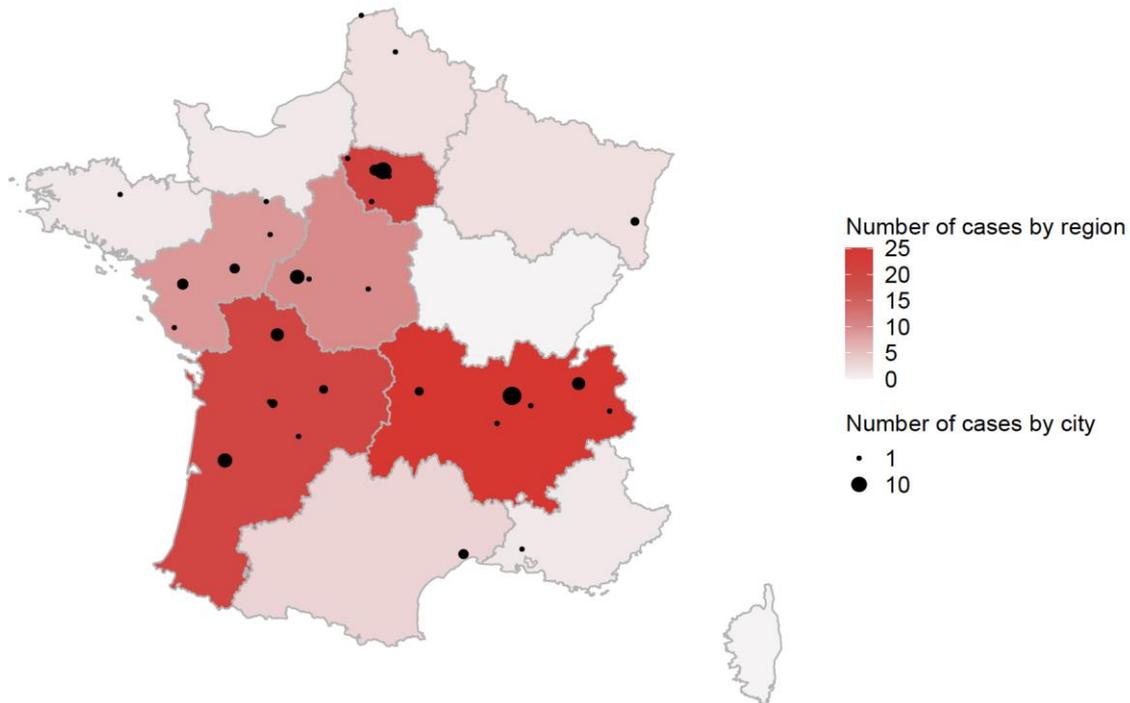
- Autres espèces du genre *Bordetella* :

Les isolats reçus en 2019 et 2020 provenaient du collège de Bactériologie Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France :

- 12 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance des hôpitaux d'Angoulême, de Calais, de Montauban, de la Croix Rousse à Lyon (n=2), de la Pitié Salpêtrière à Paris, de Périgueux, de Salon de Provence, de la Roche sur Yon et de St Pierre de la Réunion ;
- 8 isolats de *B. holmesii* en provenance des hôpitaux de Cergy-Pontoise, de Colmar, de Bourgoin-Jailleu, d'Étampes, de Poitiers, de Soyaux (double patient), et de Suresnes ;
- 8 isolats de *B. hinzii* en provenance des hôpitaux de Chambray-lès-Tours, de Castres, de la Croix-Rousse à Lyon, de Poitiers, de Saint Brieuc, de Vierzon, et également en provenance du LABM de Clermont Ferrand (n=2) ;
- 4 isolats de *B. trematum* en provenance des hôpitaux d'Alençon, de Barlin, de Saint Louis à Paris et de Pointe-à-Pitre ;
- 2 isolats de *B. petrii* en provenance des hôpitaux de Suresnes et de St Pierre de la Réunion.

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

Figure. Répartition géographique des isolats de *Bordetella* envoyés au CNR en 2019 et 2020



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 si besoin par immunofluorescence ;
- Génotypage des gènes qui codent pour la pertactine (gène *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 (gènes *fim2* et *fim3*) ;
- Typage des isolats par séquençage génomique (approche cgMLST).

2.5.4 Nombre de qPCR et de sérologies réalisées en 2019 et 2020

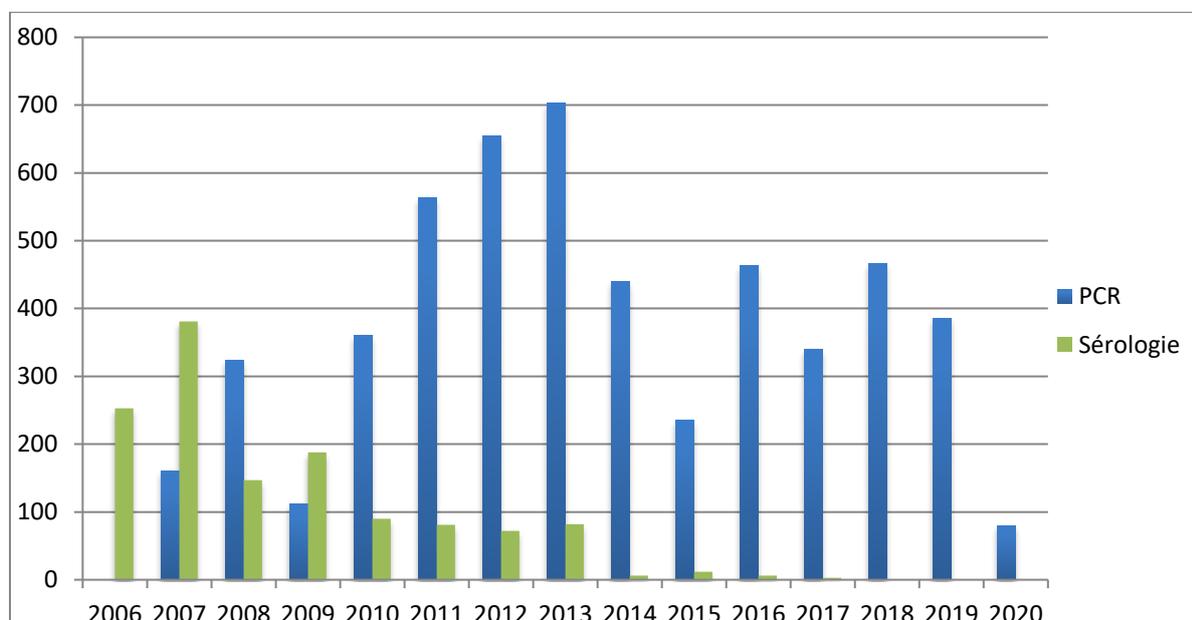
- Le nombre de qPCR effectuées par le CNR en 2019 et 2020 est présenté dans le **Tableau ci-dessous**. Pour un échantillon donné, plusieurs qPCR peuvent être réalisées (se reporter à la liste détaillée des cibles PCR dans l'annexe 2). Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance RENACOQ, à la demande des ARS (notamment lors de cas groupés de coqueluche dans une école) mais en 2019 uniquement, et dans le cadre du contrôle externe de qualité (QCMD BPDNA2019 et BPDNA2020).

Tableau : Nombre de qPCR réalisées en 2019 et 2020

Type de PCR	2019	2020
Surveillance RENACOQ Pertinent /LABM	155	43
Cas groupés	124	0
Contrôle Externe de Qualité	36	37
Test trousse diagnostic multiplexée	71	0
Total	386	80

- La **Figure ci-dessous** montre l'évolution du nombre de PCR et sérologies réalisées de 2006 à 2020. On observe que le nombre de sérologies à visée diagnostique 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). On observe aussi une diminution importante du nombre de PCR réalisées en 2020, dans un contexte de pandémie de COVID-19.

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



2.5.5 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.

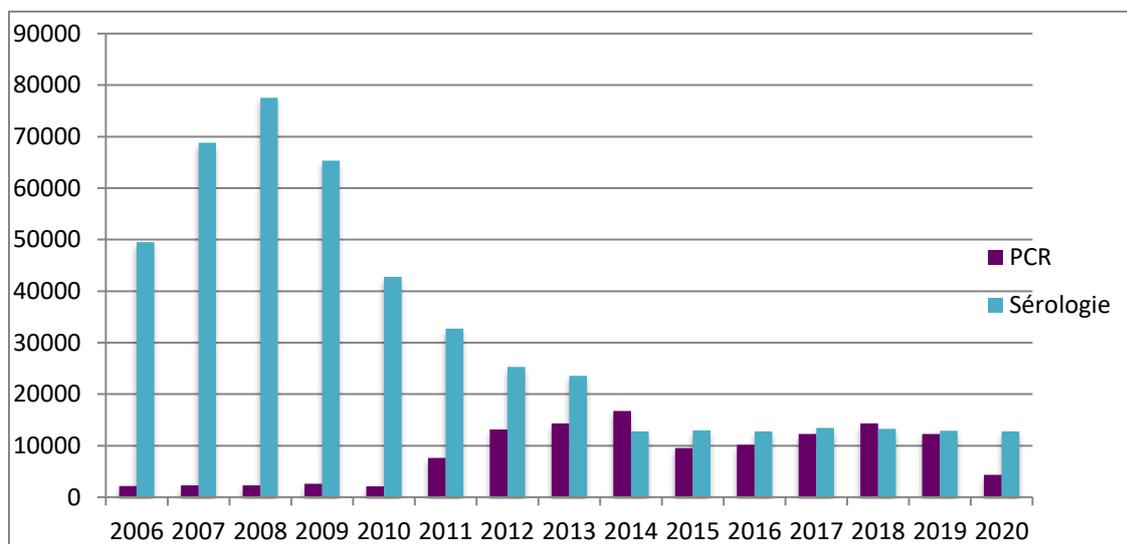
PCR. Le nombre de PCR (IS481) réalisées par ce laboratoire en 2019 est de 12 246 ; il a légèrement diminué par rapport à 2018 (n =14325) et est revenu au niveau de 2017 (12 266 ; **Figure ci-dessous**).

Sur ces 12 246 PCR, 8,9% étaient positives (majoritairement PCR IS481), indiquant une stabilité de la proportion de PCR positives en 2019 par rapport à 2018 (8,9%).

Le nombre de PCR réalisées par ce laboratoire en 2020 est seulement de 4 359. Nous constatons donc une forte baisse des demandes de PCR pour le diagnostic de la coqueluche en secteur privé, dans un contexte sanitaire exceptionnel dû à la COVID19. Sur ces 4 359 PCR de 2020, 4% seulement étaient positives (majoritairement PCR IS481), indiquant une diminution de plus de moitié de la proportion de PCR positives en 2020 par rapport à 2019. De plus, à partir du mois d'août jusqu'à fin décembre 2020, toutes les demandes de PCR coqueluche se sont avérées négatives. Nous supposons que les gestes barrières et les mesures de confinement pour enrayer l'épidémie du COVID19 ont impacté la circulation des agents de la coqueluche.

Sérologies. Les demandes de sérologie coqueluche adressées au laboratoire Cerba ont été au nombre de 12 881 en 2019 et de 12 779 en 2020 (**Figure ci-dessous**). Nous n'observons pas de baisse de demandes de sérologies en 2020. Depuis 2014, le nombre de sérologies est stable malgré les 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. Nombre de PCR et sérologies réalisées par le laboratoire Cerba, 2006-2020.



2.5.6 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 antibioprophylaxie lors de cas groupés de coqueluche. Les résultats sont présentés dans la section 3.2.

2.6 Activités de séquençage

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

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 HUB de Bio-informatique et Bio-statistique, 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 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-Pasteur (pour le génotypage cgMLST, le génotypage des gènes de virulence et antigènes vaccinaux), 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 ?**

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 cgMSLT (Bouchez et al. EID 2018) 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 avons ainsi constitué une base de données génomiques pour les isolats de *B. pertussis* PRN- et sommes en train de finaliser le développement d'un outil « PRN-check » qui permettra à partir des données de séquençage de déterminer directement si les souches produisent la pertactine et quel événement génomique explique la perte de production de la PRN. Cet outil pourra à l'avenir être testé sur des métagénomés d'échantillons cliniques en cas de culture négative.

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

Non applicable.

- Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

Nombres de séquences réalisées :

En 2019 : 87

En 2020 : 25

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) ?

Nous déposons les séquences brutes au format fastq dans ENA, et les assemblages sont rendus publics dans ENA et notre plateforme BIGSdb (<https://bigfdb.pasteur.fr/bordetella/bordetella.html>). Les séquences sont rendues publiques à l'occasion de nos publications et partagées avec nos collaborateurs internationaux en amont des publications.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En France, la surveillance de la coqueluche est réalisée grâce à plusieurs réseaux :

- Le réseau RENACOQ (Réseau de surveillance hospitalière pédiatrique, initié en 1996, coordonné par SpF et comprenant 42 centres hospitaliers et le CNR). Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.
- Le réseau du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France.
- Le réseau Sentinelles, en partenariat avec SpF et le CNR.
- 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 : *B. pertussis* et *B. parapertussis*

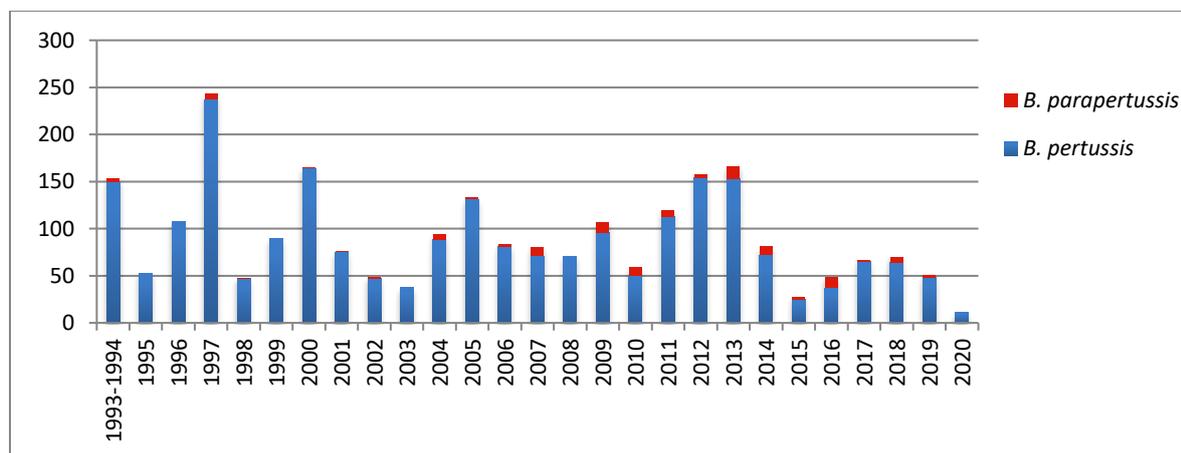
En 2019 et 2020, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et *B. parapertussis*. Afin de fournir une perspective historique, l'évolution du nombre d'isolats par espèce de *Bordetella* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans la **Figure** ci-dessous. L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles de 3 à 5 ans. Le dernier cycle épidémique en France semble correspondre aux années 2015-2020 avec un pic à cheval sur 2017 et 2018.

B. pertussis : Le nombre de souches de *B. pertussis* de 2019 (n = 48) a diminué par rapport à 2018 (n= 64). Le nombre de souches reçues en 2020 (n = 11) a fortement chuté par comparaison avec les années précédentes. On peut y voir un effet combiné de la fin du cycle épidémique 2015-2020 et du contexte sanitaire exceptionnel dû à la COVID-19.

B. parapertussis, le second agent de la coqueluche, montre une incidence qui reste faible par comparaison avec celle de *B. pertussis*. En 2019, le nombre de souches de cette espèce est de 3. Nous n'en avons pas reçu en 2020.

De plus, on note que le dernier pic de 2017-2018 est un pic modéré par rapport aux pics précédents. Il n'y a donc pas de réémergence de la coqueluche en France, contrairement à la situation observée dans d'autres pays.

Figure : Nombre d'isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR depuis 1993



Répartition par classe d'âge :

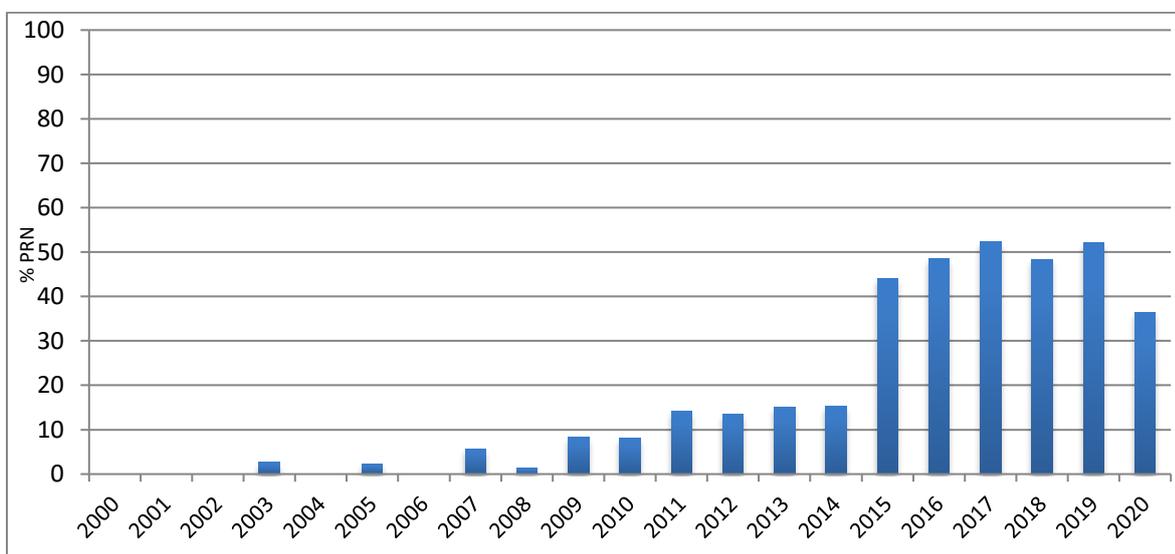
Concernant l'âge des patients sur lesquels les isolats de *B. pertussis* ont été collectés et envoyés au CNR, la proportion la plus élevée est chez des nouveau-nés âgés de moins de 6 mois (54% en 2019 et 55% en 2020). La proportion des isolats collectés chez les enfants âgés entre 2 et 8 ans est de 17% en 2019 et de 18% en 2020.

Surveillance de l'évolution des antigènes :

La surveillance des antigènes vise à caractériser une possible évolution des populations par divergence antigénique ou perte de l'expression des antigènes, sous pression de sélection induite par la vaccination des populations. Les vaccins coqueluche sous-unitaires utilisés en France sont soit bi-valents (PT + FHA ; PENTAVAC/TETRAVAC®, HEXYON), soit tri-valents (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. La proportion des souches qui ne produisent pas PRN (PRN-) continue à augmenter, de 48,4% en 2018 à 52,1 % en 2019 (**Figure ci-dessous**). En 2020, la proportion des souches qui ne produisent pas PRN a diminué à 36,4 % mais il ne faut pas sur-interpréter ce résultat du fait du faible nombre d'isolats collectés.

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



De multiples lignées PRN- ont évolué indépendamment. La non-production de la pertactine est due, pour plus de la moitié des souches PRN- (i.e. 17/28), à deux principaux événements génomiques : l'insertion d'une IS481 au sein du gène *prn* 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 *prn* ou de son promoteur pour les autres isolats PRN-.

Variants de la PRN : En 2019 et 2020, le variant protéique de la PRN (pour les souches de *B. pertussis* qui la produisent) est de type PRN2 pour tous les isolats, comme la plupart des souches circulant depuis 1990.

Concernant *B. parapertussis*, les 3 souches isolées en 2019 ne produisent pas la pertactine ; tout comme 99% des souches de *B. parapertussis* circulant depuis 2007.

- TOXINE DE PERTUSSIS. La dernière souche de *B. pertussis* qui ne produit pas la toxine de pertussis (PT) a été collectée en 2018. La non production de PT était 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 avaient été décrits en France avant celle de 2018 (Bouchez et al, Vaccine 2009 ; 27 : 6034-6041) et aux USA (Williams et al, EID. 2016 ;22(2):319-322). Nous avons depuis réalisé une étude rétrospective sur une période de 23 ans (1996-2019) qui a montré que les isolats PT- existaient avant l'introduction de la vaccination acellulaire (Bouchez *et al.*, accepté dans EuroSurveillance). Au cours de ces 23 années, seuls 5 isolats PT- ont été identifiés au total.

- ✓ **Allèles des gènes codant la toxine PT.** En 2019 et 2020, l'allèle du gène de la sous-unité S1 de la toxine de pertussis (PT) est, pour toutes les souches de *B. pertussis*, de type *ptx1A*.
- ✓ **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 2019 et 2020, en France, toutes les souches sont de type *ptxP3*, comme dans les années précédentes.

- HAEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE. De la même façon que pour les souches PT-, les souches de *B. pertussis* FHA-négatives (FHA-) sont rares, la dernière identifiée en France datant de 2013. Au cours de la même étude rétrospective citée ci-dessus, nous avons identifié au total 5 isolats FHA- entre 1996 et 2019.

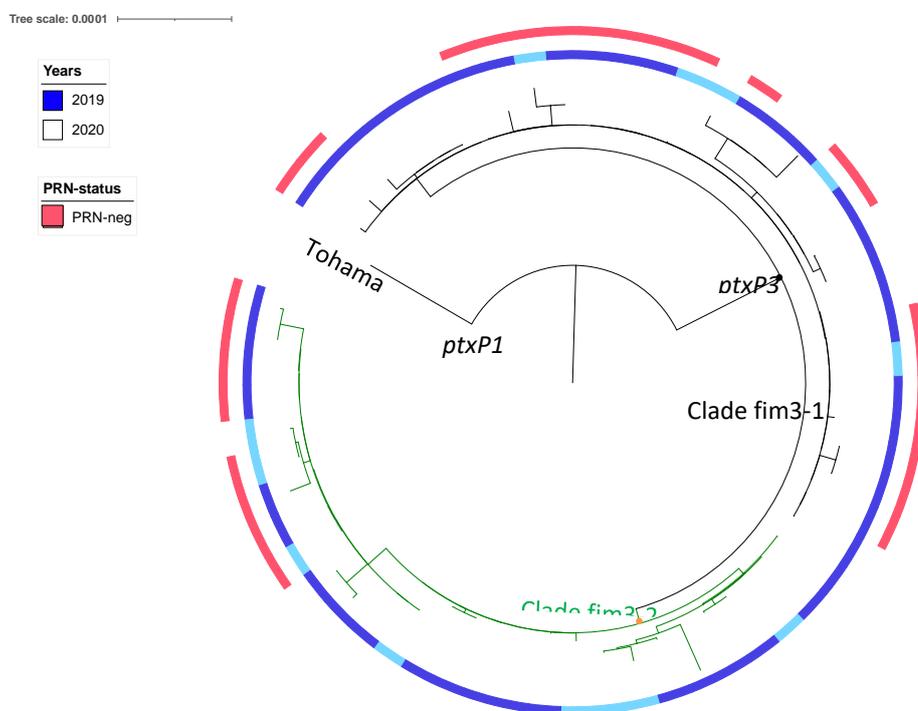
- FIMBRIAE DE TYPE 2 ET 3 : les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux fimbriae différentes, le plus souvent de manière exclusive, ou très rarement en combinaison. Les isolats de 2019 produisent majoritairement (65%) FIM3, de façon similaire à 2018 (70%). Symétriquement, la proportion des isolats qui produisent FIM2 en 2019 (35%) a légèrement augmenté par rapport à 2018 (30%). Les isolats de 2020 produisent tous FIM3 mais il faut modérer ce résultat du fait du faible nombre d'isolats collectés.

- ✓ **Allèles de *fim2* et *fim3*** : toutes les souches de *B. pertussis* en 2019 et 2020 portent l'allèle *fim2*-1 sauf 3 (2 *fim2*-5 et 1 *fim2*, en cours d'investigation). 58% des souches de *B. pertussis* de 2019 portent l'allèle *fim3*-1, 42% des souches portent l'allèle *fim3*-2. En 2020, les pourcentages sont inversés : en effet, seulement 27% des souches de *B. pertussis* portent l'allèle *fim3*-1 et 73% des souches portent l'allèle *fim3*-2. Là encore, ces résultats sont à interpréter dans le contexte d'un faible effectif total en 2020.

Diversité phylogénétique des souches

La diversité des souches de *B. pertussis* reçues au CNR en 2019 et 2020 a été étudiée par génomique (cgMLST). La **Figure ci-dessous** présente un arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences des 2038 gènes constituant le schéma cgMLST. L'arbre est enraciné avec la souche de référence Tohama. Tous les isolats 2019 et 2020 appartiennent à la branche *ptxP3*. On distingue deux clades principaux, identifiés chacun par leur allèle du gène *fim3* (clade *fim3*-1 en noir et clade *fim3*-2 en vert). Les isolats PRN-négatifs sont présents dans les deux clades.

Figure. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des isolats de *B. pertussis* reçus au CNR en 2019-2020.



Conclusions

En résumé, les caractéristiques des souches circulantes de *B. pertussis* sont stables.

3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

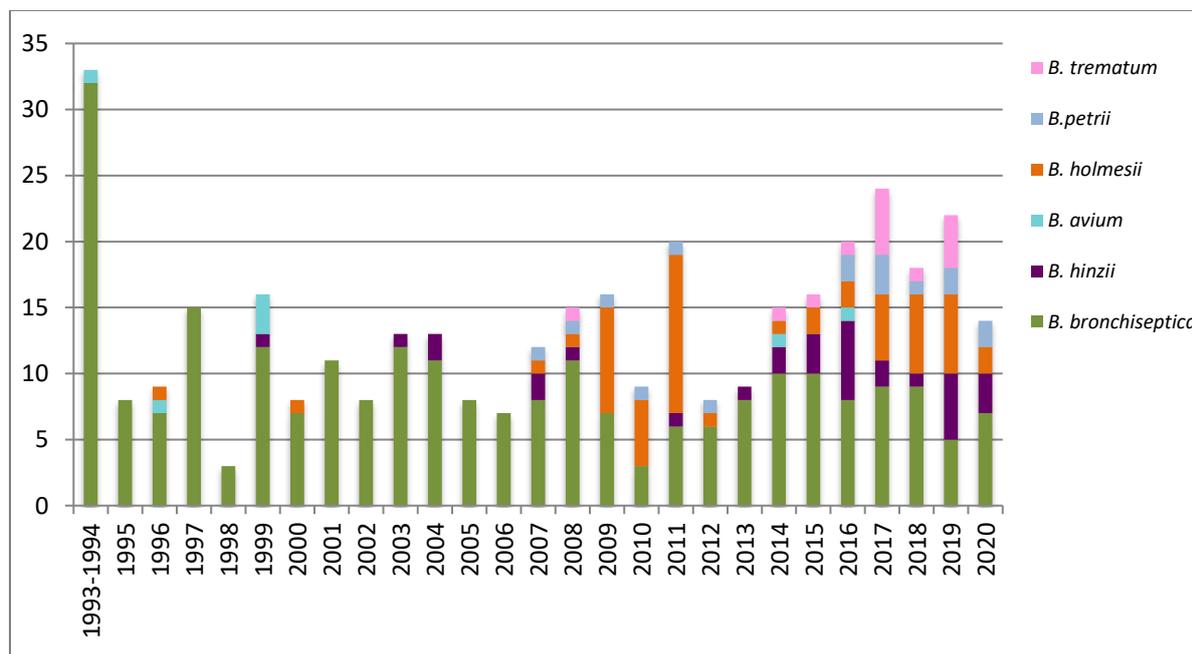
❖ Infections humaines à *B. bronchiseptica*

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 2019 et 2020, nous avons reçu respectivement 5 et 7 isolats de *B. bronchiseptica* au CNR, un nombre stable par rapport aux années précédentes (**Figure ci-dessous**). Il s'agit principalement de cas d'infections chez des adultes âgés de plus de 50 ans (les âges se répartissent entre 50 et 88 ans) avec une comorbidité sous-jacente (par exemple, BPCO). Concernant les patients hospitalisés, ils l'ont été pour une infection respiratoire basse.

Il est à remarquer qu'en 2020, 2 cas d'infection à *B. bronchiseptica* concernaient des patients COVID19 positifs.

Figure : Nombre d'isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1993, hors *B. pertussis* et *B. parapertussis*



❖ Autres bordetelloses humaines

✓ *B. hinzii* :

Bordetella hinzii 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 2019, nous avons reçu 5

souches de *B. hinzii* isolées chez des patient(e)s adultes âgés de plus de 60 ans (61, 63 75, 76 et 86 ans) souffrant d'une infection pulmonaire pour 4 d'entre eux.

En 2020, nous avons reçu 2 souches de *B. hinzii*. Il s'agit d'une part d'un cas d'infection respiratoire post COVID19 chez un patient âgé de 66 ans et d'autre part d'un cas d'infection urinaire chez un adulte âgé de 38 ans chez qui la souche a été isolée dans l'urine.

L'analyse des séquences génomiques en cours devrait nous permettre d'établir un éventuel lien épidémiologique entre ces cas.

✓ *B. holmesii* :

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

En 2019 et 2020, nous avons reçu respectivement 6 (dont un doublon patient) et 2 isolats de *B. holmesii* au CNR, un nombre en diminution en 2020 (Figure ci-dessus). Les souches ont été isolées chez des patient(e)s adolescent(e)s ou adultes. Les cas ayant nécessité une hospitalisation concernent :

- Un patient âgé de 8 ans, drépanocytaire ; 1 patiente âgée de 19 ans, ayant des bouffées délirantes et des tremblements ; 1 patiente âgée de 20 ans, avec céphalées et fièvre, anciennement splénectomisée et ayant subi une greffe hépatique en 2014 ; 1 patient âgé de 75 ans, immunodéprimé, dans un contexte de leucémie ; 1 patiente âgée de 87 ans, insuffisante cardiaque, souffrant d'une pneumopathie. Pour ces 5 cas, la souche a été isolée d'une hémoculture.

- Un patient âgé de 72 ans ayant un épanchement articulaire du genou suite à une chirurgie orthopédique. La souche a été isolée à partir d'une ponction de liquide articulaire.

✓ *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.

En 2019 et 2020, nous avons reçu respectivement 2 et 2 isolats au CNR. Chez 2 patient(e)s (23 et 30 ans) atteints de mucoviscidose, dont la souche a été isolée à partir d'un prélèvement respiratoire systématique lors d'un contrôle à l'hôpital. Deux isolats ont été identifiés chez la même patiente, à 8 mois d'intervalle. Enfin, un isolat a été identifié chez un 3eme patient, âgé de 77 ans, sur un prélèvement respiratoire réalisé dans un contexte d'exacerbation de BPCO.

✓ *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.

Nous avons reçu 4 souches en 2019 et aucune en 2020. Une souche a été isolée chez un patient âgé de 17 ans souffrant d'otite chronique dont l'état ne nécessitait pas une hospitalisation. Une souche a été isolée d'une lésion cutanée chez un patient âgé de 24 ans, hospitalisé pour brûlures corporelles. Une souche a

été isolée à partir d'une culture de liquide péritonéal chez un patient (71 ans) sous dialyse péritonéale. Enfin, une souche a été isolée dans le liquide péritonéal chez un patient âgé de 69 ans dans le cadre d'une péritonite.

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

Macrolides. Un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides avait été isolé en 2011, pour la première fois en France et en Europe (Guillot *et al.* Emerg Infect Dis. 2012). Depuis, nous n'avons pas observé de nouveau cas d'isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France, y compris en 2019 et 2020. Des *B. pertussis* résistants aux macrolides circulent notamment en Chine. Il est important de surveiller l'émergence, l'introduction et la diffusion de telles souches en France.

Céfalexine. En 2019 et 2020, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *B. pertussis* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine. Il est important de vérifier 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 souches en parallèle avec et sans cet antibiotique. Les 3 isolats de *B. parapertussis* de 2019 étaient également résistants *in vitro* à la céfalexine, comme précédemment.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

Projet PERTINENT. Nous participons au projet Pertinent de surveillance de la coqueluche à l'échelle européenne qui a démarré en décembre 2015 (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 contribuons à la validation des données biologiques pour une vingtaine de centres hospitaliers français qui font partie du réseau RENACOQ et qui participent à Pertinent. En 2019, 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.

Cette étude observationnelle visait à estimer l'incidence annuelle de la coqueluche par site (République Tchèque, France, Irlande, Italie, Norvège, régions de Catalogne et de Navarre en Espagne) de 2016 à 2018 et les tendances respectives entre 2017 et 2018. Les cas de coqueluche ont été décrits, y compris leur sévérité. Un protocole générique a été développé pour harmoniser les pratiques entre les sites. Les cas étaient des nourrissons hospitalisés testés positifs pour *Bordetella pertussis* par PCR ou culture. Les 7 sites ont recueilli des données démographiques, cliniques, de laboratoire, le statut vaccinal et les facteurs de risque/de protection. L'incidence annuelle des sites a été estimée en divisant le nombre de cas par la population captée. Entre décembre 2015 à décembre 2018, il a été identifié 469 cas (247 hommes ; 53%). L'âge médian, le poids à la naissance et l'âge gestationnel étaient de 2,5 mois, 3 280 g et 39 semaines. Trente cas (6%) avaient une présentation atypique soit avec toux ou cyanose uniquement, soit avec absence de symptômes de type coquelucheux. Sur 330 cas avec information, 83 (25%) ont été admis dans

des unités de soins intensifs dont cinq nourrissons décédés trop jeunes pour être vaccinés. L'incidence semble avoir diminué entre 2017 et 2018 dans tous les sites sauf un. Une surveillance renforcée de la coqueluche hospitalisée en Europe est essentielle pour suivre l'épidémiologie de la coqueluche et la charge de morbidité. Cette étude a fait l'objet d'une publication (Merdrignac et al., EuroSurveillance, 2021).

Projet EUpertStrain. Nous continuons à participer au réseau européen de laboratoires de référence EUpertStrain. Dans ce cadre, nous échangeons des isolats cliniques de *B. pertussis* pour la comparaison des souches à l'échelle Européenne. Le CNR a participé aux études EUpert I-IV qui ont consisté à caractériser temporellement les isolats de *B. pertussis* collectés entre 1998 et 2015 dans 9 laboratoires de référence européens. Cette étude a mis en évidence une augmentation de la proportion des souches de *Bordetella pertussis* qui ne produisent plus la pertactine, à l'échelle Européenne. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Barkhof et al., Eurosurveillance, 2019). Le réseau EuPertStrain se réunit une fois par an. En 2020, le CNR français a organisé la réunion annuelle (en visioconférence ; 128 participants). Nous coordonnons également une étude génomique dans le cadre de ce réseau (voir plus bas, partie recherche).

Réseau EUpert-LabNet. Nous participons au projet EUpert-LabNet, financé par l'ECDC, visant à coordonner le réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche à l'échelle Européenne, 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, par exemple via des EQA.

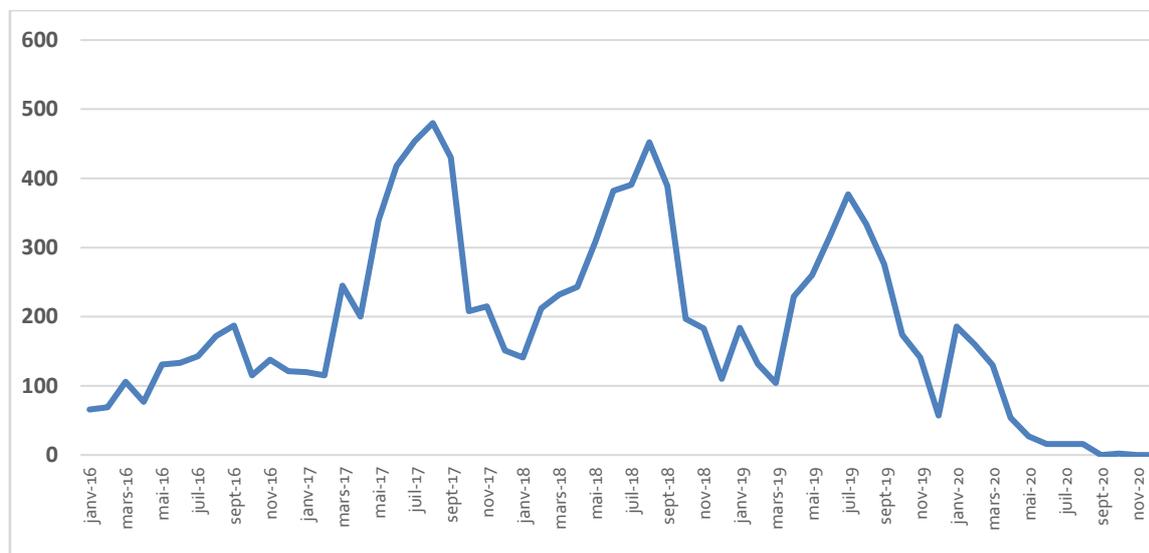
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Nous collaborons activement avec les laboratoires de biologie médicale Cerba (groupe Cerballiance) et Eurofins-Biomnis qui réalisent plus de 90% des tests de diagnostic coqueluche en France. La biologiste de Cerba en charge du diagnostic de la coqueluche pour les laboratoires du groupe Cerballiance avait contacté le CNR début juillet 2017 pour l'informer d'une recrudescence des cas de coqueluche diagnostiqués par PCR. En conséquence de quoi, le CNR avait alerté SpF et une réunion avec l'équipe de SpF avait été organisée pour discuter des tendances observées au courant de l'année 2017. Depuis 2018, suite à une réunion avec les laboratoires Cerba et Eurofins-Biomnis, ces laboratoires envoient régulièrement au CNR les données de PCR *Bordetella*. Nous avons donc pu analyser les données de PCR des 2 laboratoires pour les années 2016, 2017 et 2018. Ces données ont montré que le nombre de PCR IS481 positives avait 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 ci-dessous**). Ces données correspondent à une population différente des patients du réseau RENACOQ puisqu'il s'agit d'une population plus âgée avec une médiane d'âge aux alentours de 19 ans.

En 2019, les données montrent également un pic en été mais avec une légère baisse du nombre de PCR positives par rapport à 2017-2018. En 2020, les trois premiers mois montrent une augmentation du nombre de PCR positives par rapport à décembre 2019 puis on observe une diminution importante à partir d'avril 2020. Les chiffres sont quasiment nuls à partir de septembre 2020. Il semble que les gestes barrières, mis

en place au début de l'épidémie COVID19 avec le port du masque et le nettoyage des mains, aient contribué à la faible circulation du pathogène.

Figure. Nombre de PCR IS481 positives issues des données des laboratoires Cerba et Eurofins-Biomnis entre janvier 2016 et décembre 2020



4 Alerte

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande aux personnels médicaux qui sont à l'origine de l'identification des cas 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 janvier 2019, l'ARS d'Occitanie (OC) nous a contacté afin de nous signaler des cas groupés de coqueluche dans une école maternelle. Le CNR a été sollicité pour confirmer l'espèce de Bordetelle. Des PCR complémentaires ont été effectuées sur 3 échantillons positifs et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis* pour 2 cas. Pour le 3ème cas, la quantité d'ADN bactérien présent dans l'échantillon était trop faible pour permettre la détection avec la PCR spécifique de l'espèce *pertussis*. Par contre, la recherche de l'ADN de *Bordetella holmesii* s'est avérée négative.

2) Fin mai 2019, un signalement de cas groupés de coqueluche dans une école maternelle en Côte-d'Or a été fait auprès de l'ARS Bourgogne-Franche-Comté (BFC). Le CNR a été sollicité pour confirmer l'espèce de Bordetelle responsable des cas positifs. Des PCR complémentaires ont été effectuées sur 3 échantillons positifs et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis* pour 1 cas. Pour les 2 autres cas, la quantité d'ADN bactérien présent dans l'échantillon était trop faible pour permettre la détection avec la PCR spécifique de l'espèce *pertussis*. Par contre, la recherche de l'ADN de *Bordetella holmesii* s'est avérée négative pour ces 2 échantillons.

Les investigations faites conjointement par SpF (BFC et DMI, St Maurice) et le CNR ont fait l'objet d'un poster lors des JNI qui se sont déroulées à Poitiers, du 09 au 11 septembre 2020.

3) En juillet 2019, un biologiste médical (LABM de Bourg-St-Maurice) nous a alerté sur les cas positifs dans une école maternelle. Après confirmation de la présence l'espèce de *Bordetella pertussis* dans les 5 échantillons demandés au laboratoire Eurofins-Biomnis, le CNR a alerté la Direction des Maladies Infectieuses à SpF afin que des investigations épidémiologiques soient menées en région.

4) SpF nous a informé de plusieurs cas de coqueluche dans une école maternelle en Isère, entre fin Août et début octobre 2019. Dans le même temps, le laboratoire Eurofins-Biomnis qui centralisait les échantillons pour les laboratoires préleveurs du secteur où se trouvait l'école, nous a contacté pour nous signaler, d'une part la détection de 2 espèces différentes de Bordetelle (*pertussis* et *parapertussis*) dans certains échantillons positifs (n=2) et d'autre part la détection de *B. parapertussis* dans d'autres échantillons positifs (n=3). Le CNR a effectué des PCR complémentaires sur les 5 échantillons positifs envoyés par Eurofins-Biomnis. Le CNR a confirmé les résultats de Eurofins-Biomnis.

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 07 novembre 2019 (3 heures).

Julie Toubiana intervient régulièrement dans le cadre de cours de 2^e et 3^e cycle (Diplômes inter-universitaires, DES de pathologie infectieuse) des études médicales à la Faculté Paris Descartes sur la thématique générale des maladies pédiatriques, une partie en 2019 et 2020, était dédiée à la sensibilisation des futurs médecins, pédiatres et infectiologues à la coqueluche et à ses formes graves chez le nourrisson, à la vaccination contre la coqueluche et aux recommandations HCSP de pratique autour d'un cas.

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

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

Rétro-information aux partenaires ;

*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 : 14/04/2021) : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>.

Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2018) est en ligne sur le site web du CNR. Le rapport de 2019 sera mis en ligne en même temps que celui de 2020.

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 2019 et 2020

	2019	2020
Hôpitaux	18	13
Pédiatres, Médecins généralistes, Biologiste LABM	20	5
Collectivités	5	2
Particulier	2	3
Total	45	23

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.

- **Évolution des antigènes vaccinaux dans les populations françaises de *Bordetella pertussis***

En 2019-2020, nous avons réalisé une étude rétrospective sur les 23 dernières années des isolats de *Bordetella pertussis* collectés au CNR via le réseau RENACOQ et avons montré que les isolats ne produisant plus la PT ou la FHA sont très peu fréquents et circulaient déjà avant l'introduction de la vaccination acellulaire, alors que les isolats ne produisant pas la pertactine sont en constante augmentation et représentent désormais près de 50% des isolats collectés au CNR les dernières années. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans EuroSurveillance (Bouchez et al., *in press*).

- **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., Eurosurveillance, 2019).

- **Case report d'un isolat de *Bordetella parapertussis* issu d'une bactériémie.**

Une description de cas d'infection par un isolat atypique de *Bordetella parapertussis* issu d'une bactériémie, a été publié en 2019 dans Open Forum Infect Dis journal. Cette étude comprend la description clinique du cas, avec la caractérisation microbiologique et génomique de l'isolat (Toubiana *et al.*).

- **Participation à une étude prospective afin de comparer la durée de protection en fonction du type de vaccin à germes entiers vs acellulaire suite à l'apparition de cas groupés dans des établissements scolaires (collèges-lycée)**

SpF, en lien avec le CNR pour le versant microbiologique, a mené une étude prospective en 2013 pour comparer l'efficacité et la durée de protection des vaccins anticoquelucheux à germes entiers versus acellulaires, suite à l'apparition de cas groupés de coqueluche dans des établissements scolaires. A la suite de 7 épisodes de cas groupés, il a été identifié 102 cas cliniques de coqueluche, dont 10 cas confirmés biologiquement par PCR spécifique de *B. pertussis*, parmi une cohorte de 305 enfants allant de la seconde à la 6e année (élèves nés entre 2002 et 2006, période pendant laquelle les deux types de vaccin étaient

utilisés). Le risque de coqueluche lorsqu'un individu a été vacciné avec un vaccin acellulaire seul était 1,6 fois plus élevé que lorsqu'il avait été vacciné avec un vaccin à germes entiers ou en utilisant un calendrier combiné. En conclusion de cette étude, la durée limitée de protection conférée par le vaccin acellulaire renforce l'intérêt de l'introduction en 2013 du rappel anticoquelucheux à l'âge de six ans. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication (Belchior et al., *Med Mal Infect*, 2020). Bien que cette étude porte sur des cas ayant eu lieu en 2013, il nous a semblé utile de présenter les résultats dans le rapport correspondant à l'année de la publication.

- **Participation à une étude européenne de séro-épidémiologie**

Le CNR a participé à une étude européenne dans le cadre du consortium ECDC/EUPert-Labnet de séro-épidémiologie qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphthérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne (UE) et dans l'Espace économique européen (EEE) dans les tranches d'âge de 40 à 49 ans et de 50 à 59 ans. Les 18 pays participants ont chacun collecté environ 500 sérums entre 2015 et 2018 qui ont été analysés pour les anticorps spécifiques aux IgG-DTC. La proportion de sérums contenant des taux d'anticorps contre la toxine de pertussis ≥ 100 UI / ml, indiquant une exposition récente à la coqueluche, était comparable pour 13 des 18 pays, variant entre 2,7 et 5,8%. En conclusion de cette étude, la séroprévalence de la coqueluche dans ces groupes d'âge indique une circulation de *B. pertussis* à travers l'UE / EEE (Berbers *et al.*, *Nature Communications* 2021).

- **Étude des facteurs déterminants pour les choix en terme de politique vaccinale basée sur 5 pays européens**

Une étude coordonnée par le CNR a été menée pour comprendre les déterminants liés aux différentes politiques vaccinales des pays Européens. Entre mars et mai 2019, plusieurs experts issus des agences de santé publique ou d'institutions de recherche de 5 pays européens (Danemark, France, Suède, Pologne et UK) ont été sondés selon une méthodologie standardisée. Leurs réponses ont été codifiées et analysées, apportant un éclairage original sur les facteurs qui ont été déterminants pour les choix effectués en termes de politique vaccinale contre la coqueluche. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Wong et al., *Vaccines*, 2020).

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

L'analyse de souches tunisiennes collectées en 2014 lors d'un pic épidémique dans ce pays a montré que les souches sont diverses, différentes des souches vaccinales utilisées en Tunisie (vaccins à germes entiers) et de caractéristiques antigéniques similaires à celles circulant dans les pays (dont la France) utilisant les vaccins sous unitaires (acellulaires). L'analyse génomique des isolats tunisiens a fait l'objet d'une publication (Ben Fraj et al., *JMM*, 2019).

- **Librairie génomique internationale des isolats de *Bordetella***

En 2018, nous avons publié le développement d'une méthode cgMLST pour analyser finement le génotype des isolats de *B. pertussis* (Bouchez *et al.*, Emerg Inf. Dis, 2018). 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 est utilisé par nos collègues à l'échelle internationale et facilitera la compréhension commune de la circulation globale des isolats. Nous avons implémenté ce schéma sur la plateforme BigsDb de l'Institut Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr>). Un problème était que le schéma MLST classique basé sur 7 gènes, était hébergé à Oxford (plateforme PubMLST) ainsi qu'un schéma applicable à l'ensemble du genre *Bordetella*.

En 2020, en accord avec nos collègues d'Oxford, nous avons entrepris un travail de fusion des bases BigsDB de l'Institut Pasteur et d'Oxford afin de simplifier la situation pour les utilisateurs et de pouvoir typer les souches à la fois pour le MLST, les gènes d'antigènes et le cgMLST. Ce travail est en cours de finalisation et permettra d'utiliser des schémas de typage pour l'ensemble du genre *Bordetella*, en plus de *B. pertussis*. Notre schéma de génotypage des principaux gènes d'antigènes vaccinaux et/ou de virulence utilisé manuellement depuis plusieurs années, ainsi qu'un nouveau système pour détecter la résistance aux macrolides, ont également été intégrés sur cette plateforme et permettront de définir simultanément les allèles des gènes d'importance pour la surveillance.

Nous avons appliqué ce schéma aux isolats collectés en 2019 et 2020. Nous avons ainsi pu constater que tous les isolats présentent les mêmes allèles pour les locus suivants : ptxP (allèle 3), ptxA=ptxS1 (allèle 1), ptxB=ptxS2 (allèle 1), ptxC=ptxS3 (allèle 4), ptxD=ptxS4 (allèle 1), ptxD=ptxS5 (allèle 1), bapC (allèle 1), brkA (allèle 1), brkB (allèle 1), OmpP (allèle 1), OmpQ (allèle 4), cyaA (allèle 4). Des différences ont été observées pour les locus fim2 et fim3 conformément aux résultats présentés en section 3.1.1 mais aussi pour bipA (allèle 3 ou absence d'allèle), tcfA (allèles 2 ou 12) ou encore bvgS (allèles 5 et 71). Aucun allèle associé à la résistance aux macrolides n'a été détecté.

- **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.

En 2019-2020, nous avons séquencé 4 nouveaux isolats de *Bordetella pertussis* de notre collection qui avaient été collectés chez un même patient en 2011 afin de les comparer entre eux. Ces travaux sont en cours de finalisation.

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 (les membres du CNR sont indiqués en gras)

- Merdrignac L, Aït El Belghiti F, Pandolfi E, Jané M, Murphy J, Fabiánová K, García Cenoz M, Flem E, **Guillot S**, Tozzi AE, Carmona G, Habington A, Zavadilová J, Navasués A, Bøås H, Lévy-Brühl D, Ferretti B, Lanaspá M, O'Sullivan N, Křížová P, Fernandino L, Bekkevold T, Hanslik T, Muñoz-Almagro C, Bacci S, Spiteri G, Valenciano M, Moren A; PERTINENT Group; Incidence and severity of pertussis hospitalisations in infants aged less than 1 year in 37 hospitals of six EU/EEA countries, results of PERTINENT sentinel pilot surveillance system, December 2015 to December 2018 . Euro Surveill. 2021 Jan;26(4):1900762.
- Belchior E, **Guillot S**, Poujol I, Thabuis A, Chouin L, Martel M, Delisle E, Six C, Guiso N, Lévy-Bruhl D. Comparison of whole-cell versus acellular pertussis vaccine effectiveness in school clusters of pertussis, France, 2013. Med Mal Infect. 2020 Oct;50(7):617-619.
- **Guillot S**, Mizrahi A, **Armatys N**, Chat L, Le Monnier A, **Brisse S**, **Toubiana J**. Low detection rate of *Bordetella pertussis* using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus, Open Forum Infect Dis., Open Forum Infect Dis. 2020 Jul 2;7(8):ofaa267
- Wong A, Opinel A, Combes SJ, **Toubiana J**, **Brisse S**. Determining Factors for Pertussis Vaccination Policy: A Study in Five EU Countries. Vaccines (Basel). 2020 Jan 26;8(1):46.
- Ben Fraj I, **Bouchez V**, Smaoui H, Kechrid A, **Brisse S**. Genome characteristics of *Bordetella pertussis* isolates from Tunisia. J Med Microbiol. 2019 Sep;68(9):1320-1323. doi: 10.1099/jmm.0.001042.
- **Toubiana J**, Azarnoush S, **Bouchez V**, **Landier A**, **Guillot S**, **Matczak S**, Bonacorsi S, **Brisse S**. *Bordetella parapertussis* Bacteremia: Clinical Expression and Bacterial Genomics Open Forum Infect Dis. 2019 Mar 7;6(4):ofz122.
- Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Hoegh SV, **Guillot S**, Stefanelli P, van Gent M, Berbers G, Vestheim D, Greve-Isdahl M, Wehlin L, Ljungman M, Fry NK, Markey K, He Q. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. Euro Surveill. 2019 Feb;24(7):1700832.

6.2.2 Communications internationales

2019

Valérie Bouchez : Présentations orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée à Rome, le 07 et 08 Octobre 2019: « Understanding whooping cough resurgence in Europe using a population genomic approach »

Valérie Bouchez : Présentation orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée à Rome, le 07 et 08 Octobre 2019: « Quantification of bacterial antigens production by *Bordetella pertussis* clinical isolates using an absolute proteomic quantification method »

2020

Sylvain Brisse : 17 Sept 2020 : Keynote lecture: How ecology, vaccines and antibiotics are driving the evolution of bacterial pathogens (Symposium for the Retirement of Marc Struelens, Chief Microbiologist at ECDC.

Julie Toubiana : présentation orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Impact of recent vaccine schedule changes on *pertussis* epidemiology in France”

Valérie Bouchez : présentation orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Evolution of *Bordetella pertussis* in France over a 23-year period”

Sophie Guillot : présentation orale à la réunion EUpertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Low detection rate of *Bordetella pertussis* using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus”

6.2.3 Communications nationales

2019

Julie Toubiana : présentation orale à la RICAI qui s'est déroulée le 16 et 17 Décembre 2019 « Coqueluche, Actualités du CNR ».

2020

Valérie Bouchez : présentation orale à la RICAI qui s'est déroulée le 14 et 15 Décembre 2020 en visioconférence « Évolution de l'agent de la coqueluche *Bordetella pertussis* en France - Analyse rétrospective sur les 23 dernières années ».

Sophie Guillot : première auteure de la présentation affichée à la RICAI qui s'est déroulée le 14 et 15 Décembre 2020 en visioconférence « Low Detection Rate of *Bordetella pertussis* Using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus ».

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)

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

Nous utilisons en routine 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. Par exemple, 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).

✓ Validation d'anticorps commerciaux pour la détection de la production des antigènes vaccinaux

Il est important de continuer à suivre l'évolution des souches qui n'expriment pas certains antigènes vaccinaux. La vérification de la production de ces antigènes impliqués dans la virulence de la bactérie est faite avec la technique d'immunoempreinte. Cette technique repose notamment sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux qui sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène vaccinal. Ces anticorps ont été fabriqués en interne et les stocks sont limités. Le CNR envisage d'utiliser des anticorps standardisés pour remplacer les stocks « maison ». Des tests nécessaires sont en cours afin d'optimiser les conditions opératoires pour l'utilisation d'anticorps commerciaux.

✓ 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 de 30 souches par pays. Une étudiante de M2 (puis thèse) et une post-doc ont été recrutées pour contribuer à ce projet. Un manuscrit est en préparation en collaboration avec les équipes de Simon Cauchemez et Henrik Salje (Institut Pasteur & Cambridge University) et nos partenaires européens.

✓ Étude de l'évolution génomique des isolats de *Bordetella parapertussis*

B. parapertussis, tout comme *B. pertussis*, peut être à l'origine de symptômes coquelucheux chez l'homme. Même s'ils sont moins fréquemment isolés, les isolats de *B. parapertussis* circulent toujours. Nous coordonnons une étude comparative avec des collègues à l'international, rassemblant 250 isolats dont 119 collectés en France. Les données suggèrent que les isolats de *B. parapertussis* qui circulent aujourd'hui ont évolué par accumulation de mutations à un taux proche de celui observé chez *B. pertussis*, présentent des réarrangements génomiques et sont quasiment tous pertactine-négatifs. Une publication est en cours de rédaction.

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. parapertussis* 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. parapertussis* 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. ---

1.4 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

○ Conditions de mise à disposition de ces collections

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de *Bordetella* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues.

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

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

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou

académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

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

1.5 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, 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 de la Recherche Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

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

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

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 2019 s'est organisée comme suit :

Étapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	15 au 18 avril 2019
Revue qualité	27/05/2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	03 juin 2019
Audits internes qualité et technique	20/11 après-midi et 29/05 matin
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	NA

L'année qualité 2020 du CNR s'est organisée comme suit :

Étapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de renouvellement	6 au 8 octobre 2020
Revue qualité	13/05/2020
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	02 octobre 2020
Audits internes qualité et technique	8/12 matin et 02/12 après-midi
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	NA

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

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

Perspectives 2021 :

Étapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-juin 2021
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2021
Revue de direction LRE-MS	Juin 2021
Demande d'ouverture nouvelles lignes de portées	Avant le 1 ^{er} novembre 2021
Audi de surveillance COFRAC	Mars 2022

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 2019, nous avons participé à un contrôle qualité externe (CQE) 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 août 2020, nous avons également participé à un contrôle qualité externe organisé par QCMD 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, le CNR a obtenu 100% de résultats corrects aux CQE de 2019 et 2020.

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 ; Bouchez et al., 2018, 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 avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immunoempreinte (Western blot).
- **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-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 nasopharyngés (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 de l'espèce *B. pertussis*. La séquence IS481 est également présente dans le génome de *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. parapertussis* et *B. bronchiseptica*.

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