

Rapport annuel d'activité

2017

**Centre National de Référence
de la Coqueluche et autres
Bordetelloses**

**Année d'exercice
2016**



TABLE DES MATIERES

1 Missions et organisation du CNR	6
2 Activités d'expertise	6
2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2016	6
2.2 Présentation des activités d'expertise de l'année 2016.....	7
2.2.1 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR	7
2.2.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2016	8
2.2.3 Niveau de caractérisation des isolats cliniques	10
2.2.4 Nombre de PCR et de sérologies réalisées en 2016	10
2.2.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	11
2.2.6 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.....	11
3 Activités de surveillance.....	12
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	12
3.1.1 Surveillance de la coqueluche.....	13
3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche	15
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	15
3.2.1 Surveillance des isolats résistants aux antibiotiques	15
3.3 Participation aux réseaux de surveillance	16
3.3.1 Europe	16
3.3.2 International	16
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	16
4 Alerte	17
5 Activités d'information, de formation et de conseil	17
5.1 Information	17
5.2 Activités d'enseignement	17
5.3 Nombre d'appels et de messages	17
6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	18
6.1 Description des activités de recherche en cours notamment celles ayant un lien direct avec les activités du CNR.	18
6.2 Les publications et communications réalisées en lien avec les activités du CNR.....	19
6.2.1 Publications internationales	19
6.2.2 Communications internationales (invitées)	19
6.2.3 Communications nationales (invitées).....	20
7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	20
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	21
1.2-Description de l'équipe.....	21
1.4-Description de la démarche qualité du laboratoire	22
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	26
2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :.....	26
2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	27
2.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :.....	28
2.4 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	28

Liste des abréviations et acronymes

Abréviation

Acronymes

Dénomination

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	CoreGenome Multi Locus Sequence Typing
CQ	Contrôle Qualité
Ct	"Cycle Threshold" ou Cycle seuil
ECDC	European Center for Diseases Control
ECP	Electrophorèse en champs pulsé (PFGE est l'acronyme anglais)
EQA/EEQ	External Quality Assessment : Essai d'intercomparaison - Essai externe de la Qualité
HCSP	Haut Comité de Santé Publique
InVS	Institut de Veille Sanitaire, devenu Santé Publique France
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	Réaction de polymérisation en chaîne
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (ou quantitative)
RENACOQ	REseau National COQeluche
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (mutation ponctuelle : polymorphisme nucléotidique simple)
SMQ	Système de Management de la Qualité
SPG/BSA	Saccharose Phosphate Glutamate/Bovine Serum Albumine

Résumé analytique

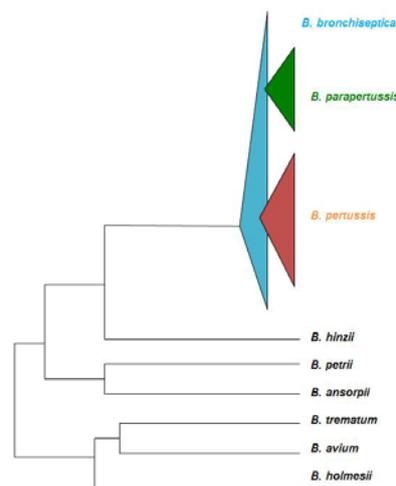
La coqueluche reste un défi de santé publique important en France comme partout dans le monde. Le CNR a pour mission principale de contribuer au volet microbiologique de la surveillance de cette infection en France. En 2016, le nombre d'isolats reçus au CNR reste faible, reflétant une situation de creux entre deux cycles épidémiques. Le CNR continue d'observer une augmentation de la proportion d'isolats de *Bordetella pertussis* qui n'expriment pas la pertactine, un des composants antigéniques de certains vaccins coquelucheux acellulaires. Les autres caractéristiques des souches restent stables. Comme les années précédentes, tous les isolats de *Bordetella parapertussis* n'expriment pas la pertactine.

En 2016 le CNR a organisé un contrôle qualité du diagnostic par PCR pour ses correspondants (en majorité les collègues hospitaliers du réseau RENACOQ, des collègues du Col.BVH, et de quelques LABM dont Cerba et Biomnis). Enfin, le CNR a maintenu l'accréditation selon le référentiel ISO 15189 de 2 techniques de diagnostic par PCR en temps réel.

Introduction

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

Figure 1. Modèle des relations phylogénétiques estimées pour les espèces du genre *Bordetella*. *B. pertussis* et *B. parapertussis* ont évolué à partir de lignées appartenant à l'espèce *B. bronchiseptica*



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

Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse FHA, les protéines fimbriales Fim2 et Fim3 et la pertactine PRN.

Les principales toxines sont :

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

Seule la toxine PT et les adhésines FHA, PRN, Fim2 et Fim3 entrent dans la composition de vaccins sous-unitaires.

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

1 Missions et organisation du CNR

Les missions générales du Centre National de Référence (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**. Les activités scientifiques et techniques du CNR sont appuyées par des activités de recherche qui sont menées en lien étroit avec les activités du CNR, au sein de l'unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur.

Le CNR, attaché à l'unité PTMMH, a été placé sous la responsabilité de Nicole Guiso jusqu'en mars 2015, de Benoit Garin d'avril 2015 à avril 2016, et de Sylvain Brisse depuis le 2 mai 2016. Cette équipe assure seule les missions de CNR : il n'y a pas de laboratoire associé.

Nos activités scientifiques portent principalement sur l'épidémiologie, le diagnostic, l'évolution et la pathogénicité des bordetelles.

2 Activités d'expertise

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

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2016

- Techniques développées ou en développement :

Méthode d'identification avec la technologie MALDI-ToF (BRUCKER)

Pour rappel, le CNR a mis en place en 2014 la méthode d'identification des Bordetelles par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, le spectre obtenu à partir d'une colonie bactérienne, avec ou sans étape d'extraction, avait été comparé avec la base de données BRUCKER déjà existante. Le test comparatif avait été effectué avec une série d'isolats de notre collection. Nous avons obtenu de meilleurs résultats avec une colonie bactérienne déposée sans étape d'extraction. Nous avons vérifié que les isolats de *B. pertussis* et de *B. parapertussis* collectés au cours des différentes ères - pré-vaccinale, post-vaccinale avec vaccins à germes entiers et post-vaccinale à vaccins acellulaires - étaient identifiés de façon semblable avec notre technique d'identification de référence. En 2016, l'identification par comparaison avec la base de données BRUCKER a donné des résultats satisfaisants pour les espèces classiques du genre Bordetella (*B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*) ainsi que pour d'autres espèces rencontrées moins fréquemment (voir partie 8 pour les perspectives).

- Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse :

En 2016, nous avons évalué la première trousse commerciale contenant une cible spécifique de *Bordetella pertussis* (séquence du promoteur de la toxine pertussis). Il s'agit du coffret « *B. pertussis* + *B. parapertussis* Duplex Real-Time PCR » commercialisé par la société LabSystems. La trousse contient aussi la cible IS1001 pour la détection de *B. parapertussis* (cible également présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*), ainsi qu'un contrôle cellulaire humain (ICD). Nous avons testé différents échantillons d'ADN extraits de prélèvements respiratoires humains ainsi que des contrôles de qualité internes. L'aspect des

courbes d'amplification s'est révélé correct pour les trois cibles. Cependant, la courbe pour la cible de l'ICD (témoin d'extraction) était plate pour certains échantillons. Par conséquent, il n'était pas possible de valider le contrôle d'extraction pour ces échantillons. Des discussions et des échanges de matériel ont eu lieu avec la société qui commercialise cette trousse. En conclusion, la trousse doit être améliorée afin de répondre aux critères de validation en vigueur au CNR.

- Contrôle qualité qPCR organisé par le CNR:

Comme en 2012, nous avons proposé aux correspondants du CNR un contrôle qualité (ou essais inter-laboratoires) pour le diagnostic des infections à *Bordetella* par PCR en temps réel (qPCR). Trente deux laboratoires du réseau RENACOQ, quelques laboratoires du Col.BVH ou de LABM volontaires ont accepté de participer à ce contrôle qualité. Le nombre de laboratoires ayant participé au contrôle qualité en 2016 (n= 42) est supérieur au nombre de participants des contrôles que nous avons organisés précédemment (35 participants en 2012 et 33 en 2010) ce qui témoigne de l'intérêt porté à ce contrôle qualité. Les échantillons tests ont été envoyés en juin 2016, accompagné d'un questionnaire technique à remplir.

Tous les participants ont envoyé leurs résultats et leurs conclusions (comme indiqué dans leur rendu d'analyse) dans le délai imparti et 50% des laboratoires ont parfaitement ou très bien réussi leur contrôle qualité (résultat et conclusion). Par ailleurs, 14% des laboratoires ont réussi leur contrôle qualité mais ont indiqué une conclusion incomplète pour au moins une des cibles de PCR et 24% des laboratoires ont réussi leur contrôle qualité en donnant les bons résultats mais en indiquant une conclusion incorrecte pour au moins une des cibles de PCR. Enfin, 12% des laboratoires ont obtenu au moins 1 résultat incorrect. En conclusion, dans l'ensemble les laboratoires ont obtenu de bons résultats. Ce contrôle qualité a permis de sensibiliser les participants ou sensibiliser les nouveaux participants à l'importance de l'interprétation au niveau du rendu de résultats.

L'organisation de ce contrôle qualité a aussi permis d'observer l'évolution des techniques (réactifs, méthodes et équipements) au sein de 42 laboratoires qui participent au diagnostic moléculaire des infections à *Bordetella* en France.

La compilation des résultats a été envoyée à l'ensemble des participants en janvier 2017.

La liste des laboratoires réalisant ces contrôles qualités avec le CNR est indiquée sur le site web du CNR et sera prochainement actualisée.

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires :

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

2.2 Présentation des activités d'expertise de l'année 2016

2.2.1 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 envoyés

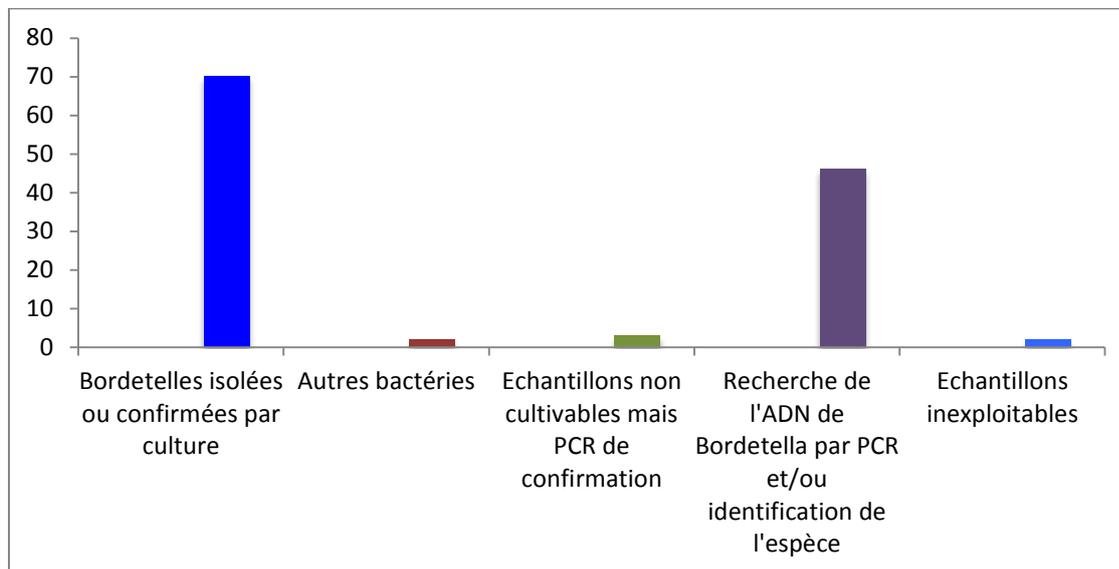
- par les cliniciens participant au réseau RENACOOQ ;
- ✓ patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) ;
- ✓ patients ou animaux infectés par *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de Bordetelles et envoyées par les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France ;
- ✓ Par ailleurs, l'unité de recherche reçoit des prélèvements dans le cadre de la surveillance organisée via le réseau ACTIV (qui ne sont pas comptabilisés dans les tableaux et figures de ce rapport).

2.2.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2016

En 2016, nous avons reçu 70 isolats du genre *Bordetella*, 2 isolats d'un autre genre bactérien, 3 prélèvements non cultivables mais qui ont pu être identifiés comme *Bordetella* par PCR, 46 prélèvements ou ADN extraits sur lesquels une PCR a été réalisée pour vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce de *Bordetella*. Parmi ceux-ci, figurent notamment des échantillons reçus dans le cadre du projet PERTINENT (voir section 3.3.1).

Parmi les 46 prélèvements ou ADN extraits analysés, nous avons obtenu 30 PCR positives à *Bordetella pertussis*, 1 PCR positive à *Bordetella parapertussis*, 1 PCR positive à *Bordetella holmesii* et 6 PCR positives à *Bordetella*. Enfin, nous avons reçu 2 prélèvements inexploitable. La répartition des échantillons reçus au CNR est présentée dans la **Figure 2**.

Figure 2. Répartition des échantillons cliniques reçus au CNR en 2016



Les isolats cliniques reçus ou isolés au CNR en 2016 ont été identifiés et les espèces auxquelles ils appartiennent sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Nombre d'isolats cliniques reçus ou isolés au CNR en 2016

Source	Espèces	2016
RENACOQ	<i>B. pertussis</i>	33
	<i>B. parapertussis</i>	10
Col.BVH	<i>B. pertussis</i>	5
	<i>B. parapertussis</i>	2
	<i>B. bronchiseptica</i>	5
	<i>B. holmesii</i>	1
	<i>B. hinzii</i>	4
	<i>B. avium</i>	1
	<i>B. petrii</i>	1
	<i>B. trematum</i>	1
LABM	<i>B. bronchiseptica</i>	3
	<i>B. holmesii</i>	1
	<i>B. hinzii</i>	2
Total		70

Les résultats des caractérisations sont résumés ci-dessous.

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

- 38 isolats de *B. pertussis*, dont 87% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ. Les autres souches ont été envoyées des hôpitaux d'Annecy (x2 qui ont été collectés chez la même patiente), de Clamart et de Poitiers (x2).
- 12 isolats de *B. parapertussis*, tous en provenance du réseau Renacoq sauf 2 (hôpital de Poitiers).

- Autres espèces du genre *Bordetella* :

- Nous avons reçu des isolats en provenance du collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux de France :
 - 8 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance des hôpitaux de Lyon (x1), de Metz (x1), de Nouméa (x1), de Suresnes (x2) et également en provenance de LABM des villes de Thiais (x1), de Besançon (x1), de Lisses (x1) ;
 - 2 isolats de *B. holmesii* en provenance de l'hôpital de Longjumeau et en provenance d'un LABM de la ville de Nîmes;
 - 6 isolats de *B. hinzii* en provenance des hôpitaux d'Agen(x1), de Tarbes (x2) et d'Annecy (x1) ; et également en provenance de LABM des villes de Lyon (x1) et de Saintes (x1)
 - 1 isolat de *B. avium* de l'hôpital de Tarbes
 - 1 isolat de *B. petrii* de l'hôpital de Besançon
 - 1 isolat de *B. trematum* en provenance de l'hôpital de Lyon-Est

- Tendances

Afin de fournir une perspective historique, l'évolution du nombre d'isolats par espèce de *Bordetella* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans les **Figure 5a** et **5b**. Les résultats reflètent une situation de creux entre deux pics épidémiques de coqueluche (voir **Figure 5a**) et une légère augmentation du nombre d'isolats par rapport à 2016. Même s'il est trop tôt pour l'affirmer, cette augmentation préfigure peut-être le début d'un nouveau cycle épidémique.

2.2.3 Niveau de caractérisation des isolats cliniques

- Vérification de la production par les isolats, des protéines impliquées dans la virulence et présentes dans les vaccins sous unitaires (pertactine, toxine pertussis, hémagglutinine filamenteuse) par immuno-empreinte ;
- Sérotypie des protéines fimbriales (FIM2, FIM3) par agglutination et, le cas échéant, par immunofluorescence ;
- Génotypage des gènes qui codent la pertactine (*prn*) et la sous-unité 1 de la toxine pertussis (*ptxA*), ainsi que de la région promotrice de la toxine pertussis (*ptxS1-Pr*) ;
- Typage des isolats par séquençage génomique.

2.2.4 Nombre de PCR et de sérologies réalisées en 2016

- Le nombre de PCR réalisées par le CNR en 2016 est présenté dans le **Tableau 2**. Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance RENACOQ, dans le cadre de la demande des ARS (notamment lors de cas groupés de coqueluche dans une école), et dans le cadre des contrôles de qualité (CQ) organisés par notre CNR et de contrôles qualités externes (EQA).

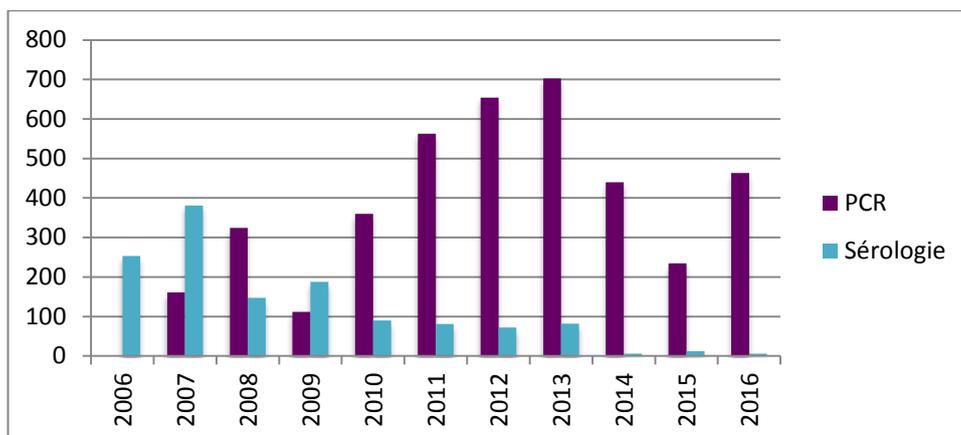
Tableau 2 : Nombres de PCR réalisées en 2016

Type de PCR	2016
Surveillance Renacoq	137
Demande des ARS/InVS	14
Evaluation de trousse commerciales	24
Organisation CQ2016/EQA	288
Total	463

- Le nombre de sérologies réalisées dans le cadre de la surveillance des bordetelloses est de six.

- La **Figure 3** montre l'évolution du nombre de PCR et sérologies réalisées par année de 2006 à 2016. On observe que le nombre de sérologies demandées au CNR a diminué nettement depuis 2014. Cette évolution est en accord avec les recommandations du HCSP de ne plus faire la sérologie pour le diagnostic (http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf).

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



2.2.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats

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. Aucun isolat de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* résistant aux macrolides n'a été identifié en 2016.

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

L'organisation par le CNR du contrôle qualité CQ2016 a nécessité l'envoi à température réfrigérée, de 6 échantillons codés à 42 laboratoires.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2016, nous avons poursuivi nos collaborations avec :

- Santé Publique France et les 42 hôpitaux du réseau RENACOQ (Réseau hospitalier, initié en 1996 ; **Figure 4**). Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.

Figure 4. Villes hébergeant des hôpitaux du réseau RENACOQ



- le Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France

En 2016, nous avons également participé à la rédaction du protocole de surveillance des cas confirmés de coqueluche en population générale menée par le réseau Sentinelles, en partenariat avec SPF et le CNR. La surveillance commencera en janvier 2017.

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

En 2016, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis*. La surveillance réalisée par le CNR permet de suivre les tendances épidémiques depuis 1995 (**Figure 5a**). L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles qui durent de 3 à 5 ans. Le dernier pic épidémique a eu lieu en France en 2012 – 2013.

Nombre de cas. Le nombre d'isolats de *B. pertussis* (n = 37, voir **Tableau 1**) et de *B. parapertussis* (n = 12) reçus par le CNR en 2016 a légèrement augmenté par rapport à 2015, même s'il reste peu élevé par rapport au dernier pic épidémique (**Figure 5a**).

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

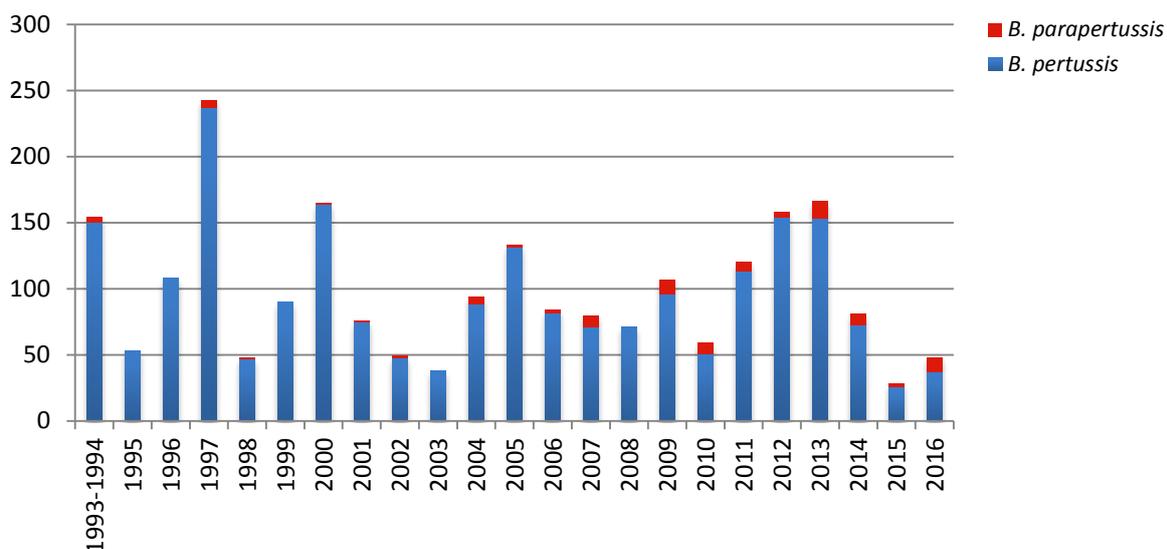
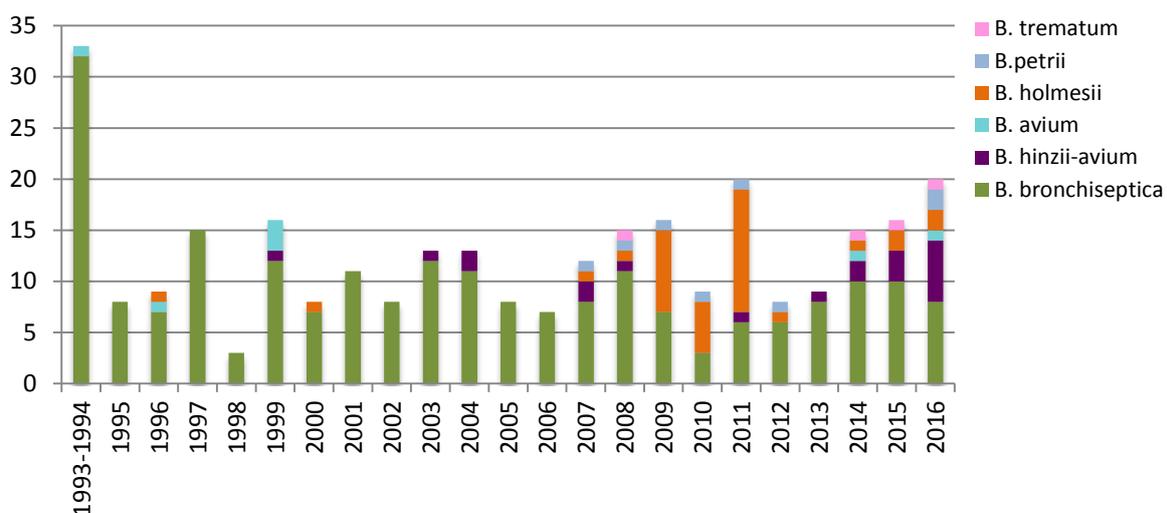


Figure 5b : Nombre d'isolats des autres espèces de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1995



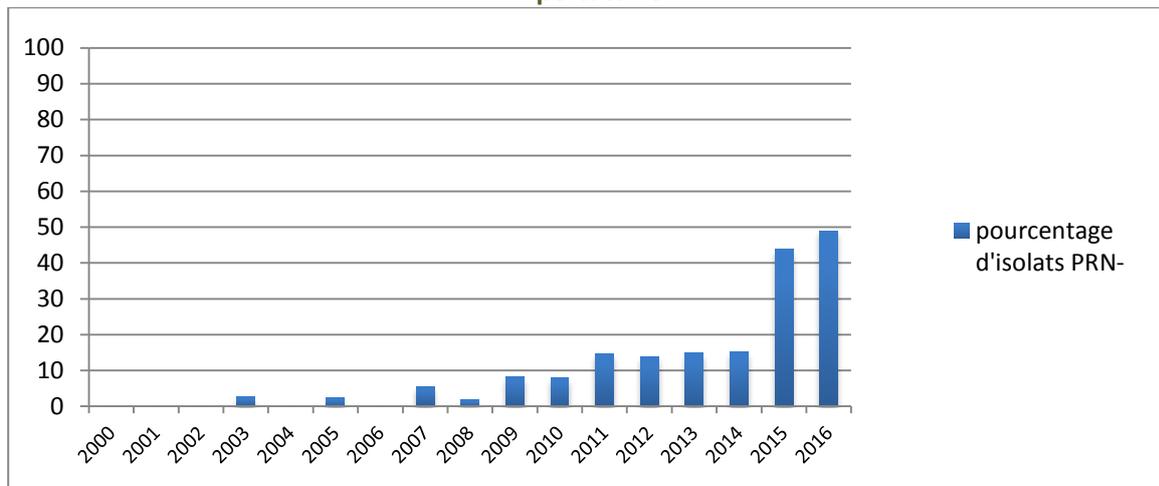
B. parapertussis, le second agent de la coqueluche, montre une incidence qui reste faible comparée à celle de *B. pertussis*. Nous n'avons pas observé d'augmentation importante de la circulation des isolats de cette espèce en 2016.

Répartition par classe d'âge : Comme lors des années précédentes, la proportion la plus élevée des isolats de *B. pertussis* est collectée chez des nouveau-nés âgés de moins de 6 mois (46%). Cette proportion diminue cependant par rapport aux années précédentes (65% en 2015, 55% en 2014). De façon symétrique, nous observons en 2016 une augmentation de la proportion des isolats collectés chez les enfants âgés entre 2 et 8 ans (22%).

Surveillance de l'évolution des antigènes sous pression de sélection vaccinale : Les vaccins sous-unitaires utilisés en France sont soit bi-valent (PT + FHA ; PENTAVAC/TETRAVAC, HEXYON), tri-valent (PT, FHA, PRN ; INFANRIX, BOOSTRIX) soit penta-valent (PT + FHA + PRN + FIM2 + FIM3 ; REPEVAC). La surveillance des antigènes vise à caractériser la possible évolution des souches par divergence antigénique ou perte de l'expression des antigènes. Historiquement, le CNR a contribué aux travaux montrant, à l'échelle internationale, que les isolats actuels de *B. pertussis* diffèrent de ceux qui circulaient lors de la vaccination à germes entiers et lors de l'ère pré-vaccinale.

- pertactine. Depuis 2007, des isolats de *B. pertussis* ne produisant plus l'antigène vaccinal pertactine (PRN) sont observés en France. En 2016, l'augmentation des isolats qui ne produisent pas PRN, se poursuit: de 15% en moyenne en 2012-2013, la proportion d'isolats PRN-négatifs est passée en 2016 à 49% (**Figure 6**). Concernant *B. parapertussis*, 99% des isolats circulant depuis 2007 ne produisent pas la PRN.

Figure 6. Pourcentage des isolats de *B. pertussis* analysés qui ne produisent pas la pertactine



- Allèles des gènes codant la toxine PT et la pertactine. En 2016, l'allèle de la sous-unité S1 de la toxine pertussis (PT) est pour la majorité des isolats de type *ptx1A* et celui de la PRN est de type PRN2, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990.

- Allèles du promoteur de la toxine PT. Le promoteur *ptxP* (situé en amont de l'opéron PT codant les différentes sous unités de la toxine de pertussis) montre une variation de séquence, dont il a été suggéré 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 isolats possédant l'allèle *ptxP3* du promoteur de l'opéron codant la PT, est observée. La quasi-totalité des isolats sont de type *ptxP3* actuellement.

- Fimbriae de type 2 et 3 : les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux fimbriae différentes, le plus souvent de manière exclusive, ou parfois en combinaison. Les isolats de 2016 produisent

majoritairement (62%) Fim3, une proportion stable par rapport à 2015 (68%). De même, la proportion des isolats qui produisent Fim2 en 2016 (35%) est stable par rapport à 2015 (32%).

- En résumé, la proportion d'isolats cliniques de *B. pertussis* qui ne produisent pas l'antigène PRN continue son augmentation, tandis que les autres caractéristiques des souches sont stables.

3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

3.1.2.1 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 2016, les infections causées par *B. bronchiseptica* analysés par le CNR sont en nombre stable par rapport aux années précédentes (**Figure 5b**). Il s'agit principalement de cas d'infections chez des adultes dont la plupart sont immunodéprimés. Ils sont le plus souvent âgés de plus de 50 ans (43, 53, 62, 65, 82 et 84 ans) sauf 2 patients (13 et 24 ans), tous les deux atteints de mucoviscidose. Dans la majorité des cas, il s'agissait d'infection pulmonaire.

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

3.2.1 Surveillance des isolats résistants aux antibiotiques

Pour rappel, un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides avait été isolé en 2011, pour la première fois en France. A notre connaissance, c'était le premier cas sur le continent européen. (Guillot S. et al. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis.* 2012;18 (6):966-8). **Depuis, nous n'avons pas observé de nouveau cas d'isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France.**

Cependant, plusieurs isolats de *B. pertussis* résistants aux macrolides ont été trouvés dans la région chinoise du Xi'an (Z. wang et al, *Clin Microbiol Infect.* 2014 Nov; 20(11):O825-30) et dans le Nord-Est de la Chine (Y Yang et al. 2015, *PLoS One.* 2015 Sep 25; 10(9):e0138941). De même, un cas d'isolat de *B. pertussis* résistant à l'érythromycine et la clarythromicine a également été décrit en Iran (Mirzaei et al. 2015, *Jundishapur J Microbiol.* 8(7):e18190). Il n'est pas impossible que de telles souches diffusent en France à l'avenir.

En 2016, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *B. pertussis* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine, *in vitro*. Il est important de surveiller la résistance des isolats à cet antibiotique car il est ajouté dans les milieux sélectifs pour la culture des Bordetelles.

Les isolats de *B. parapertussis* de 2016 étaient tous résistants *in vitro* à la céfalexine et à la streptomycine, comme précédemment.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

3.3.1 Europe

Projet PERTINENT. Nous participons au projet Pertinent de surveillance de la coqueluche à l'échelle européenne qui a démarré en 2016 (en Mars 2016 pour la France). Les objectifs du projet sont d'estimer le poids de la coqueluche chez les nourrissons hospitalisés âgés de moins d'un an, et d'estimer l'efficacité du vaccin contre l'hospitalisation. Notre contribution, en 2016, a été d'organiser le contrôle qualité CQ2016 des tests de diagnostic et de contribuer à la validation des données biologiques pour une vingtaine de centres hospitaliers français qui font partie du réseau RENACOQ et qui participent à Pertinent. Nous avons confirmé la présence de *B. pertussis* (par culture ou PCR spécifique selon le laboratoire) dans tous les échantillons envoyés au CNR, sauf un car la quantité d'ADN bactérien présente dans l'échantillon était trop faible.

Projet EupertStrain. Nous continuons à participer au réseau européen de laboratoires de référence EUpertstrain. Dans ce cadre, nous échangeons des isolats cliniques et des modes opératoires. Nous nous réunissons une fois par an. S. Brisse a fait une présentation sur nos projets lors de la réunion qui a eu lieu à Utrecht les 12 et 13 octobre 2016.

Réseau EUpertLab-Net. Nous participons au projet EUpert-LabNet, visant à coordonner un réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche et à intégrer les activités de surveillance microbiologique avec la surveillance épidémiologique. Les objectifs plus spécifiques de ce réseau sont d'évaluer, d'améliorer, d'harmoniser et de diffuser les méthodes de diagnostic et de caractérisation des souches dans les laboratoires de référence européens. Cette étude est financée par le ECDC. Dans ce cadre, nous avons formé une personne (Karmen Cerne, 2-5 janvier 2017), membre du laboratoire de référence en Slovénie (National Laboratory of Health, Environment and Food, Ljubljana) au diagnostic moléculaire de la coqueluche.

3.3.2 International

L'unité de recherche qui héberge le CNR, continue sa mission de formation internationale, avec une perspective d'application à la clinique, en s'appuyant en particulier sur des Instituts Pasteur du Réseau International (RIIP). Ainsi, depuis 2016, l'Unité participe au projet **PERILIC** (PERTussis Immunization programs in Low and middle Income Countries), auquel se consacre Sandra Corre (Ingénieur), sous la Direction du Centre de Recherche Translationnelle (CRT) de l'Institut Pasteur et avec les conseils de Nicole Guiso. Les objectifs du projet sont d'assurer un transfert des méthodes de laboratoire et de surveillance dans différents pays (Cambodge, Iran, Madagascar et Togo) et d'obtenir des données épidémiologiques sur la coqueluche dans ces pays. Ce projet dont la durée prévue est de 3 ans, permettra d'améliorer les recommandations vaccinales dans ces pays en les adaptant à l'épidémiologie locale et au type de vaccin utilisé.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

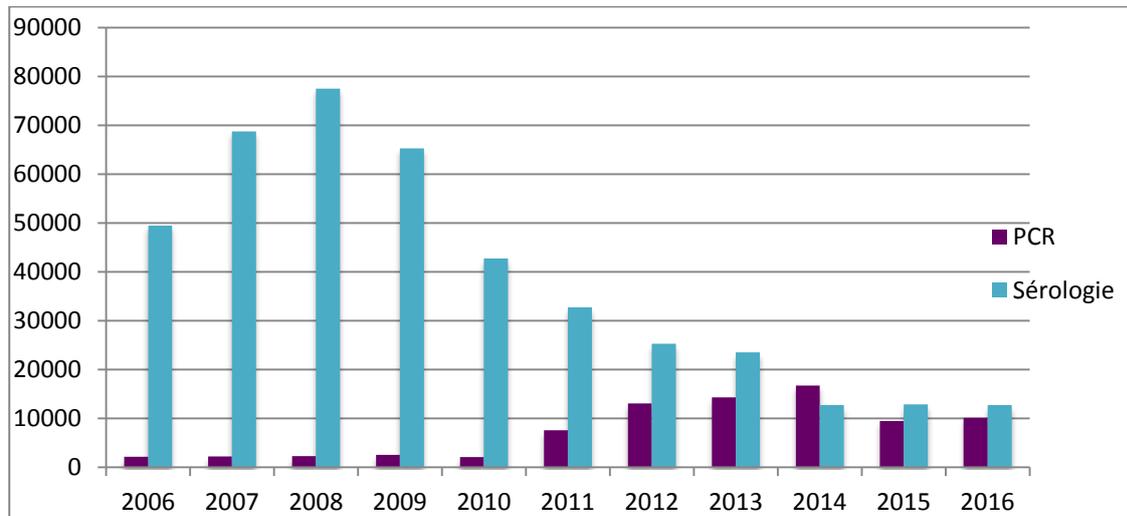
A notre demande, nous recevons chaque année le nombre de sérologies et de PCR réalisées (et le nombre de résultats positifs) du laboratoire CERBA. Ces données contribuent à suivre l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France, et à la surveillance.

Le nombre de PCR réalisées par ce laboratoire en 2016 est de 9400 ; il est stable par rapport à 2015 (**Figure 7**). Sur ces 9400 PCR, 7% ont été positives pour le genre *Bordetella*, contre 5,7% en 2015.

Les demandes de sérologies adressées au laboratoire CERBA sont de 12779 en 2016, stables par rapport à 2015 et 2014. La baisse importante des sérologies depuis 2006 devrait se poursuivre

suite aux nouvelles recommandations de 2014 du HCSP de ne pas réaliser les sérologies en pratique courante (hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf).

Figure 7. Nombre de PCR et sérologies réalisées par le laboratoire CERBA, 2006-2016.



4 Alerte

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande de prévenir SPF et les ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, l'avis du HCSP et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser.

Les alertes sont heureusement rares. En 2016, à la demande des ARS PACA et d'Alsace-Champagne-Ardenne-Lorraine, site de Strasbourg, nous avons reçu des échantillons en provenance de cas groupés de coqueluche dans des écoles primaires. Le CNR a effectué les PCR de contrôle afin de déterminer l'espèce de *Bordetella* responsable de l'infection.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Information

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 :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>.

En 2016, le site web du CNR a été réorganisé pour gagner en clarté et ergonomie.

5.2 Activités d'enseignement

Cours par Sophie Guillot, adjointe du CNR, 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 Décembre 2016 (3 heures).

5.3 Nombre d'appels et de messages

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 par portable en cas d'urgence. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR.

En 2016, 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 2016

Hôpitaux	25
Pédiatres, Médecins généralistes, biologiste LABM	16
Collectivités	4
Particuliers	1
TOTAL	48

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

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

- **Standardisation du typage génomique des isolats de *B. pertussis***

En 2016, nous avons commencé le développement d'une méthode cgMLST pour analyser finement la transmission et l'évolution des isolats de *B. pertussis*. Nous avons pour cela sélectionné des isolats collectés par le CNR au cours du dernier cycle de coqueluche ainsi que des isolats historiques et avons entrepris le séquençage de leur génome par la technologie Illumina. L'analyse des données est en cours : choix des gènes présents dans tous les isolats, élimination des artefacts dus au haut G+C% des génomes et aux paralogues, reproductibilité des génotypes selon le type de données de séquençage. Ce travail est réalisé en partenariat avec le groupe de bio-informatique de l'Institut Pasteur (Hub du « C3BI »), dans la ligne de précédents travaux (sur d'autres pathogènes) du nouveau responsable du CNR (Bialek-Davenet et al Emerg. Inf. Dis. 2014 ; Maury et al Nat Genetics 2016 ; Moura et al Nat Microbiol 2017 ; Perrin et al Nat Comm. 2017). Ce schéma sera ensuite appliqué à des isolats provenant d'autres pays en collaboration avec nos partenaires Européens ou autres. A ce jour, plus de 2000 gènes ont été validés pour leur présence conservée et leur reproductibilité. L'étude de cas groupés est en cours pour calibrer le degré de variation des profils cgMLST en fonction des liens épidémiologiques documentés.

- **Dynamique évolutive des isolats n'exprimant plus certains gènes d'antigènes vaccinaux**

En 2016, nous avons continué à caractériser les isolats de *B. pertussis* et de *B. parapertussis* ne produisant plus la PRN ou d'autres antigènes vaccinaux. Comme l'an passé, nous avons pu observer que la non production de PRN était due à des événements indépendants (des délétions, des insertions d'IS, des SNP...). Nous avons aussi observé sur la base des séquences génomiques que les isolats PRN-négatifs sont très hétérogènes phylogénétiquement, montrant que l'émergence de ces isolats en France ne correspond pas à l'émergence d'une seule lignée. L'analyse évolutive détaillée de la perte de pertactine est en cours sur la base de l'étude des génomes des isolats du CNR.

6.2 Les publications et communications réalisées en lien avec les activités du CNR

En 2016 le CNR a été dans une phase de transition, du fait du départ de Nicole Guiso (Mars 2015) puis de celui de Benoit Garin (Avril 2016).

6.2.1 Publications internationales

1. Guillot S, Guiso N. *Follow-Up of External Quality Controls for PCR-Based Diagnosis of Whooping Cough in a Hospital Laboratory Network (Renacoq) and in Other Hospital and Private Laboratories in France.* **J Clin Microbiol.** 2016; 54(8): 2169-71.
2. Basheer SM, Bouchez V, Novikov A, Augusto LA, Guiso N, Caroff M. *Structure activity characterization of Bordetella pertussis lipid A, from environment to human isolates.* **Biochimie.** 2016;120:87-95.

Les publications suivantes ont été réalisées par S. Brisse et sont pertinentes par rapport au projet du CNR :

3. Bialek-Davenet, S., A. Criscuolo, F. Ailloud, V. Passet, L. Jones, A. S. Delannoy-Vieillard, B. Garin, S. Le Hello, G. Arlet, M. H. Nicolas-Chanoine, D. Decre and S. Brisse (2014). "Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups." **Emerg Infect Dis** 20(11): 1812-1820.
4. Maury, M. M., Y. H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. Rocha, S. Brisse* and M. Lecuit* (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." **Nature Genetics** 48(3): 308-313.
5. Moura, A., A. Criscuolo, H. Pouseele, M. M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, J. T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larsonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit and S. Brisse (2016). "Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*." **Nature Microbiology** 2: 16185.
6. Amandine Perrin*, Elise Larsonneur*, Ainsley C. Nicholson*, David J. Edwards, Kristin M. Gundlach, Anne M. Whitney, Christopher A. Gulvik, Melissa E. Bell, Olaya Rendueles, Jean Cury, Dominique Clermont, Vincent Enouf, Vladimir Loparev, Phalasy Juieng, Timothy Monson, David Warshauer, Lina I Elbadawi, Maroya Spalding Walters, Matthew B Crist, Judith Noble-Wang, Gwen Borlaug, Eduardo P.C. Rocha, Alexis Criscuolo, Marie Touchon, Jeffrey P. Davis, Kathryn E. Holt, John R. McQuiston* and Sylvain Brisse* Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* Wisconsin outbreak strain. **Nat Communications**, in press

6.2.2 Communications internationales (invitées)

S. Brisse a été invité à Utrecht le 12 octobre 2016 par le consortium EUpertStrain pour participer au meeting annuel de ce réseau. Il a présenté le projet de génomique en cours au CNR « Genomic epidemiology of *Bordetella pertussis* in France ».

S. Brisse a été invité à Stockholm le 26 septembre 2016 par the European CDC, en tant que représentant français du projet EUpert-LabNet, pour participer au meeting du Vaccine Preventable Diseases Network. Il a présenté le projet de génomique en cours au CNR « Genomic epidemiology of *Bordetella pertussis* in France ».

S. Brisse a été invité à Stockholm le 21 juin 2016 par the European CDC, en tant qu'expert pour discuter de la mise en place de typage génomique dans la surveillance des maladies infectieuses à l'échelle européenne.

S. Brisse a été invité au congrès IMMEM-XI à Estoril, Portugal (12-14 mars 2016), afin de présenter le projet de génotypage génomique de *Listeria monocytogenes* effectué en collaboration avec le CNR Listeria.

6.2.3 Communications nationales (invitées)

S. Brisse a été invité aux journées 'CNR-LNR' organisées par l'Institut de Veille Sanitaire (31 mars 2016, Maisons-Alfort) pour y parler de « CNR et LNR au temps du NGS : enjeux et perspectives pour la référence et la santé publique ».

S. Brisse a été invité aux journées 'CNR-LNR' organisées par l'Institut de Veille Sanitaire (27 novembre 2015, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) pour y parler de « Séquençage génomique des pathogènes bactériens: structure génétique des espèces et surveillance épidémiologique ».

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. Cependant *Bordetella bronchiseptica* peut infecter ou être portée par des animaux. Le CNR prendra contact lors de la nouvelle mandature avec des laboratoires vétérinaires pour envisager des collaborations.

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.

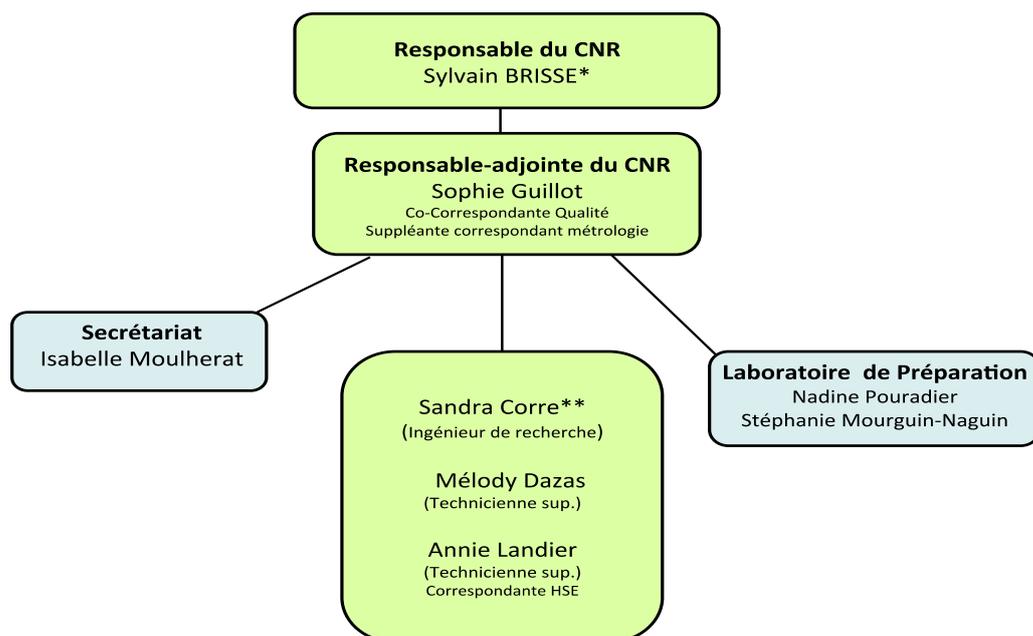
1.2-Description de l'équipe

La liste des personnels dévolus au CNR en 2016 est présentée dans le **Tableau 3** et l'organisation du CNR dans la **figure 8**, sous forme d'un organigramme.

Tableau 3 : Liste du personnel dévolu au CNR

Nom Prénom	Position	Part ETP	Co-financement
Garin Benoit (jusqu'au 30-04-16) Brisse Sylvain (depuis le 02-05-16)	Responsable du CNR et chef d'Unité	0.30	Institut Pasteur
Guillot Sophie	Responsable adjointe du CNR	0.50	Institut Pasteur
Corre Sandra	Ingénieure de recherche	0.50	Institut Pasteur
Landier Annie	Technicienne sup. de laboratoire	0.50	Institut Pasteur
Dzas Mélody	Technicienne sup. de laboratoire	0.50	Institut Pasteur
Moulherat Isabelle	Assistante	0.25	Institut Pasteur
Pouradier Nadine	Technicienne de laboratoire	0.10	Institut Pasteur
Stéphanie Mourguin-Naguin	Aide de laboratoire	0.10	Institut Pasteur

Figure 8. Organigramme du CNR en 2016



* B. GARIN jusqu'en avril 2016 puis S. BRISSE

** Remplacée fin 2016 pour s'occuper du projet PERILIC

Liste des principaux équipements de l'unité :

- Une Station Eau pure (France Eau)
- 2 Autoclaves
- 5 postes de sécurité microbiologique
- 4 étuves
- 1 microscope à fluorescence
- 3 congélateurs à -80°C et plusieurs à -20°C
- 2 incubateurs à agitation orbitale
- 1 appareil à champ pulsé pour l'ECP
- 1 chaîne ELISA
- 5 appareils PCR
- 1 thermocycleur en temps réel LC480
- 5 centrifugeuses
- 1 compteur à radioactivité
- 2 balances de précision
- 2 Spectrophotomètres pour acides nucléiques (1 Qubit / 1 Nanodrop)
- 1 Spectrophotomètre pour les cultures bactériennes

De plus, nous bénéficions des équipements de la plateforme mutualisée P2M pour l'extraction (robot extracteur MagnaPure, de Roche) et pour le séquençage Illumina des acides nucléiques (séquenceur NextSeq-500, Illumina).

1.4-Description de la démarche qualité du laboratoire

1.4.1. Politique qualité du CNR

L'unité PTMMH avec le CNR est très impliquée dans la démarche qualité. En mai 2016, le COFRAC a renouvelé l'accréditation des 2 techniques de diagnostic par PCR en temps réel du CNR. En cohérence avec la politique qualité du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de

l'Institut Pasteur (voir 1.4.2), la lettre d'engagement de l'unité qui inclut le CNR est présentée dans la Figure 9.

Figure 9 : Lettre d'engagement de l'unité PTMMH



PTMMH

SUPPORT D'ENREGISTREMENT	VERSION
POLITIQUE QUALITÉ DE L'UNITÉ PTMMH	B

La politique qualité de l'Unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » (PTMMH), qui inclut le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses, et le CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*, est de répondre toujours mieux :

- ❖ à ses missions de Centres nationaux de Référence;
- ❖ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Médecins cliniciens, Biologistes, Industriels, Partenaires scientifiques;
- ❖ Aux exigences de qualité de ses résultats de recherche scientifique.

Pour cela, l'unité a développé, depuis plusieurs années, un système de gestion de la qualité visant à accroître l'efficacité de ses fonctionnements et à garantir des résultats justes, reproductibles et transmis dans les délais.

Dans cette dynamique, voici les **objectifs de l'unité que nous poursuivons pour 2016**:

1. Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques, nous incitent à assurer le **maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité**. Pour ce faire :
 - ❖ Chaque technique de chaque CNR doit être partagée par au moins deux personnes. Un transfert de savoir-faire sera organisé notamment par le biais de formations par le personnel déjà habilité et par l'encadrement. Le succès du transfert sera sanctionné par une habilitation.
 - ❖ Les contrôles du maintien des compétences seront réalisés régulièrement.
2. Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à **optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques** dans les systèmes informatiques LAGON.
3. Les techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la **planification des expériences via l'élaboration de protocoles d'expériences** décrivant les objectifs, les moyens et les techniques à mettre en œuvre pour les atteindre.
4. Dans le cadre de la politique qualité des CNRs, garants de l'expertise des techniques de diagnostic, l'unité s'était fixée comme objectif en 2015, le maintien de l'accréditation ISO 15189 obtenue en novembre 2013 pour les techniques de diagnostic moléculaire par PCR en temps réel des infections à Bordetella et par PCR en point final pour la détection du gène de la toxine diphtérique. Cet objectif a été atteint car le COFRAC a décidé (numéro N° 8-2588 rév.7) en novembre 2015 de maintenir l'accréditation des techniques mentionnées.
5. Les objectifs du LREMS pour la suite sont l'accréditation ISO 15189 partielle vers la fin 2017, et complète avant le 1er novembre 2020 conformément à l'article 8 de la loi n° 2013-442 du 2 mai 2013.

En tant que Responsable de l'unité, je m'engage :

- ⬇ à fournir à l'ensemble du personnel de l'Unité les moyens nécessaires à la mise en œuvre de cette politique qualité
- ⬇ à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- ⬇ à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants, à poursuivre la mise en place d'un système management de la qualité (SMQ) qui réponde aux prescriptions de la norme ISO/CEI 15189.

Sylvain Brisse,
 Directeur du CNR de la coqueluche et autres bordetelloses
 Directeur du CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*
 Responsable par intérim de l'Unité PTMMH

Actualisation le 15 septembre 2016



1.4.2. Démarche qualité des CNR de l'Institut Pasteur

Historique : En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le Guide de Bonne Exécution des Analyse en Biologie Médicale (GBEA) et, depuis 2008, dans le cadre des inspections de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur :

Ce projet s'inscrit dans l'objectif de répondre à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Les Centres Nationaux de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur et la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) sont organisés en Multisite et constituent le LREMS.

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

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

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

Actions d'importance 2016 conduites auprès des CNR de l'Institut Pasteur à Paris et Lyon:

Janvier à Mars 2016 : réalisation des revues qualité des CNR.

1^{er} Avril 2016 : demande d'extension d'accréditation pour les CNR des Papillomavirus, E. Coli, Salmonelles, Shigelles et Vibrions Cholera (en attente de la notification de réception du dossier).

Mai 2016 : notification par le COFRAC du renouvellement de l'accréditation du LREMS (CIBU, CNR Anaérobies, CNR de la Coqueluche et autres bordetelloses, CNR des Corynébactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR des Hantavirus, CNR des Fièvres Hémorragiques Virales, CNR des Virus *Influenzae*, CNR de la Leptospirose, CNR des Listeria, CNR des Méningocoques, CNR des Mycoses invasives et antifongiques, CNR de la Peste et autres yersiniose, CNR de la Rage) .

L'attestation d'accréditation est disponible à l'adresse :<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>

23 Mai 2016 : revue de direction du LREMS.

Juin-Juillet 2016 et septembre-octobre 2016 : audits internes technique et qualité.

4^{ème} trimestre 2016 : article dans la revue Compétences du COFRAC concernant l'accréditation des CNR de l'Institut Pasteur avec un focus sur le CNR des Fièvres Hémorragiques Virales.

Octobre 2016 : report de l'audit de surveillance COFRAC en Janvier 2017.

Perspectives 2017 :

Janvier à Mars 2017 : réalisation des revues qualité des CNR.

16 au 20 janvier 2017 : audit de surveillance COFRAC ; les conclusions de l'audit de surveillance de Janvier 2017 ont été positives, le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LREMS.

Avant le 22 mai 2017 : revue de direction du LREMS.

Juin-Juillet 2017 et septembre-octobre 2017 : audits internes technique et qualité.

Septembre 2017 : organisation de groupes de travail technique pour les prochains projets de validation de méthodes et finalisation des dossiers de validation de méthode pour une demande d'extension prochaine.

Courant 2017 : ajout de nouvelles méthodes dans le périmètre d'accréditation, pour les CNR ayant déjà des techniques accréditées sous la même portée d'accréditation.

Fin 2017-début 2018 : audit de surveillance et/ou d'extension du LREMS.

1.4.3. 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 2016, nous avons participé à un contrôle qualité externe organisé par QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics Organisation, Glasgow, Scotland) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis*. Le QCMD se composait de 12 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 12 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 12 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 (*ptxS1-Pr*, *h-IS1001* et *Fla*). Nous avons aussi obtenu des résultats corrects pour les 12 échantillons quelque soit l'espèce de *Bordetella* à identifier.

En conclusion, nous avons obtenu 100% de bons résultats au CQE de 2016.

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 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 différents diagnostics par PCR en temps réel réalisés sont ceux ayant comme cible :
 - L'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 les espèces *B. holmesii* et *B. bronchiseptica*;
 - Le promoteur de la toxine de pertussis qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481 ;
 - Le gène BP3385 qui est spécifique de l'espèce pertussis mais dont la détection est moins sensible que celle de la séquence IS481. Toutefois, il détecte aussi l'espèce *B. bronchiseptica* dans quelques rares cas;
 - La séquence IS1001 qui permet la détection de l'espèce *B. parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *B. bronchiseptica* ;
 - La séquence en amont du gène Fla qui est spécifique de l'espèce *B. parapertussis* et qui permet de différencier cette espèce de l'espèce *B. bronchiseptica* ;
 - Le gène h-IS1001 spécifique de l'espèce *B. holmesii*.

Le diagnostic utilisant les cibles IS481 et IS1001 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. Depuis 2011, elle n'est plus remboursée par la Sécurité sociale. A la demande des ARS lors de cas groupés de coqueluche dans des collectivités, 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 développement du schéma de typage core genome multilocus sequence typing (cgMLST) est en cours de validation.

Vérification de la production des facteurs de virulence

Elle est réalisée :

- pour les protéines fimbriales : avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence ;
- pour la toxine adényl cyclase-hémolysine : par visualisation de l'hémolyse et si nécessaire par le dosage de l'activité adényl cyclase ;
- pour la toxine de pertussis (PT), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la pertactine (PRN) : avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immuno-empreinte (Western blot).

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

Dans le cas où un isolat présente des caractères génomiques ou phénotypiques différents de ceux généralement décrits, l'unité de recherche a la capacité de tester ses propriétés dans un modèle murin d'infection intranasale, et d'analyser ses interactions avec les macrophages murins (lignée J774.A1) ou les cellules trachéales épithéliales humaines (lignée HTE).

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Les marqueurs épidémiologiques disponibles sont le typage des antigènes vaccinaux (liste décrite ci-dessus) et le cgMLST (un peu plus de 2000 gènes). L'électrophorèse en champ pulsé a été abandonnée fin 2015 du fait de son faible pouvoir discriminant.

2.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

○ **Description : nombre de souches, caractérisation**

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement plus de 2300 souches. Jusqu'à 2015, les souches ont été caractérisées par PFGE et production des antigènes vaccinaux. Depuis 2016, les isolats sont systématiquement séquencés par technologie Illumina, qui fournit à la fois le génotypage et les séquences de gènes importants pour le suivi de l'efficacité vaccinale. Les souches sont également caractérisées phénotypiquement comme décrit ci-dessus.

○ **Conditions de stockage**

Tous les isolats de notre collection sont stockés à -80°C, chacun en double dans des congélateurs différents branchés sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel THERMOCLIENT. Un stock de chaque isolat est également conservé systématiquement dans l'azote liquide. Les isolats de référence ont aussi été déposés au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRB-IP) et à la collection suédoise de Göteborg.

La durée de conservation des isolats est testée régulièrement. Elle est au moins de 12 ans en milieu BSA/SPG à -80°C. En revanche, cette durée semble décroître avec le temps lorsque les isolats sont conservés sous forme lyophilisée (chute de plusieurs log en vingt ans) ; cette méthode n'est donc plus utilisée.

○ **Conditions de mise à disposition de ces collections**

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigé pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant le statut industriel ou académique du partenaire et la nature de l'accord, cette mise à disposition donne éventuellement lieu à une contrepartie financière.

2.4 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, d'une 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 des espèces *B. pertussis*, mais aussi *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*;

- La séquence d'insertion **IS1001** qui détecte l'ADN de l'espèce *B. parapertussis*. La séquence de l'**IS1001** est aussi présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*.

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

En fonction des résultats des deux tests qPCR, le CNR recommande :

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

- Le promoteur de la toxine de pertussis (*ptxS1-Pr*) qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'**IS481** dans nos conditions opératoires;
- L'**h-IS1001** qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii* et est aussi sensible que la cible **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 la qPCR FLA.

Pour les laboratoires qui ne peuvent pas mettre en place les 2 PCR spécifiques, le CNR recommande de lui envoyer un aliquot d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible **IS481**) afin qu'il effectue les 2 qPCR *ptxS1-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 aliquot d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible **IS1001**) afin qu'il effectue la qPCR FLA (PCR en 2 temps) 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, quel que soit sa nature, sont indiquées sur le site web du CNR.