Rapport annuel d'activités

2018

Centre de national de référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*

Année d'exercice
2017

Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection
19-21, boulevard Jean Moulin
13005 MARSEILLE

SOMMAIRE

	2
Résumé analytique des activités pour l'année 2017	**3**
Analytical summary of activities for 2017	**4**
1) Missions et organisation du CNR	**5**
2) Activités d'expertise du CNR	**6**
3) Activités de surveillance	**8**
4) Alerte	**24**
5) Activités de rétro-information, de formation et de conseil	**26**
6) Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	**27**
7) Coopération avec les laboratoires de santé animale, hygiène alimentaire, Environnementaux	**31**
8) Programme d'activités pour les années suivantes	**32**
Annexe 1 : Missions et organisation du CNR	**33**
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	**46**

Résumé analytique des activités pour l'année 2017

La fièvre Q, les rickettsioses et bartonelloses sont des zoonoses communes et endémiques en France, grevées d'un taux de morbidité élevé. En 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* a déménagé au sein de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, établissement entièrement dédié à la prise en charge des maladies infectieuses.

Le CNR a reçu **13867** échantillons de sérum provenant de **11240** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, 7226 échantillons biologiques divers provenant de 4891 patients ont été reçus pour culture et/ou détection moléculaire. Pour les diagnostics de fièvre Q, rickettsiose et bartonellose, les échantillons de sérum étaient adressés comme demandes primaires dans 63.4, 65.9 et 58.7% des cas respectivement. En 2017, le CNR a diagnostiqué **194** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (+ 9.6% par rapport à 2016), **68** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (-26.9% par rapport à 2016), **64** nouveaux cas de rickettsioses (+3% par rapport à 2016) et **139** nouveaux cas de bartonelloses (- 12% par rapport à 2016).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une augmentation du nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë en 2017 (144 *vs* 134 cas en 2016, +7.5%) mais une stabilité du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique), avec 14 cas en 2017 contre 15 en 2016 (-6.7%). L'année 2017 a été marquée par deux épidémies de fièvre Q aiguë, l'une dans la région de Niort, dans les Deux Sèvres, et l'autre à Sarzay dans l'Indre. La première est survenue entre avril et juin 2017, et 12 cas ont été confirmés par le CNR. La seconde épidémie est survenue dans une ferme accueillant du public, au décours de l'agnelage, entre le 17 avril et 8 mai 2017. Vingt-neuf cas ont été identifiés, dont 15 confirmés par le CNR, incluant les propriétaires de la ferme.

En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë a légèrement augmenté entre 2016 et 2017, passant de 43 à 45 cas (+4.6%).

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a légèrement augmenté, avec 64 diagnostics (*vs* 62 en 2015, +3%), dont 18 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), 15 cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), 9 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), 9 cas de typhus murin (*R. typhi*), 9 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), 3 cas de fièvre boutonneuse à puce (*R. felis*) et 1 cas de typhus des broussailles (*Orientia tsutsugamushi*).

Au cours de l'année 2017, nous avons eu moins de diagnostics d'infections à *Bartonella* par rapport à 2016, avec 139 patients (-12%), dont 115 maladies des griffes du chat, 22 endocardites et 2 autres formes. Par rapport à 2016, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (115 *vs* 135, -14.8%) a diminué mais le nombre de diagnostics d'endocardites a augmenté (22 *vs* 16, +37.5%).

Analytical summary of activities for year 2017

Q fever, rickettsioses and bartonellosis are common and endemic zoonoses in France, with a high morbidity rate. In 2017, the French reference center (FRC) for Rickettsioses, Q fever and Bartonelloses moved in the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, entirely dedicated to the management of infectious diseases.

The FCR received 13867 serum samples from 11240 patients. All sera were tested for the presence of antibodies against *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. In addition, 7226 different biological samples from 4891 patients were received for culture and/or molecular detection. For the diagnosis of Q fever, rickettsioses and bartonelloses, serum samples were addressed as primary applications in 63.4, 65.9, and 58.7%, respectively. In 2017, FRC diagnosed 194 new cases of acute Q fever (+ 9.6% compared to 2016), 68 new cases of persistent and focal Q fever (-26.9% compared to 2016), 64 new cases of rickettsioses (+ 3% compared to 2016) and 139 new cases of bartonellosis (-12 % compared to 2016).

With regard to Q fever, we observed in Metropolitan France an increase in the number of diagnoses of acute Q fever in 2017 (144 vs. 134 cases in 2016, + 7.5%) but a stability of the number of persistent and focal Q fever cases (14 cases in 2017 compared to 15 in 2016 (-6.7%). The year 2017 was marked by two outbreaks of acute Q fever, one in the Niort area, Deux Sèvres, and the other in Sarzay, Indre. The first occurred between April and June 2017, and 12 cases were confirmed by FRC. The second outbreak occurred on a farm that welcomed tourists, during lambing, between 17 April and 8 May 2017. Twenty-nine cases were identified, including 15 confirmed by FRC, notably the farm owners.

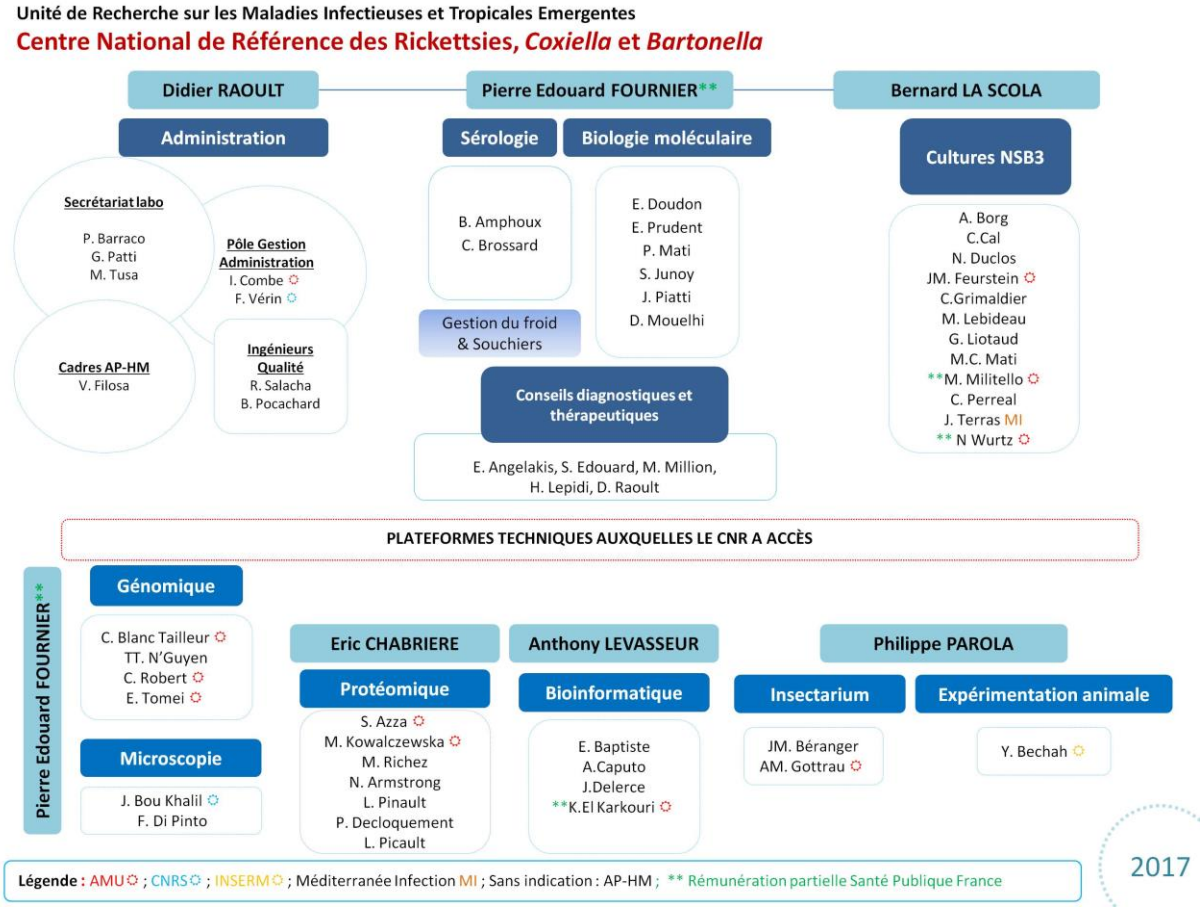
In French Guiana, the number of diagnoses of acute Q fever slightly increased between 2016 and 2017, from 43 to 45 cases (+ 4.6%).

For rickettsioses, the number of diagnoses made by FRC increased slightly, with 64 diagnoses (vs. 62 in 2015, + 3%), including 18 cases of Mediterranean spotted fever (*Rickettsia conorii* and *R. massiliae*), 15 cases of African Tick-bite fever (*R. africae*), 9 cases of Lymphangitis-Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), 9 cases of murine typhus (*R. typhi*), 9 cases of Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick bite (*R. raoultii* and *R. slovaca*), 3 cases of Flea spotted fever (*R. felis*) and 1 case of scrub typhus (*Orientia tsutsugamushi*).

During 2017, we diagnosed fewer *Bartonella* infections compared to 2016, with 139 patients (-12%), including 115 cat scratch disease cases, 22 endocarditis and 2 other forms. Compared to 2016, the number of cat scratch disease cases (115 vs. 135,-14.8%) decreased but the number of diagnoses of endocarditis increased (22 vs. 16, + 37.5%).

1 Missions et organisation du CNR

ORGANIGRAMME



RESPONSABLES

Responsable : Professeur Pierre-Edouard FOURNIER (PU-PH) et responsable adjoint : Professeur Didier RAOULT (PU-PH).

DEMARCHE QUALITE

Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture, sérologie et détection moléculaire du laboratoire.

2 Activités d'expertise du CNR

RESUME DE LA PRODUCTION D'EXPERTISE EN 2017

* Plus de 20 000 échantillons cliniques reçus,

* Plus de 100 000 analyses réalisées,

* Isolement de 17 souches de Coxiella burnetii, de 2 souches de *Rickettsia* et d'1 souche de *Bartonella*,

* 50 génomes de *Coxiella burnetii* séquencés.

2.1. Evolution des techniques

L'identification des arthropodes reçus par le CNR est à présent systématiquement réalisée en première intention par spectrométrie de masse (MALDI TOF).

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

La comparaison des kits sérologiques commercialisés à la technique d'immunofluorescence de référence sera réalisée en 2018.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR fournit antigènes et ADN à plusieurs laboratoires français, pour le diagnostic de fièvre Q, rickettsioses et bartonelloses.

2.4. Collections de matériel biologique

En 2017, le CNR a reçu 13 867 échantillons de sérums et 7 226 échantillons biologiques divers (sang, biopsies, liquides de ponctions, arthropodes …)

De plus, 17 souches de *Coxiella burnetii,* 2 souches de *Rickettsia* et 1 souche de *Bartonella* ont été cultivées.

2.5. Activités d'expertise

Echantillons			*Type d'analyses réalisées*
Type		*Nombre*	
Souches		0	
Sérums	France	13 569	**SEROLOGIES** Antigènes testés pour tout sérum : *Rickettsia conorii*, *R. typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* + Antigènes testés en plus si patient infecté en Europe et bassin méditerranéen : *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. raoultii, R. sibirica mongolitimonae* Ou + Antigènes testés en plus si patient infecté en Afrique sub-saharienne : *R. africae* Ou + Antigènes testés en plus si patient infecté en Asie : *R. sibirica mongolitimonae*, *R. japonica*, *R. honei*, *Orientia tsutsugamushi* (souches gilliam et Kawazaki), *Neorickettsia sennetsu* Ou + Antigènes testés en plus si patient infecté en Amérique : *R. rickettsii*, *R. parkeri* Ou + Antigènes testés en plus si patient infecté en Australie : *R. australis*, *R. honei*
	Etranger	298	
Autres types de prélèvements			**PCR**
	France	6908	PCR *C. burnetii* (2 gènes), *Rickettsia* sp. (2 gènes) ou *Bartonella* sp. (2 gènes) plus éventuellement ARNr 16S et ARNr 18S en fonction de la demande et du contexte épidémiologique et clinique. **CULTURE CELLULAIRE** Si PCR positive et échantillon reçu dans des conditions permettant la culture, culture sur cellules endothéliales.
	Etranger	318	

DELAIS MOYENS DE RESTITUTION DES RESULTATS

Sérologies	48 h
PCR	48 – 72 h
Culture	10j à 2 mois

2.5. Activités de séquençage

- *Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?*
  - ***OUI*** *:*
    - ***Accès interne :*** **4 séquenceurs Illumina MiSeq, séquenceur Minion Oxford Nanopore**

- *Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?*
  - ***OUI*** *:*
    - ***Accès interne : Logiciels utilisés*** **Assemblage SPADES, SOAP, A5; Annotation Prokka**

- *Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?*
  - ***OUI****, pour activités de :*
    - ***Surveillance :*** **Pangénome de Coxiella burnetii en collaboration avec le LNR de la fièvre Q (Dr Elodie Rousset, Sophia Antipolis)**

- *Le séquençage est utilisé par le CNR, pour les analyses bio-informatiques suivantes :* **wgMLST, analyse phylogénétique.**

- *Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :*
  - *Nombres de séquences réalisées dans l'année* **: 50 génomes de Coxiella burnetii**
  - *Modalités de sélection des souches pour séquençage :* **sélection de souches représentatives des principaux génotypes de *C. burnetii***

- *Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastaq files) :*

Dans des bases de données fermées propres au CNR. Les séquences génomiques ne sont déposées dans Ge*n*Bank que si elles font l'objet d'une publication.

3 Activités de surveillance

Eléments clefs de l'année

En 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* a reçu **13867** échantillons de sérum provenant de **11240** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, 7226 échantillons biologiques divers provenant de 4891 patients ont été reçus pour culture et/ou détection moléculaire. Pour les diagnostics de fièvre Q, rickettsiose et bartonellose, les échantillons de sérum étaient adressés comme demandes primaires dans 63.4, 65.9 et 58.7%, respectivement. En 2017, le CNR a diagnostiqué **194** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (+ 9.6% par rapport à 2016), **68** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (-26.9% par rapport à 2016), **64** nouveaux cas de rickettsioses (+3% par rapport à 2016) et **139** nouveaux cas de bartonelloses (- 12% par rapport à 2016). L'année 2017 a été marquée par deux épidémies de fièvre Q, dans la région de Niort, dans les Deux Sèvres, et à Sarzay dans l'Indre. En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë est resté stable entre 2016 et 2017, passant de 43 à 45 cas (+4.6%). [15].

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a légèrement augmenté, avec 64 diagnostics (*vs* 62 en 2015, +3%), dont 18 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), 15 cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), 9 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), 9 cas de typhus murin (*R. typhi*), 9 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), 3 cas de fièvre boutonneuse à puce (*R. felis*) et 1 cas de typhus des broussailles (*Orientia tsutsugamushi*).

Au cours de l'année 2017, nous avons eu moins de diagnostics d'infections à *Bartonella* par rapport à 2016, avec 139 patients (-12%), dont 115 maladies des griffes du chat, 22 endocardites et 2 autres formes. Par rapport à 2016, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (115 *vs* 135, -14.8%) a diminué mais le nombre de diagnostics d'endocardites a augmenté (22 *vs* 16, +37.5%).

3.1. Description du réseau de partenaires

Le CNR a de nombreux partenaires aussi bien en France qu'à l'étranger. La liste des partenariats et correspondants étrangers figure plus loin dans ce rapport. Sur le plan national, il n'existe pas de partenariat institutionnalisé mais le CNR collabore de façon durable avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire. Le CNR fournit notamment des antigènes et des sérums contrôles positifs aux Laboratoires des CHU de Bordeaux (Pr. BEBEAR), Paris (Pr. MAINARDI), Strasbourg (Pr. JAULHAC), Tours (Pr. GOUDEAU) et du CHG d'Aix en Provence (Dr. CHARDON) ainsi qu'à l'étranger (Russie, Slovaquie, Espagne, Suisse, Taiwan…).

Centre de référence	**Année de création**
Centre de Référence pour l'étude et le diagnostic des Rickettsioses, Bartonelloses, Fièvre Q et maladies transmises par les tiques	1985
Centre de référence BIOTOX pour la zone de défense Sud	2001
Centre collaborateur Orphanet et Centre de Référence de la Maladie de Whipple	2001
Centre de Ressources et de Compétences pour la mucoviscidose	2006
Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les rickettsioses	1998 - 2002
Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les rickettsioses et autres bactéries transmises par les arthropodes	2002-2014
Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies	2004

3.1.1. Collaborations avec l'ECDC

Le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est partenaire du **réseau EuroTravNet** depuis 2009 (www.eurotravnet.fr). EuroTravNet est un réseau de cliniciens européens spécialistes en médecine des voyages et en maladies tropicales. Le Pr Parola a créé EuroTravNet qui est actuellement dirigé par le Dr Philippe Gautret. Le but d'EuroTravNet est d'aider l'ECDC dans ses missions de détection des maladies infectieuses importées en Europe, et dans l'apport d'une expertise sur les maladies transmissibles. EuroTravNet a proposé aux membres du réseau (40 centres dans 20 pays en Europe) une surveillance des rickettsioses européennes avec la proposition d'analyser les échantillons au CNR de Marseille. La base du réseau est constituée par les sites européens du réseau Geosentinel (www.geosentinel.org).

3.1.2. Coopérations institutionnelles

Le CNR collabore étroitement avec l'ESCCAR (European Society for Chlamydioses, Coxiellosis, Anaplasmosis, Rickettsioses and other arthropod-borne intracellular bacteria) depuis sa création par le Pr Raoult, 1er Président de l'ESCAR. Depuis 2016, le Pr Fournier est président de l'ESCCAR. En 2017, le Pr Fournier a organisé à Marseille, dans les locaux de l'IHU Méditerranée-Infection le congrès joint de l'ESCCAR et de l'American Society for Rickettsiology du 19 au 21 juin. L'ensemble des membres du CNR a participé activement à la réussite de ce congrès, qui marquait le cinquantième anniversaire des congrès internationaux de rickettsiologie. Le congrès a réuni 254 participants de 33 pays. Cent sept présentations orales (23, 24) et 100 posters (25-28) ont été présentés, et le congrès a fait l'objet de la publication de numéros spéciaux dans les journaux Microbes and Infection (13), New Microbes and New Infections (22) et Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases (10, 11).
L'ESCCAR réunit les trois Centres Collaborateurs OMS Européens (Marseille, Moscou, Bratislava).

Centres collaborateurs OMS sur les rickettsioses

- Gamaleya Institute (Russie)
- Slovak Academy of Science (Slovaquie)
- Center for Diseases Controls (Atlanta – USA)
- Center for Tropical Diseases (Galveston, USA)
- Center for Tropical Diseases (Heraklion, Grèce)

Collaborations internationales autres

- Laboratoire de référence : contrôle externe
- Suède **:** S. Vene – Stockholm
- Suisse : A. Dumoulin – Sion
- USA : C. Paddock – CDC

3.1.3. Collaborations avec les pays étrangers

Le CNR a noué des collaborations avec de nombreuses équipes au tour du monde. De nombreux échanges de chercheurs ont notamment été réalisés. Des coopérations spécifiques dans le domaine du diagnostic des nouvelles maladies infectieuses ont été conduites avec les institutions suivantes :

- Shanghai II
- Université de Pékin
- SPS (Japon)
- OMSK Scientific Research Institute of Natural Foci Infections (Omsk, Russie)
- Hôpital de Tunis (Tunisie)
- Université de Sfax (Tunisie)
- Université de Sousse (Tunisie)
- Hôpital de Batna (Algérie)

- Hôpital de Bamako (Mali)
- Hôpital Principal de Dakar (Sénégal)
- Welcome trust d'Oxford (Grande-Bretagne, Thaïlande) et Hôpital de Ventiane (Laos)
- Université de Lausanne (Suisse)
- Université de Palerme (Italie)
- Hôpital de Tamilnadu (Inde)
- Hôpital de Bangkok (Thaïlande)
- Institut Pasteur Alger (Algérie)
- Institut Pasteur Casablanca (Maroc)
- Université d'Edirne (Turquie)
- Institut Vétérinaire de Palmerston (Nouvelle-Zélande)
- Hôpital d'Oslo (Norvège)

Les collaborateurs étrangers du CNR comportent notamment :

Pays	Correspondant	Ville
Europe		
Belgique	Dr Monny Hing	Bruxelles
Espagne	Pr Jose Oteo	Logrono
Grande Bretagne	Pr Richard Birtles	Manchester
Grèce	Pr Yannis Tselentis	Heraklion
	Pr Achilleas Gikas	Heraklion
Italie	Dr Laura Franzin	Turin
Norvège	Pr Mogens Jensenius	Oslo
Portugal	Dr Anna Santos	Lisbonne
	Dr Rita de Sousa	Lisbonne
Russie	Pr Stanislav Shpynov	Moscou, Omsk
Slovakie	Dr Zuzana Sekeyova	Bratislava
Suisse	Pr Gilbert Greub	Lausanne
	Dr Alexis Dumoulin	Sion
Maghreb		
Algérie	Dr Idir Bitam	Alger
	Dr Kheira Mokrani	Batna
	Pr Najet Mouffok	Oran
Maroc	Dr Nadia Boudebouch	Casablanca
Tunisie	Pr Amel Letaief	Sousse
	Dr Abir Znazen	Sfax
Asie		
Japon	Pr Hisachi Inokuma	Obihiro
Laos	Pr Paul Newton	Vientiane
Thailande	Dr Yupin Supputamongkol	Bangkok
	Pr George Watt	Bangkok

Océanie		
Australie	Pr Stephen Graves	Victoria
	Pr John Stenos	Geelong
Polynésie française	Dr Didier Musso	Papeete
Amériques		
Canada	Pr Thomas J. Marrie	Edmonton
Saint Kitts/Nevis	Pr Patrick Kelly	Basseterre
USA	Dr Christopher Paddock	Atlanta
	Dr Gregory Dasch	Atlanta

3.1.4 Collaborations avec l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est partenaire du laboratoire d'études et de recherches sur la pathologie des petits ruminants et des abeilles, dépendant de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Ce laboratoire, situé à Sophia-Antipolis, est laboratoire national de référence (LNR) pour la fièvre Q en santé animale depuis décembre 2009. A ce titre et dans le cadre d'un groupe de travail avec la direction générale de l'alimentation (DGAL), il participe à la mise en place un réseau pilote des laboratoires départementaux d'analyse chargés du diagnostic de cette pathologie.

Il fournit un appui scientifique et technique aux services vétérinaires de l'Etat : analyse de prélèvements en seconde intention, contrôle de vaccins, fourniture de réactifs de référence, suivi de la qualité des analyses des laboratoires de terrain (au travers d'essais inter-laboratoires notamment), expertise d'outils de diagnostic du commerce et mène des recherches portant sur l'harmonisation des outils pour le diagnostic et l'épidémiologie. Il s'est investi dans plusieurs études sur la vaccination en tant qu'outil de la gestion en élevage.

Le CNR et le LNR ont débuté en 2016 une collaboration scientifique sur l'étude génomique comparée des souches humaines et animales de *Coxiella burnetii*, matérialisée par l'embauche d'un étudiant post-doctorant commun. En 2017, le CNR et le LNR ont analysé le pangénome de *Coxiella burnetii* en comparant les séquences de 79 génomes. Les résultats de cette étude font actuellement l'objet d'un article qui sera soumis pour publication en 2018.

3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.3. Surveillance des rickettsioses, de la fièvre Q et des bartonelloses

Origine des prélèvements

Le CNR reçoit et analyse des échantillons cliniques en provenance des centres hospitaliers régionaux et généraux, des Hôpitaux d'instruction des armées, des hôpitaux et cliniques privés, de l'institut Pasteur (Paris, Lille, Cayenne) et de nombreux laboratoires d'analyses de biologie médicale et/ou de microbiologie en France et à l'étranger.

3.3.1 Diagnostic de la fièvre Q

En 2017, 13867 échantillons de sérum provenant de 11240 patients ont été testés au CNR pour la présence d'anticorps contre *C. burnetii* contre 13890 prélèvements de 11309 patients en 2016 (-0.6%). De plus, nous avons reçu 6163 échantillons divers (sang, biopsies ganglionnaires, valves cardiaques, biopsies vasculaires, osseuses, …) de 4233 patients (contre 6631 échantillons de 4364 patients en 2016, -3.0%%) pour diagnostic moléculaire et culture.

A. Diagnostic sérologique

Au total, 986 échantillons de sérum (**499 patients**) se sont révélés positifs en IgG (≥ 1 :100) et/ou IgM (≥ 1 :50). **Cent quatre-vingt-quatorze** nouveaux cas de fièvre Q aiguë ont été diagnostiqués en 2017 contre **177** (+9.6%) en 2016, et **68** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée contre **93** (-26.9%) en 2016. Enfin, **303** patients présentaient un profil de fièvre Q ancienne ou persistante focalisée diagnostiquée avant 2017 et en cours de traitement.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Trois cent vingt-sept prélèvements provenant de **89** patients ont fait l'objet d'une détection de *C. burnetii* positive par détection moléculaire.

C. Diagnostic par culture

En outre, **17** souches de *Coxiella burnetii* ont été isolées en culture cellulaire de biopsies de valves cardiaques (11), osseuses (3), d'anévrysmes de l'aorte (2) et de sang (2) (cf. Tableau sur le site Web du CNR).

C. Fièvres Q aiguës

Le nombre de patients atteints de fièvre Q aiguë en 2017 et pour lesquels le CNR a reçu des prélèvements était de **194**, répartis en **144** patients en France métropolitaine, **45** patients en Guyane française, 2 patients en Martinique et Guadeloupe, 2 patients en Italie et 1 patient à Monaco. L'incidence de la fièvre Q aiguë en France (métropole et départements d'Outre-Mer) calculée à partir des diagnostics obtenus au CNR en 2017 est de **0.29** pour 100.000 personnes, en baisse par rapport à

2016 (0.32). Ce taux d'incidence est un taux minimum qui sous-estime la réalité puisque la maladie n'est pas à déclaration obligatoire. Deux épidémies de fièvre Q aiguë ont été décelées en 2017 en France, l'une entre avril et mai dans l'agglomération de Niort, et la seconde entre mars et juillet dans une ferme à Sarzay dans l'Indre. Parmi les 194 patients atteints de fièvre Q aiguë, **138 (71.1%)** étaient de sexe masculin (sex ratio M/F 2.46). L'âge moyen des patients atteints de fièvre Q était de **50 ± 18** ans. Le plus jeune patient atteint de fièvre Q aiguë avait 3 ans, et le plus âgé 89 ans. **Quatre-vingt-douze** des 194 patients atteints de fièvre Q aiguë présentaient une hépatite fébrile (47.4%), **45** une pneumonie (23.2%), **41** une fièvre isolée (21.1%), **6** une pneumonie et une hépatite (3.1%), **3** une infection ostéo-articulaire (1.5%), **2** une méningite (1.0%), **2** endocardites aiguës (1.0%), **1** cas d'adénopathies chroniques (0.5%), **1** une infection vasculaire aiguë (0.5%) et **1** cas est survenu en cours de grossesse (0.5%) (Tableau 3).

Tableau 3 : Données démographiques des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués au CNR en 2017

Forme clinique	**Nombre**	**Age moyen ± écart-type**	**Sex ratio M/F**
Hépatite	92	47 ± 17.7	3.8
Pneumonie	45	52 ± 16.6	1.2
Fièvre isolée	41	51± 23.2	3.1
Hépatite + pneumonie	6	62 ± 15.4	5
Infection ostéo-articulaire aiguë	3	56 ± 6.3	2
Méningite	2	48 ± 24.0	1
Endocardite aiguë	2	67 ± 2.8	1
Adénopathies chroniques	1	61	F
Infection vasculaire aiguë	1	69	F
Infection en cours de grossesse	1	36	F

La répartition temporelle des cas métropolitains de fièvre Q aiguë en fonction du mois du diagnostic pour 2017 montre un pic principal en mai-juin (25.5%) (Figure 1). Il est à noter que cette répartition est différente de celle observée au cours des années 2013 à 2016 car le un second pic en janvier a été moins marqué en 2017. La répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q en 2017 est présentée dans la Figure 2. La majorité des nouveaux cas de fièvre Q aiguë (31,9%) a été diagnostiquée dans la région Provence–Alpes–Côte d'Azur (PACA), suivie par les régions Nouvelle Aquitaine (23.4%), Auvergne-Rhône-Alpes (18.4%) et Occitanie (9.2%). Quatre-vingt-quatre des patients ayant contracté la fièvre Q en métropole présentaient une hépatite (58.3%), 36 une fièvre isolée (25.0%), 9 une forme pulmonaire (6.2%), 6 à la fois une hépatite et une pneumonie (4.2%), 3 une infection ostéo-articulaire (2,0%), 2 une méningite (1.4%), 1 une endocardite aiguë (0.7%), 1 des adénopathies chroniques (0.7%), 1 une infection vasculaire aiguë (0.7%) et 1 cas est survenu en cours de grossesse (0.7%).

Outre-mer, la Guyane est la région française où la fièvre Q a la plus forte incidence (Figure 5), avec **45** nouveaux cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués en 2017, soit une incidence pour 100.000 habitants de 17,3, en légère augmentation par rapport à l'année 2016 (17.2), ce qui confirme la réascension observée en 2016. Au plan clinique, la fièvre Q en Guyane s'est manifestée en 2017 en majorité par une pneumonie interstitielle fébrile (35 patients, 77.8%), suivie par hépatite (5 patients, 11.1%) et fièvre isolée (5 patients, 11.1%) ce qui diffère significativement à nouveau de la fièvre Q aiguë en métropole ($p < 10^{-2}$). En revanche, aucun cas de fièvre Q chronique n'a été diagnostiqué en Guyane en 2017. En outre, le CNR a reçu en 2017 des prélèvements de sérum pour 37 patients suivis pour fièvre Q ayant été diagnostiquée au cours des années précédentes, dont 28 patients ayant développé une fièvre Q aiguë et 9 une fièvre Q chronique.

Enfin, le CNR a diagnostiqué un cas de fièvre Q aiguë en Guadeloupe (endocardite aiguë), deux cas de fièvre Q chronique à la Réunion (endocardite et infection ostéo-articulaire), un cas de fièvre Q aiguë et un cas de fièvre Q chronique à Monaco (hépatite et endocardite, respectivement), deux cas de fièvre Q aiguë en Italie (hépatites), quatre cas de fièvre Q chronique en Israël (endocardites), un cas de fièvre Q chronique dans chacun des pays suivants : Australie (endocardite), Autriche (endocardite), Canada (endocardite), Hongrie (endocardite), et Grande Bretagne (endocardite). De plus, des prélèvements de suivi de patients ont été reçus de Belgique, Finlande, Israël, Italie et Grande Bretagne.

Figure 1. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2017 en France métropolitaine

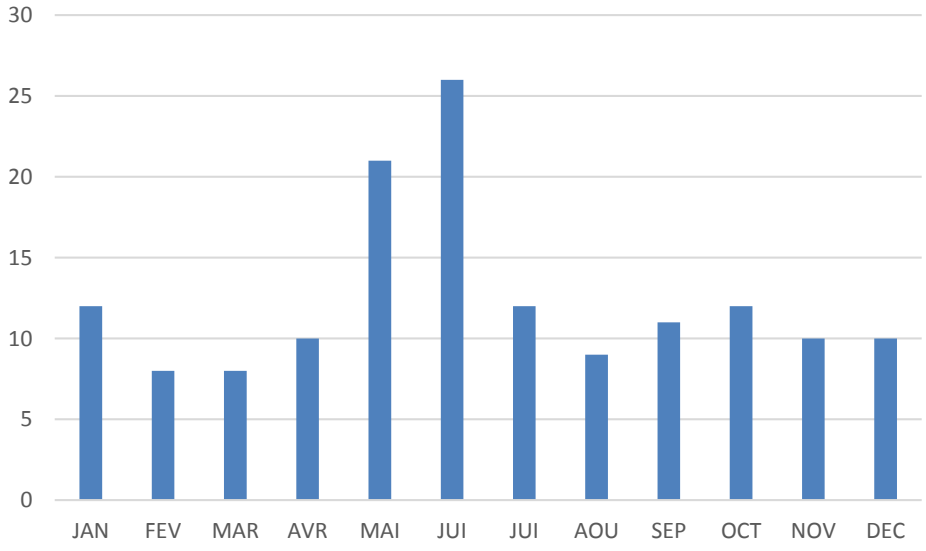


Figure 2. Répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q diagnostiqués par le CNR en France métropolitaine en 2017

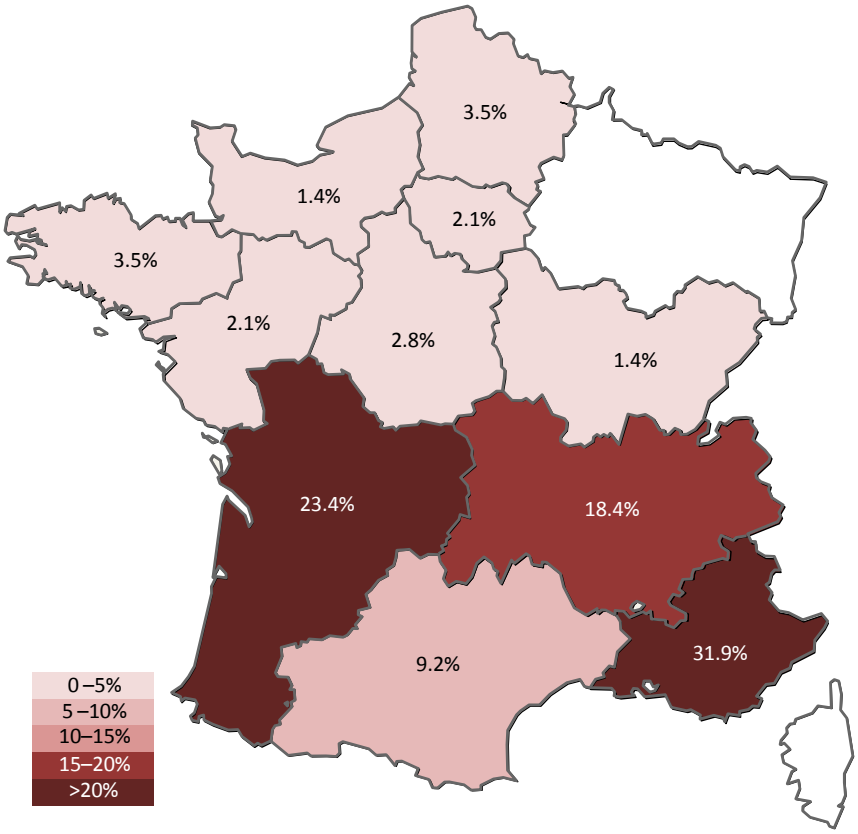
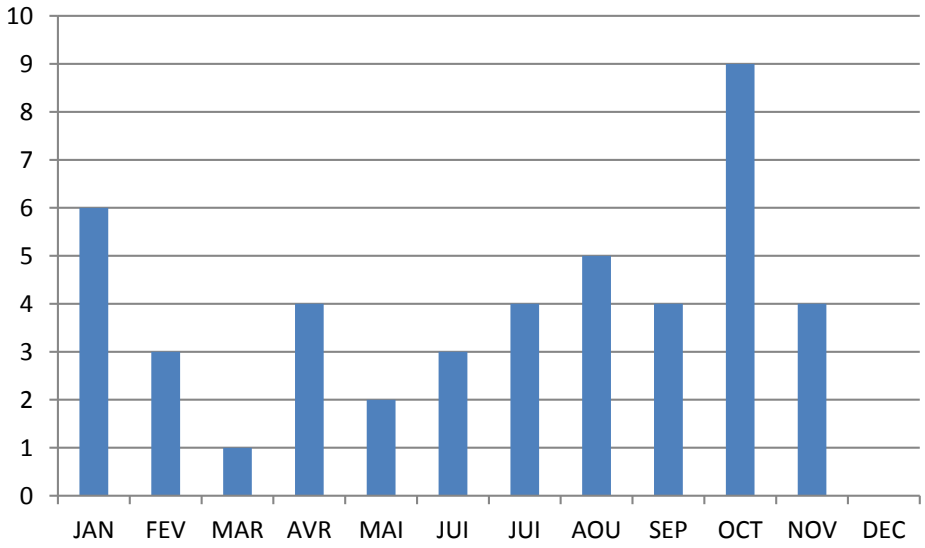


Figure 3. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2017 en Guyane française



D. Epidémies de fièvre Q aiguë en France métropolitaine en 2017

D.1. Epidémie de Niort, Deux Sèvres

Le mardi 6 juin 2017, l'infectiologue du Centre Hospitalier de Niort a signalé à Santé publique France une augmentation inhabituelle du nombre de cas de fièvre Q hospitalisés dans son service, depuis le début du mois de mai.

- 10 de cas de fièvre Q avaient été hospitalisés au CH de Niort depuis le 19 avril 2017 (vs 50 cas depuis 2010),
- Tous les cas ont été confirmés par sérologie au Laboratoire du centre hospitalier (toutes les séroconversions ont été envoyées au CNR dans le cadre de la surveillance),
- Les cas étaient domiciliés plutôt à l'ouest de Niort, vers l'entrée du Marais Poitevin.
- Aucun lien entre les cas ni d'exposition commune n'ont été identifiés à ce jour (mais des expositions individuelles à risque sont rapportées par les cas)
- Aucune augmentation n'a été observée par les infectiologues de Poitiers et Tours

Au vu de ces premiers éléments qui ont confirmé le caractère groupé et l'excès de cas, la CIRE Nouvelle Aquitaine, en lien avec la CVAGS, a débuté une investigation épidémiologique des cas pour étudier l'hypothèse d'une exposition commune et d'identifier le cas échéant la ou les sources de contamination.

L'enquête épidémiologique a ciblé la période du 15 avril au 23 mai 2017. Un cas probable a été défini comme toute personne résidant ou ayant séjourné à Niort ou dans un rayon de 20km dans le mois précédent la date de début des signes et ayant présenté pendant la période étudiée une symptomatologie infectieuse évocatrice de fièvre Q. Un cas confirmé été défini comme toute personne résidant ou ayant séjourné à Niort ou dans un rayon de 20km dans le mois précédent la date de début des signes, ayant présenté pendant la période étudiée une symptomatologie infectieuse évocatrice de fièvre Q et ayant une sérologie positive de fièvre Q (IgM de phase II).

En parallèle, le CNR a transmis tous les cas confirmés de fièvre Q dans la région sur la période investiguée et une extraction de la base 3 Labos a été réalisée.

L'enquête épidémiologique a permis de recenser 12 cas de fièvre Q. La quasi-totalité des cas étaient des hommes (11). L'âge moyen des cas était de de 43 ans (min 21 ; max 64). Aucun cas ne travaillait dans le secteur agricole. La majorité des cas (9) était domicilié dans les Deux-Sèvres dont 5 à Niort et 4 dans un rayon de 20 km autour. Deux cas étaient domiciliés en Charente-Maritime et un en Vendée, tous les 3 dans des communes proches des Deux-Sèvres. Les cas sont survenus entre le 15 avril et le 23 mai 2017, avec un regroupement des cas en semaine 16 entre le 15 et le 24 avril 2017.

Tous les patients ont développé une hépatite, dont 1 avec une défaillance multi-viscérale. Dix des patients ont été hospitalisés au CH de Niort entre le 19 avril et le 28 mai 2017. Dix patients ont reçu un traitement par doxycycline. Une sérologie a été réalisée pour tous les cas. Pour 8, une séroconversion a été observée, et confirmée par le CNR pour 6 cas.

Même si de nombreux élevages sont répertoriés dans la région de Niort, l'enquête d'exposition n'a pas permis de retrouver de source de contamination commune mais tous les cas ont séjourné à Niort et alentours au cours de la période à risque, y compris les cas domiciliés en Charente-Maritime et

en Vendée. Le cas n°9 a rapporté la présence d'un abattoir à 1-2km de son lieu de travail à Celle-sur-Belle.

Une information des Hôpitaux et des Médecins généralistes alentours a été faite par l'ARS sur la recrudescence de cas de fièvre Q dans la région et un rappel sur la maladie (recommandation diagnostic et traitement).

D.2. Epidémie de Sarzay, Indre

En juin 2017, deux cas de fièvre Q ont été signalés à l'Agence Régionale de Santé du Centre-Val de Loire, dans une famille gérant une ferme ovine avec une activité d'accueil touristique. Selon ces exploitants, plusieurs touristes ayant fréquenté leur ferme avaient aussi présenté des symptômes évoquant une fièvre Q. Une investigation a été menée par l'ARS, la Direction Générale de l'Alimentation, le Laboratoire National de Référence de la fièvre Q et Santé Publique France afin d'identifier le nombre de personnes atteintes de FQ et confirmer la source d'exposition. Le CNR a participé à l'enquête en confirmant les cas suspects.

Sur les 139 personnes interrogées, 15 ont été confirmés comme des cas de fièvre Q (sérologie ou PCR positive) dont une femme enceinte, et 14 considérés comme des cas suspects (symptomatologie évocatrice sans diagnostic biologique), soit un taux d'attaque compris entre 11% (15/139) et 21% (29/139). Vingt-trois des 27 (85%) touristes qui étaient des cas suspects ou confirmés ont séjourné sur le site pendant la période de l'agnelage, entre le 17 avril et le 8 mai, soit un **taux d'attaque de 35%** (23/66). Des prélèvements environnementaux ont montré une contamination faible mais persistante des parties communes d'un bâtiment, fréquentées par les cas. Le troupeau n'était plus excréteur au moment de l'investigation malgré une vague d'avortements survenus début 2017, possiblement suite à l'introduction d'animaux infectés.

Cette investigation a permis l'identification d'un cluster de cas de fièvre Q lié à une exploitation agricole recevant du public. Elle fera également l'objet d'une présentation aux Journées Nationale d'Infectiologie à Nantes en juin 2018.

E. Formes persistantes focalisées d'infections à *C. burnetii*

Soixante-huit nouveaux cas d'infection persistante focalisée à *C. burnetii* (fièvre Q chronique) ont été diagnostiqués par le CNR en 2017 contre **93** en 2016 (-26.9%). Parmi ces patients, le sex ratio H/F était de 3,25 (52/16) et l'âge moyen était de 63 ± 17.2 ans. Les infections focales à *C. burnetii* se répartissaient selon les formes suivantes : endocardites (N = 37, 54,4%) et infections vasculaires (N = 17, 25,0%). Les patients atteints d'infections vasculaires présentaient un sex ratio (16/1) et un âge plus élevés que ceux présentant une endocardite (68 ± 9.7 ans *vs* 59 ± 20.9 ans). Concernant l'origine des patients présentant une forme persistante focalisée de fièvre Q, la région PACA est première (8 endocardites et 6 infections vasculaires), suivie d'Auvergne-Rhône-Alpes (4 EI, 2 IV et 2 hépatites chroniques), île de France (3 EI, 2 IV, 1 infection ostéo-articulaire et 1 fièvre persistante) et Occitanie (2 EI et 3 IV). En dehors de la France métropolitaine, 1 endocardite, 1 infection d'anévrysme de l'aorte et 1 infection de hanche ont été diagnostiquées chez des patients de la Réunion, 1 endocardite à Monaco, 3 endocardites et 1 infection vasculaire en Israël, et 1 en Australie, 1 au Canada et 1 en Hongrie.

3.3.2 Diagnostic des Rickettsioses

En 2017, 64 cas de rickettsioses ont été diagnostiqués au CNR contre 62 en 2016 (+3%).

A. Diagnostic sérologique

Parmi les **11240** patients testés, un diagnostic de rickettsiose a été porté chez **64** patients (Figure 4). Ces diagnostics incluent les diagnostics suivants : **18 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne** (FBM, 16 causés par *R. conorii* et 2 par *R. massiliae*), **15 cas d'African tick-bite fever** (ATBF, *R. africae*), **9 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis** (LAR, *R. sibirica* sous-espèce *mongolitimonae*), **9 cas de typhus murin** (TM, *R. typhi*), **9 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite** (SENLAT, 7 causés par *R. slovaca* et 2 par *R. raoultii*), **3 cas de fièvre boutonneuse à puce** (FB, *R. felis*) et **1 cas de typhus des broussailles** (TB, *O. tsutsugamushi*). Les caractéristiques des patients infectés par type d'infection ainsi que le lieu géographique de la piqure lorsqu'il était connu figurent dans le Tableau 4. La distribution temporelle des cas de rickettsioses est montrée dans la figure 4.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Mille deux cent cinquante-quatre prélèvements de 861 patients ont fait l'objet d'un diagnostic par biologie moléculaire. Soixante-et-un (4,9%) de ces prélèvements se sont révélés positifs et ont permis de contribuer au diagnostic de rickettsioses pour 43 des 64 patients positifs. La nature des prélèvements les plus fréquemment positifs étaient les biopsies cutanées (33%) et les écouvillons d'escarre (20%) et les échantillons de sérum (34%).

C. Diagnostic par culture

En outre, 2 souches de rickettsies ont été isolées en culture cellulaire de tiques, incluant 1 souche de *R. slovaca* et 1 souche de *R. raoultii* (cf. Tableau sur le site Web du CNR).

D. Répartition des cas de rickettsioses diagnostiqués

Les 18 cas de FBM sont survenus en totalité de juin à septembre dans le pourtour méditerranéen (Figure 4, Tableau 4), qui est la zone d'endémie de cette rickettsiose associée à la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus.* Huit cas ont été contractés en France, 7 en Algérie, 2 au Maroc et 1 en Italie. Sur les 15 cas d'ATBF, 14 ont été contractés lors de visites de parcs animaliers d'Afrique du sud (13) ou du Zimbabwe (1), où la maladie est endémique et transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. Le dernier cas a été contracté après piqûre de tique en Guadeloupe. Les 9 patients présentant une LAR ont été infectés en région PACA dans 3 cas, en région Occitanie dans 3 cas, et en région Nouvelle Aquitaine, au Botswana et en Tunisie dans 1 cas chacun. En France, les cas sont survenus entre avril et août (Figure 4). Les 9 patients présentant un tableau de SENLAT ont été contractés dans les régions suivantes : PACA (5), Auvergne-Rhône-Alpes (3), Pays de la Loire (1), de décembre à juin. Les 9 patients atteints de typhus murin revenaient d'Algérie, du Cambodge, du Congo,

de Grèce, d'Inde, de la Réunion, du Sénégal, de Thaïlande et de Tunisie, respectivement. Les 3 cas de fièvre boutonneuse à puce ont été contractés en Afrique du sud, Italie et à Madagascar, respectivement. Le cas de typhus des broussailles a été contracté au Cambodge.

Figure 4. Répartition mensuelle des cas de rickettsioses diagnostiqués en 2017

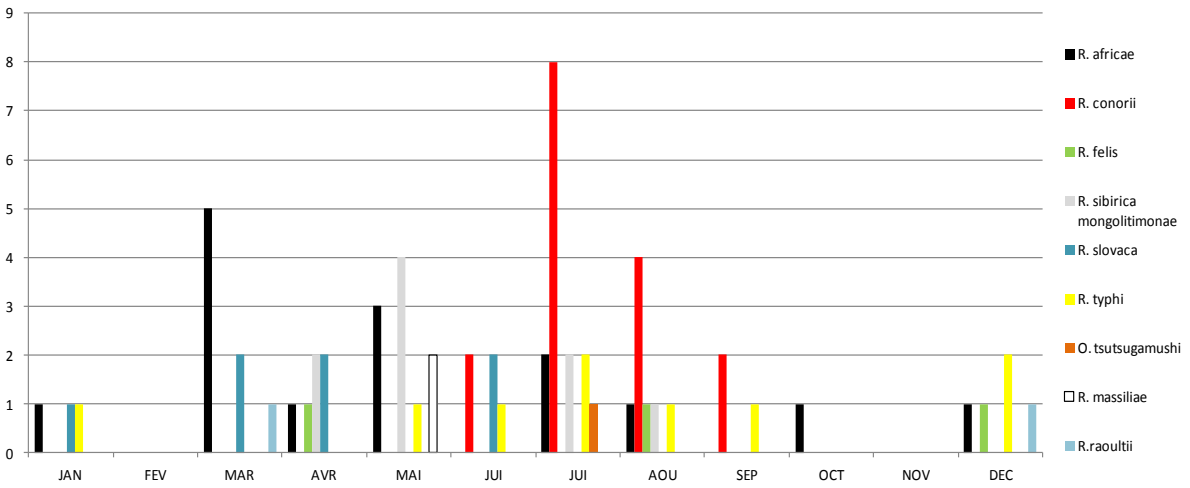


Tableau 4. Caractéristiques des patients chez lesquels un diagnostic de rickettsiose a été posé en 2017 (N = 64)

Infection	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard (médiane)	Lieu de piqure
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	14/4	51± 26 (61)	PACA, Occitanie, Algérie, Italie, Maroc
African tick-bite fever	10/5	56 ± 17.6 (53)	Afrique du Sud, Zimbabwe, Guadeloupe
Lymphangitis Associated Rickettsiosis	4/5	43 ± 25.7 (37)	Nouvelle Aquitaine, Occitanie, PACA, Botswana, Tunisie
SENLAT	2/7	39 ± 27.4 (50)	Auvergne-Rhône-Alpes, PACA, Pays de la Loire
Typhus murin	7/2	43 ± 17.9 (36)	Algérie, Cambodge, Congo, Grèce, Inde, la Réunion, Sénégal, Thaïlande, Tunisie
Fièvre boutonneuse à puces	2/1	53 ± 9.5 (53)	Afrique du sud, Italie, Madagascar
Typhus des broussailles	1/0	23	Cambodge

3.3.3 Diagnostic des Bartonelloses

En 2017, 139 cas d'infections à *Bartonella* sp. ont été diagnostiqués au CNR, contre 158 en 2016 (-12%)**. Cent quinze** de ces patients étaient atteints de **maladie des griffes du chat** (MGC). Un diagnostic d'**endocardite** a été porté chez **22** patients : à *B. quintana* (11 patients) ou *B. henselae* (11 patients). Un cas de **bactériémie chronique** à *B. quintana* et un cas **d'infection de prothèse vasculaire** aorto-bifémorale à *B. alsatica* ont également été diagnostiqués.

A. Diagnostic sérologique

Cinquante-quatre échantillons de sérums (pour 45 patients) se sont révélés positifs (taux d'IgG ≥ 1 :100) en sérologie. Les sérums positifs étaient ceux de patients atteints de maladie des griffes du chat ou d'endocardite.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Cent cinquante-huit des 2898 prélèvements adressés pour diagnostic moléculaire, pour **137** patients, se sont révélés positifs.

C. Diagnostic par culture

En outre, une souche de *Bartonella quintana* a été cultivée en 2017 à partir d'une biopsie de valve cardiaque (cf. Tableau sur le site Web du CNR).

D. Maladie des griffes du chat

Un diagnostic de maladie des griffes du chat (MGC) a été porté chez **115 patients** (Figure 7). Les patients atteints de MGC étaient majoritairement des hommes (66/115) d'un âge moyen de 28 ± 18 ans (contre 32 ± 20 pour les femmes). Cette population était plus jeune que les autres patients atteints d'autres formes de bartonelloses (Tableau 5). La figure 5 montre la répartition des cas de MGC en fonction du mois de diagnostic avec une forte saisonnalité, déjà observée au cours des années précédentes : 63.5% des cas sont diagnostiqués d'octobre à février. La répartition géographique des cas de MGC (Figure 8) montrait une prédominance des cas dans le ¼ sud-ouest de la France, comme en 2013, 2014, 2015 et 2016 : les régions Nouvelle Aquitaine et Occitanie arrivaient en tête avec 27,0 et 26.1%% des cas, respectivement, suivies par la région Auvergne-Rhône-Alpes (18,4%). Les cas de maladie des griffes du chat en région PACA ne représentaient que 10,8% de l'ensemble des diagnostics au niveau national malgré le biais que représente la présence du CNR dans cette région.

Figure 5. Répartition temporelle des cas de maladies des griffes du chat en 2017 par mois de diagnostic

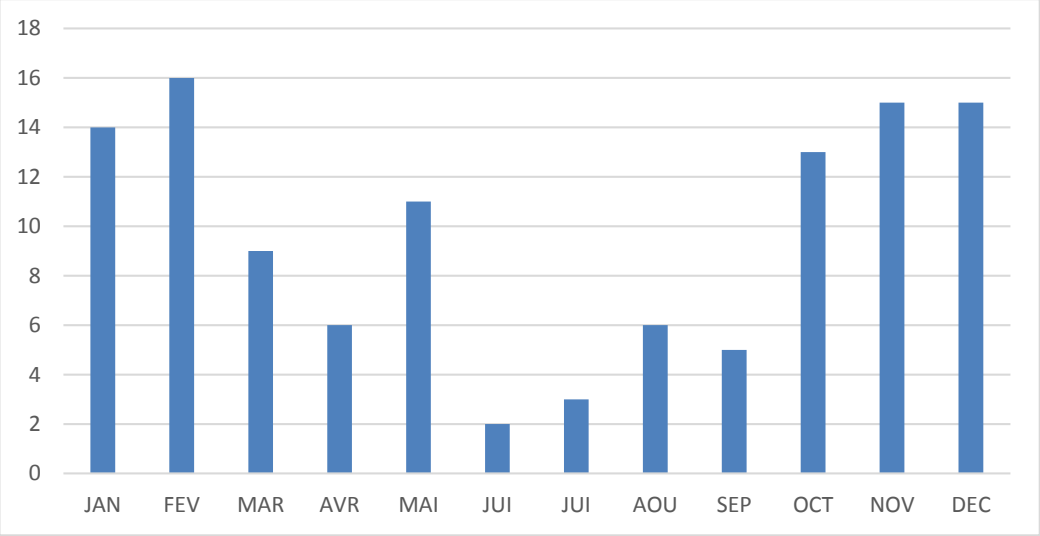
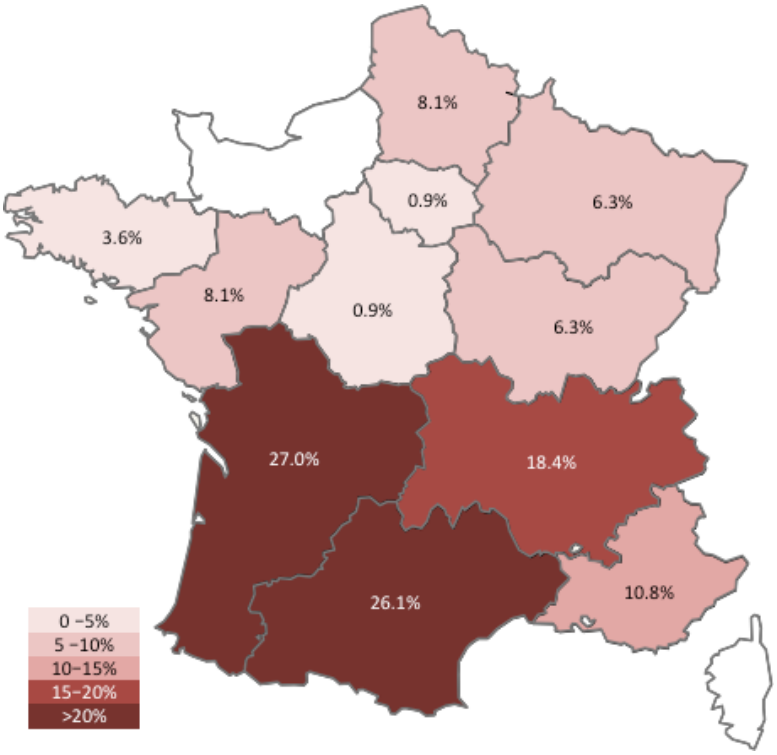


Figure 6. Répartition géographique des cas de maladie des griffes du chat diagnostiqués par le CNR en France en 2017



E. Autres bartonelloses

Le tableau 5 montre les autres diagnostics de bartonelloses établis par le CNR ainsi que les caractéristiques des patients. Un diagnostic d'endocardite à *B. henselae* a été porté chez 11 patients, d'endocardite à *B. quintana* chez 11 patients, d'infection de prothèse vasculaire aorto-bifémorale à *B. alsatica* chez 1 patient et de bactériémie chronique à *B. quintana* chez 1 patient SDF.

Tableau 5. Bartonelloses autres que la maladie des griffes du chat : Caractéristiques démographiques

Infection	Nombre de cas	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard (médiane)	Région d'origine
Endocardite à *B. henselae*	11	9/2	54.0± 18.0 (56)	Auvergne-Rhône-Alpes, Bretagne, Centre-Val de Loire, Hauts de France, Nouvelle Aquitaine, Occitanie, PACA, Grande-Bretagne
Endocardite à *B. quintana*	11	8/3	56.0± 19.4 (61)	Auvergne-Rhône-Alpes, Grand Est, Hauts de France, Ile-de-France, Nouvelle Aquitaine, Occitanie, PACA, Pays de la Loire, La Réunion, USA
Infection de prothèse vasculaire	1	1/0	68	Nouvelle Aquitaine
Bactériémie à *B. quintana*	1	0/1	63	PACA

3.3.4 Représentativité des données du CNR

Aucune des maladies surveillées par le CNR des rickettsioses, bartonelloses et de la fièvre Q n'étant à déclaration obligatoire, et plusieurs kits diagnostiques étant disponibles sur le marché pour ces pathologies, les données du CNR ne reflètent que partiellement leur épidémiologie au niveau national. En témoigne la sur-représentation des échantillons adressés par des laboratoires de la région PACA où est situé le CNR. Il en va de même pour le nombre de diagnostics.

En revanche, pour essayer d'approcher la réalité de l'épidémiologie de la fièvre Q en France, nous avons programmé pour l'année 2017 une analyse des données du PMSi sur la fièvre Q en collaboration avec l'agence Santé Publique France (Docteur Alexandra MAILLES). Pour des raisons de surcharge de travail, cette analyse n'a pas été possible et sera reportée à 2018.

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

Il n'existe pas de programme de surveillance de la résistance aux anti-infectieux des microorganismes surveillés par le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* car ces bactéries, soumises à peu de pression de sélection, n'ont pas, ou très peu, développé de résistance. Toutefois, la description de quelques souches de sensibilité diminuée à la doxycycline de *Coxiella burnetii* a motivé la recherche plus systématique des mutations décrites chez les patients suivis et traités à Marseille par le Pr Raoult. Dans ce cadre, la détermination de la CMI des souches (lorsqu'elles sont cultivables) à la doxycycline et des dosages sériques réguliers de taux de doxycycline sont réalisés chez les patients suivis et traités.

En 2017, nous avons mis au point une méthode d'évaluation de la sensibilité des souches de *Coxiella burnetii* à l'hydroxychloroquine (6).

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est en contact régulier avec l'Agence Santé Publique France, en la personne du Dr Alexandra Mailles. Par l'intermédiaire du Dr Mailles, le CNR fournit annuellement à l'ECDC ses données de surveillance de la fièvre Q dans le cadre de la surveillance des zoonoses.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

4 Alerte

En 2017 le CNR a participé à l'investigation des deux épidémies de fièvre Q aiguës décrites ci-dessous.

4.1. Epidémie de Niort, Deux Sèvres

Le mardi 6 juin 2017, l'infectiologue du Centre Hospitalier de Niort a signalé à Santé publique France une augmentation inhabituelle du nombre de cas de fièvre Q hospitalisés dans son service, depuis le début du mois de mai.

- 10 de cas de fièvre Q avaient été hospitalisés au CH de Niort depuis le 19 avril 2017 (vs 50 cas depuis 2010),
- Tous les cas ont été confirmés par sérologie au Laboratoire du centre hospitalier (toutes les séroconversions ont été envoyées au CNR dans le cadre de la surveillance),
- Les cas étaient domiciliés plutôt à l'ouest de Niort, vers l'entrée du Marais Poitevin.
- Aucun lien entre les cas ni d'exposition commune n'ont été identifiés à ce jour (mais des expositions individuelles à risque sont rapportées par les cas)
- Aucune augmentation n'a été observée par les infectiologues de Poitiers et Tours.

Au vu de ces premiers éléments qui ont confirmé le caractère groupé et l'excès de cas, la CIRE Nouvelle Aquitaine, en lien avec la CVAGS, a débuté une investigation épidémiologique des cas pour étudier l'hypothèse d'une exposition commune et d'identifier le cas échéant la ou les sources de contamination.

L'enquête épidémiologique a ciblé la période du 15 avril au 23 mai 2017. Un cas probable a été défini comme toute personne résidant ou ayant séjourné à Niort ou dans un rayon de 20km dans le mois précédent la date de début des signes et ayant présenté pendant la période étudiée une symptomatologie infectieuse évocatrice de fièvre Q. Un cas confirmé été défini comme toute personne résidant ou ayant séjourné à Niort ou dans un rayon de 20km dans le mois précédent la date de début des signes, ayant présenté pendant la période étudiée une symptomatologie infectieuse évocatrice de fièvre Q et ayant une sérologie positive de fièvre Q (IgM de phase II).

En parallèle, le CNR a transmis tous les cas confirmés de fièvre Q dans la région sur la période investiguée et une extraction de la base 3 Labos a été réalisée.

L'enquête épidémiologique a permis de recenser 12 cas de fièvre Q. La quasi-totalité des cas étaient des hommes (11). L'âge moyen des cas était de de 43 ans (min 21 ; max 64). Aucun cas ne travaillait dans le secteur agricole. La majorité des cas (9) était domicilié dans les Deux-Sèvres dont 5 à Niort et 4 dans un rayon de 20 km autour. Deux cas étaient domiciliés en Charente-Maritime et un en Vendée, tous les 3 dans des communes proches des Deux-Sèvres. Les cas sont survenus entre le 15 avril et le 23 mai 2017, avec un regroupement des cas en semaine 16 entre le 15 et le 24 avril 2017.

Tous les patients ont développé une hépatite, dont 1 avec une défaillance multi-viscérale. Dix des patients ont été hospitalisés au CH de Niort entre le 19 avril et le 28 mai 2017. Dix patients ont reçu un traitement par doxycycline. Une sérologie a été réalisée pour tous les cas. Pour 8, une séroconversion a été observée, et confirmée par le CNR pour 6 cas.

Même si de nombreux élevages sont répertoriés dans la région de Niort, l'enquête d'exposition n'a pas permis de retrouver de source de contamination commune mais tous les cas ont séjourné à Niort et alentours au cours de la période à risque, y compris les cas domiciliés en Charente-Maritime et en Vendée. Le cas n°9 a rapporté la présence d'un abattoir à 1-2km de son lieu de travail à Celle-sur-Belle.

Une information des Hôpitaux et des Médecins généralistes alentours a été faite par l'ARS sur la recrudescence de cas de fièvre Q dans la région et un rappel sur la maladie (recommandation diagnostic et traitement).

4.2. Epidémie de Sarzay, Indre

En juin 2017, deux cas de fièvre Q ont été signalés à l'Agence Régionale de Santé du Centre-Val de Loire, dans une famille gérant une ferme ovine avec une activité d'accueil touristique. Selon ces exploitants, plusieurs touristes ayant fréquenté leur ferme avaient aussi présenté des symptômes évoquant une fièvre Q. Une investigation a été menée par l'ARS, la Direction Générale de l'Alimentation, le Laboratoire National de Référence de la fièvre Q et Santé Publique France afin d'identifier le nombre de personnes atteintes de FQ et confirmer la source d'exposition. Le CNR a participé à l'enquête en confirmant les cas suspects.

Sur les 139 personnes interrogées, 15 ont été confirmés comme des cas de fièvre Q (sérologie ou PCR positive) dont une femme enceinte, et 14 considérés comme des cas suspects (symptomatologie évocatrice sans diagnostic biologique), soit un taux d'attaque compris entre 11% (15/139) et 21% (29/139). Vingt-trois des 27 (85%) touristes qui étaient des cas suspects ou confirmés ont séjourné sur le site pendant la période de l'agnelage, entre le 17 avril et le 8 mai, soit un **taux d'attaque de 35%** (23/66). Des prélèvements environnementaux ont montré une contamination faible mais persistante des parties communes d'un bâtiment, fréquentées par les cas. Le troupeau n'était plus excréteur au moment de l'investigation malgré une vague d'avortements survenus début 2017, possiblement suite à l'introduction d'animaux infectés.

Cette investigation a permis l'identification d'un cluster de cas de fièvre Q lié à une exploitation agricole recevant du public. Elle fera également l'objet d'une présentation aux Journées Nationale d'Infectiologie à Nantes en juin 2018.

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

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

L'IHU Méditerranée Infection organise chaque semaine un séminaire de microbiologie clinique au cours duquel les titulaires du CNR et les internes en formation présentent des cas cliniques et la bibliographie qui s'y rapporte. Ces séminaires sont ouverts aux professionnels de santé, hors CHU qui souhaitent y participer. Les infectiologues des CHP Saint Joseph et Clairval, Marseille, assistent sur un rythme régulier à ces séminaires.

Chaque semaine un staff organisé le lundi matin, avec l'ensemble des personnels concernés, permet de présenter tous les diagnostics faits par le CNR. A l'issue de cette réunion, les professionnels de santé ayant adressé des échantillons qui se sont révélés positifs sont informés par téléphone ou courriel.

En 2017, le CNR a reçu 7 stagiaires venus se former aux techniques de sérologie et de diagnostic moléculaire en lien avec les thématiques du CNR.

Tous les appels ou courriels sont réceptionnés par le secrétariat du CNR et redirigé vers les médecins séniors titulaires. En moyenne le CNR reçoit du lundi au vendredi 10 appels et autant de courriels en lien avec ses thématiques de recherche.

Présentation du Site Internet du CNR

Le Site Internet du CNR, dont l'adresse est la suivante http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=349&titre=centre-national-de-reference-des-rickettsia-coxiella-et-bartonella comprend l'ensemble des informations relatives à notre activité.

Sur ce site sont notamment référencés les aspects épidémiologiques, cliniques, diagnostiques et thérapeutiques des **maladies infectieuses** pour lesquelles nous sommes centre de **référence**. Ce site permet :

- L'accès à des **fiches d'informations synthétiques** téléchargeables sur nos différents domaines de compétence. Ces fiches comportent notamment les renseignements utiles pour la réalisation et l'envoi de prélèvements à l'unité à des fins diagnostiques ainsi que le ou les correspondants pour chaque thématique.
- L'accès au catalogue des souches détenues par le CNR
- Aux rapports d'activités du CNR

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2017 le CNR n'a pas été sollicité par le Ministère de la Santé, le HCSP, la HAS ou l'OMS.

En revanche le CNR a participé aux côtés de Santé Publique France à l'investigation des 2 épidémies de fièvre Q aiguë survenues dans les Deux Sèvres et l'Indre. Le CNR a également fourni comme chaque année le détail des cas de fièvres Q aiguës diagnostiquées au cours de l'année précédente à l'ECDC.

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

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

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1. Fièvre Q

En 2017, les chercheurs du CNR ont décrit un lien possible entre fièvre Q chronique et lymphome non hodgkinien et ont montré que la doxycycline avait une activité pro-apoptotique bénéfique chez les patients présentant un lymphome et traités pour fièvre Q chronique (1). Ils ont aussi montré l'intérêt de disposer de protocoles de prise en charge standardisés pour les maladies infectieuses, dont la fièvre Q (2). Une étude s'est intéressée aux réactions sérologiques croisées entre *Coxiella burnetii* et *Legionella pneumophila* au cours de la fièvre Q, à partir d'un cas de médiastinite (3). Dans une autre étude, Million *et al*. ont étudié l'incidence des anticorps anti-phospholipides au cours de la fièvre Q aiguë et leur rôle dans la survenue de thromboses (4). Ils ont suggéré que l'utilisation d'hydroxychloroquine (antagoniste des propriétés pathogènes des anticardiolipines) pourrait prévenir la survenue de thromboses au cours de la fièvre Q aiguë.

Une méthode rapide de dosage des taux sériques de doxycycline, minocycline et hydroxychloroquine par chromatographie liquide à très haute performance a également été mise au point (5). Cette méthode rapide, peu onéreuse et reproductible, est dorénavant utilisée en routine au CNR. Cette étude a été concomitante de la mise au point d'une méthode d'évaluation de la sensibilité des souches de *C. burnetii* à l'hydroxychloroquine par culture en fibroblastes HEL (6).

Un point a aussi été fait sur les différentes formes de fièvre Q. En particulier, le terme de fièvre Q chronique ne devrait plus être utilisé pour désigner les formes d'infection persistantes et focalisées à *C. burnetii* (7). De plus, il est important de distinguer la fatigue chronique qui peut succéder à une fièvre Q guérie des formes de fièvre Q persistante au cours desquelles l'asthénie est une conséquence d'une maladie toujours active (8). Les membres du CNR ont également publié une revue sur la fièvre Q (9).

Une autre étude a été réalisée chez les souris, qui a montré que les fécès des animaux atteints de fièvre Q représentaient un risque de contamination des animaux sains par aérosol (10). Dans un screening de tiques et échantillons de sang prélevés sur des moutons et chèvres en Algérie, l'équipe du CNR a détecté *C. burnetii* dans 5.5% des *Rhipicephalus bursa*, 5.8% des sangs de mouton et 1.7% des sangs de chèvre, montrant le risque important que représentent ces animaux et leurs arthropodes pour l'homme (11). Enfin, un screening de 600 poux de tête (*Pediculus humanus capitis*) prélevés sur 117 habitants de 2 villages ruraux au Mali a mis en évidence la présence de *C. burnetii* dans 5.1% des arthropodes testés (12).

6.1.2. *Rickettsia*

Au travers d'analyses génomiques, nous avons décrit le concept de réduction génomique associé à un accroissement de la virulence chez les *Rickettsia* (13). Ce concept a été confirmé par la comparaison des génomes des espèces *R. conorii* et *R. massiliae* qui causent la fièvre boutonneuse méditerranéenne, et *R. slovaca* et *R. raoultii* qui sont responsables du scalp eschar and neck lymphadenopathy (SENLAT) mais causent des formes sévères (*R. conorii* et *R. slovaca*) ou bénignes (*R. massiliae* et *R. raoultii*) (15). Les espèces causant des formes plus sévères ont les plus petits génomes et moins de plasmides que les autres (15).

Nous avons également décrit une nouvelle espèce de rickettsie isolée de tiques *Amblyomma triguttatum* sur l'ile Barrow en Australie (14). Cette espèce, nommée *R. gravesii* est suspectée d'avoir causé des cas d'infection humaine sur cette île (14).

Les chercheurs du CNR ont utilisé la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour identifier 1333 tiques collectées sur des animaux au Mali (16). Ces tiques ont pu être classées dans 6 espèces. Soixante-seize % des tiques se sont révélées positives pour les *Rickettsia* (16), dont *R. africae* dans 87.6%, *R. aeschlimannii* dans 11.4% et *R. mongolitimonae* dans 0.9% des tiques testées. Enfin, dans le screening de 600 poux de tête (*Pediculus humanus capitis*) prélevés sur 117 habitants de 2 villages ruraux au Mali, nous avons mis en évidence la présence de *R. aeschlimannii* dans 0.6% des arthropodes testés (12).

6.1.3. *Bartonella*

Une étude conduite par le CNR a consisté en l'étude de la viabilité de *B. henselae* dans les adénopathies de la maladie des griffes du chat (17). En effet, dans cette maladie très fréquente, le taux de culture de la bactérie à partir des biopsies ganglionnaires est très faible. Par reverse transcription-PCR, fluorescence in situ-hybidization et culture réalisées sur 87 biopsies ganglionnaires de maladie des griffes du chat, nous avons montré que la bactérie présente dans les ganglions n'est pas viable (17).

Nous avons également réalisé une étude des cas d'endocardite à hémocultures négatives au Maroc et avons détecté *B. quintana* chez un patient vivant dans des conditions précaires (18). Enfin, dans une étude réalisée dans quatre régions d'Algérie, côtières ou montagneuses, le CNR a pu détecter une nouvelle espèce de *Bartonella* proche de *B. bovis* dans 4/50 (8%) tiques molles *Argas persicus* prélevées dans un refuge pour animaux (19). L'équipe du CNR a également pu isoler *B. bovis* et une nouvelle espèce potentielle, « *B. davousti* », à partir du sang de 27 et 2 ruminants domestiques, respectivement, au Sénégal (20). Dans une autre étude, l'équipe du CNR a étudié sept espèces de triatomes, et détecté par PCR et séquençage une nouvelle espèce potentielle de *Bartonella*, *Candidatus* B. rondoniensis, dans 13 des 23 (56.5%) *Eratyrus mucronatus* testés (21). Cette espèce de triatome est un vecteur reconnu de la maladie de Chagas en Amérique centrale et du sud, et la présence de cette *Bartonella* chez ce vecteur peut faire craindre des cas d'infection humaine. Enfin, dans le screening de 600 poux de tête (*Pediculus humanus capitis*) prélevés sur 117 habitants de 2 villages ruraux au Mali, nous avons mis en évidence la présence de *B. quintana* dans 0.5% des arthropodes testés, montrant le rôle potentiel que peut jour le pou de tête dans l'épidémiologie de cette bactérie (12).

6.2 – Liste des publications et communications de l'année 2017, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Fièvre Q

1: Melenotte C, Raoult D. Pro-apoptotic effect of doxycycline and hydroxychloroquine on B-cell lymphoma induced by C. burnetii. Oncotarget. 2017;9:2726-2727. doi: 10.18632/oncotarget.23397.

2: Lagier JC, Aubry C, Delord M, Michelet P, Tissot-Dupont H, Million M, Brouqui P, Raoult D, Parola P. From Expert Protocols to Standardized Management of Infectious Diseases. Clin Infect Dis. 2017;65(suppl_1):S12-S19. doi:10.1093/cid/cix403.

3: Edouard S, Million M, Casalta JP, Collart F, Amphoux B, Raoult D. Low antibodies titer and serological cross-reaction between *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* challenge the diagnosis of mediastinitis, an emerging Q fever clinical entity. Infection. 2017;45:911-915. doi: 10.1007/s15010-017-1048-6.

4: Million M, Bardin N, Bessis S, Nouiakh N, Douliery C, Edouard S, Angelakis E, Bosseray A, Epaulard O, Branger S, Chaudier B, Blanc-Laserre K, Ferreira-Maldent N, Demonchy E, Roblot F, Reynes J, Djossou F, Protopopescu C, Carrieri P, Camoin-Jau L, Mege JL, Raoult D. Thrombosis and antiphospholipid antibody syndrome during acute Q fever: A cross-sectional study. Medicine (Baltimore). 2017;96:e7578. doi: 10.1097/MD.0000000000007578.

5: Armstrong N, Richez M, Raoult D, Chabriere E. Simultaneous UHPLC-UV analysis of hydroxychloroquine, minocycline and doxycycline from serum samples for the therapeutic drug monitoring of Q fever and Whipple's disease. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2017;1060:166-172. doi:10.1016/j.jchromb.2017.06.011.

6: Angelakis E, Khalil JB, Le Bideau M, Perreal C, La Scola B, Raoult D. Hydroxychloroquine susceptibility determination of *Coxiella burnetii* in human embryonic lung (HEL) fibroblast cells. Int J Antimicrob Agents. 2017;50:106-109. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.02.015.

7: Million M, Raoult D. No Such Thing as Chronic Q Fever. Emerg Infect Dis. 2017;23:856-857. doi: 10.3201/eid2305.151159.

8: Raoult D. Q Fever: Confusion Between Chronic Infection and Chronic Fatigue. Clin Infect Dis. 2017;65:1054-1055. doi: 10.1093/cid/cix469.

9: Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D. From Q Fever to Coxiella burnetii Infection: a Paradigm Change. Clin Microbiol Rev. 2017;30:115-190.

10: Bechah Y, Raoult D. Transmission of *Coxiella burnetii* to cage mates using murine animal model. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017 Feb;50:29-33. doi: 10.1016/j.cimid.2016.11.009.

11: Aouadi A, Leulmi H, Boucheikhchoukh M, Benakhla A, Raoult D, Parola P. Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (*Theileria ovis* and *Babesia ovis*) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017;50:34-39. doi: 10.1016/j.cimid.2016.11.008.

12: Amanzougaghene N, Fenollar F, Sangaré AK, Sissoko MS, Doumbo OK, Raoult D, Mediannikov O. Detection of bacterial pathogens including potential new species in human head lice from Mali. PLoS One. 2017;12:e0184621. doi:10.1371/journal.pone.0184621.

6.2.2. Rickettsies

13: Diop A, Raoult D, Fournier PE. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. Microbes Infect. 2017. pii: S1286-4579(17)30216-2. doi: 10.1016/j.micinf.2017.11.009.
PubMed PMID: 29287988.

14: Abdad MY, Abdallah RA, El Karkouri K, Beye M, Stenos J, Owen H, Unsworth N, Robertson I, Blacksell SD, Nguyen TT, Nappez C, Raoult D, Fenwick S, Fournier PE. *Rickettsia gravesii* sp. nov.: a novel spotted fever group rickettsia in Western Australian Amblyomma triguttatum triguttatum ticks. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67:3156-3161. doi: 10.1099/ijsem.0.001865.

15: El Karkouri K, Kowalczewska M, Armstrong N, Azza S, Fournier PE, Raoult D. Multi-omics Analysis Sheds Light on the Evolution and the Intracellular Lifestyle Strategies of Spotted Fever Group Rickettsia spp. Front Microbiol. 2017;8:1363. doi: 10.3389/fmicb.2017.01363.

16: Diarra AZ, Almeras L, Laroche M, Berenger JM, Koné AK, Bocoum Z, Dabo A, Doumbo O, Raoult D, Parola P. Molecular and MALDI-TOF identification of ticks and tick-associated bacteria in Mali. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005762. doi: 10.1371/journal.pntd.0005762.

6.2.3. *Bartonella*

17: Prudent E, Lepidi H, Audoly G, La Scola B, Fournier PE, Edouard S, Angelakis E, Raoult D. *Bartonella henselae* is usually not viable in lymph nodes of patients with cat scratch disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36:2207-2213. doi: 10.1007/s10096-017-3047-z.
18: Boudebouch N, Sarih M, Chakib A, Fadili S, Boumzebra D, Zouizra Z, Mahadji BA, Amarouch H, Raoult D, Fournier PE. Blood Culture-Negative Endocarditis, Morocco. Emerg Infect Dis. 2017;23:1908-1909. doi: 10.3201/eid2311.161066.

19: Lafri I, El Hamzaoui B, Bitam I, Leulmi H, Lalout R, Mediannikov O, Chergui M, Karakellah M, Raoult D, Parola P. Detection of relapsing fever *Borrelia* spp., *Bartonella* spp. and *Anaplasmataceae* bacteria in argasid ticks in Algeria. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0006064. doi: 10.1371/journal.pntd.0006064.

20: Dahmani M, Sambou M, Scandola P, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. *Bartonella bovis* and *Candidatus* Bartonella davousti in cattle from Senegal. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017;50:63-69. doi:10.1016/j.cimid.2016.11.010.

21: Laroche M, Berenger JM, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. Detection of a Potential New *Bartonella* Species "*Candidatus* Bartonella rondoniensis" in Human Biting Kissing Bugs (*Reduviidae*; *Triatominae*). PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005297. doi: 10.1371/journal.pntd.0005297.

Communications

22: Fournier PE. European Society for Coxiellosis, Chlamydioses, Anaplasmoses and Rickettsioses - American Society for Rickettsiology joint meeting 2017. New Microbes New Infect. 2018 Feb 13;23:6. doi: 10.1016/j.nmni.2018.02.001.

23: Fournier PE. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated to increased virulence. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, Oral conference.

24: Raoult D. The *Rickettsia felis* paradigm. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, Oral conference.

25: El Karkouri K, Fournier PE. Comparative genomics and proteomics of four spotted fever group *Rickettsia* species. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, poster.

26: Abou Abdallah R, Fournier PE. Genomic analysis has a key role in the study of intracellular bacteria. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, poster.

27: Edouard S. Cardiovascular *Coxiella burnetii* infections in patients presenting with low antibody levels. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, poster.

28: Bechah Y, Raoult D. *liposcelis bostrychophila* as a potential source of contamination with *Rickettsia felis* : a murine animal model. ESCCAR-ASR joint meeting 2017. June 19th-21st, 2017. Marseille, France, poster.

29: Fournier PE. Genomics of *Rickettsia* species. 9th Tick and tick-borne pathogen conference & 1st Asia Pacific *Rickettsia* conference. August 27-September 2nd, 2017. Cairns, Australia. Invited oral conference.

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

Le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est partenaire du laboratoire d'études et de recherches sur la pathologie des petits ruminants et des abeilles, dépendant de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Ce laboratoire, situé à Sophia-Antipolis, est laboratoire national de référence (LNR) pour la fièvre Q en santé animale depuis décembre 2009. A ce titre et dans le cadre d'un groupe de travail avec la direction générale de l'alimentation (DGAL), il participe à la mise en place un réseau pilote des laboratoires départementaux d'analyse chargés du diagnostic de cette pathologie.

Il fournit un appui scientifique et technique aux services vétérinaires de l'Etat : analyse de prélèvements en seconde intention, contrôle de vaccins, fourniture de réactifs de référence, suivi de la qualité des analyses des laboratoires de terrain (au travers d'essais inter-laboratoires notamment), expertise d'outils de diagnostic du commerce et mène des recherches portant sur l'harmonisation des outils pour le diagnostic et l'épidémiologie. Il s'est investi dans plusieurs études sur la vaccination en tant qu'outil de la gestion en élevage.

Le CNR et le LNR ont débuté en 2016 une collaboration scientifique sur l'étude génomique comparée des souches humaines et animales de *Coxiella burnetii*, matérialisée par l'embauche d'un étudiant post-doctorant commun. En 2017, le CNR et le LNR ont analysé le pangénome de *Coxiella burnetii* en comparant les séquences de 79 génomes. Les résultats de cette étude font actuellement l'objet d'un article qui sera soumis pour publication en 2018.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

8.1. Démarche qualité

L'accréditation des activités de diagnostic moléculaire du CNR est programmée pour octobre 2017.

8.2. Activité de recherche en 2018 et 2019

Le CNR poursuivra sa collaboration scientifique avec le LNR de la fièvre Q sur l'analyse pangénomique de *Coxiella burnetii* en mettant l'accent sur la comparaison entre souches humaines et souches animales.

Le CNR lancera aussi des analyses pangénomiques des bactéries des genres *Rickettsia* et *Bartonella*.

Une étude de séroprévalence de la fièvre Q dans la région de Niort sera réalisée en collaboration avec l'EFS (Dr Pierre Gallian) et l'INRA (Dr Elsa Jourdain).

8.3. Activité d'expertise

La comparaison des kits sérologiques commercialisés pour le diagnostic de la fièvre Q sera réalisée en 2018.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

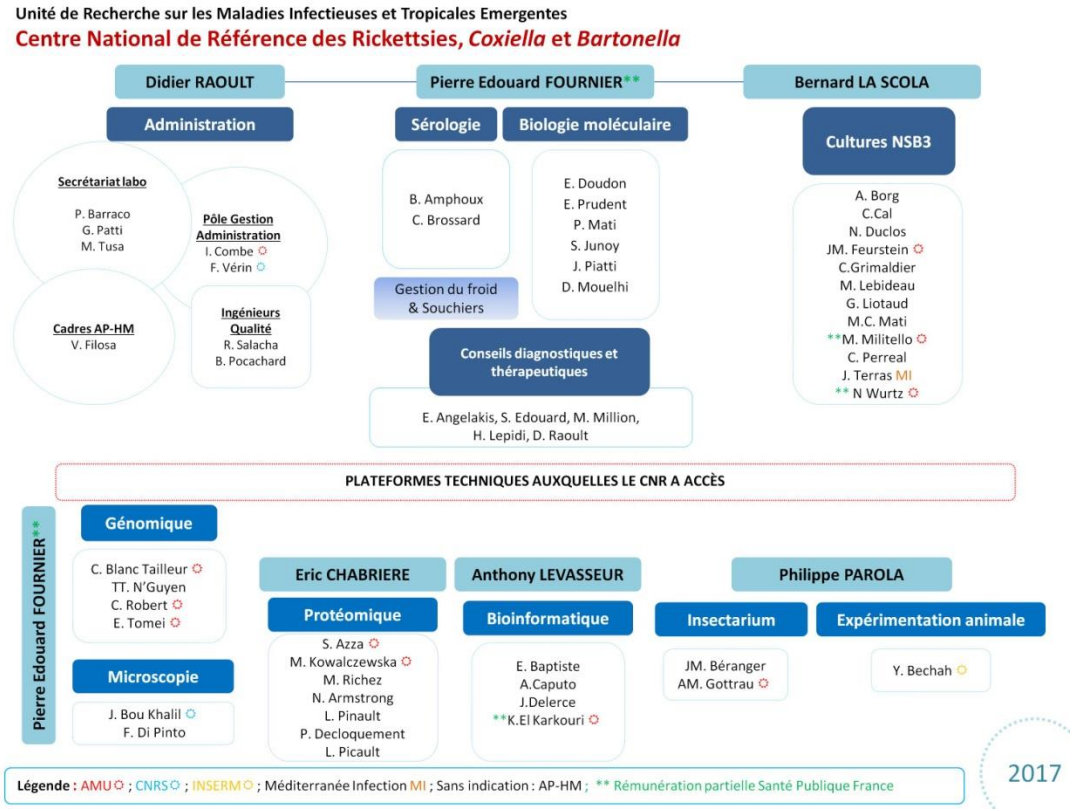
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* (CNR), créé en 1985, a vu son agrément renouvelé par le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé pour la période du 1er janvier 2017 au 31 décembre 2021 (JORF n°0058 du 09-03-2017, texte n°20). Le CNR reçoit plus de **20 000** prélèvements (sérum, sang, biopsies diverses et arthropodes) par an de plus de **300 laboratoires** publics et privés de France et de nombreux pays étrangers afin d'effectuer le diagnostic d'infections à bactéries intra-cellulaires de culture difficile. Le CNR diagnostique les infections causées par les différentes espèces de rickettsies, *Coxiella burnetii* et *Bartonella.*

Les missions du CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* incluent :

- Le diagnostic sérologique, par culture et moléculaire des infections causées par les bactéries des genres *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Anaplasma* et *Ehrlichia*
- L'expertise concernant la microbiologie et la pathogénie des bactéries des genres *Rickettsia, Coxiella* et *Bartonella*
- La contribution à la surveillance épidémiologique des maladies causées par ces bactéries
- L'alerte par l'information immédiate de Santé Publique France et du ministère de la Santé de toute constatation pouvant avoir des répercussions sur l'état sanitaire de la population
- Le conseil des pouvoirs publics, des agences de sécurité sanitaire et des professionnels de santé

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés



L'équipe impliquée dans les activités du CNR

Enseignants chercheurs et chercheurs

Nom	Prénom	Tutelle	Fonction	Corps-grade
ANGELAKIS	Emmanouil	AMU	Enseignant-Chercheur	MCU-PH
EDOUARD	Sophie	AMU	Enseignant-Chercheur	MCU-PH
FOURNIER	Pierre-Edouard	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH
LA SCOLA	Bernard	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH
LEPIDI	Hubert	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH
LEVASSEUR	Anthony	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH
MILLION	Matthieu	AMU	Enseignant-Chercheur	MCU-PH
PAROLA	Philippe	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH
RAOULT	Didier	AMU	Enseignant-Chercheur	PU-PH

Ingénieurs et équipe technique

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
AMPHOUX	Bernard	CHU MARSEILLE - APHM	Technicien Sérologie
AUBERT ROBERT	Catherine	AMU	Ingénieur Recherche plateforme génomique
BECHAH	Yassina	INSERM	Ingénieur Recherche en expérimentation animale
BERENGER	Jean-Michel	CHU MARSEILLE - APHM	Technicien animalerie - insectarium
BORG	Audrey	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
BROSSARD	Catherine	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne Sérologie
CAL	Céline	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
DOUDON	Emilie	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne Biologie moléculaire
DUCLOS	Nathalie	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
EL KARKOURI	Khalid	AMU	Ingénieur Recherche en Bioinformatique
FEUERSTEIN	Jean-Marc	AMU	Technicien fonctionnement NSB3
GRIMALDIER	Clio	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
JUNOY	Stéphanie	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne Biologie moléculaire
LE BIDEAU	Marion	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
LIAUTAUD	Gilles	CHU MARSEILLE - APHM	Technicien cultures cellulaires NSB3
MATI	Marie-Charlotte	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
MATI	Pauline	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne Biologie moléculaire
MILITELLO	Muriel	AMU	Ingénieur Etude en Techniques Biologiques NSB2/NSB3
MOUELHI	Dounia	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne en biologie moléculaire
PERREAL	Céline	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne cultures cellulaires NSB3
PIATTI	Julie	CHU MARSEILLE - APHM	Technicienne en biologie moléculaire
POCACHARD	Bérangère	CHU MARSEILLE - APHM	Ingénieur Qualité
PRUDENT	Elsa	CHU MARSEILLE - APHM	Ingénieur
SALACHA	Richard	CHU MARSEILLE - APHM	Ingénieur Qualité
TERRAS	Jerome	Fondation MI	Ingénieur Bioinformaticien
WURTZ	Nathalie	AMU	Responsable laboratoire NSB3

AMU : Aix-Marseille Université
Fondation MI : Fondation Méditerranée Infection

Equipe administrative

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
BARRACO	Priscilla	CHU MARSEILLE - APHM	Secrétaire
COMBE	Isabelle	AMU	Cadre administrative recherche
FILOSA	Véronique	CHU MARSEILLE - APHM	Cadre laboratoires
PATTI	Gwendoline	CHU MARSEILLE - APHM	Secrétaire
TUSA	Marie	CHU MARSEILLE - APHM	Secrétaire
VERIN	Francine	CNRS	Cadre gestionnaire recherche

Pierre-Edouard FOURNIER, Bernard LA SCOLA, et Didier RAOULT possèdent une autorisation d'expérimentation animale permettant de conduire des recherches dans les deux animaleries A3 du laboratoire Les activités de sérologie du CNR font l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Le Pr. PE. Fournier possède une habilitation pour la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous la référence ADE-021722012-9).

1.3 Locaux et équipements

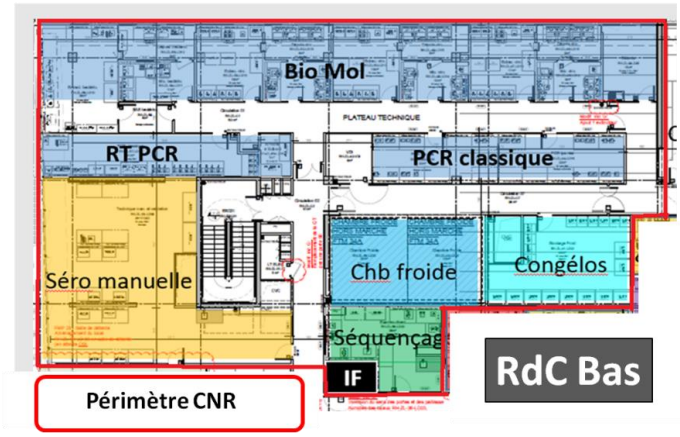
En janvier 2017, le CNR des Rickettsies, Coxiella et Bartonella a déménagé dans les locaux neufs de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée-Infection. Cet institut dédié à la prise en charge et à l'étude des maladies infectieuses comporte :

- Trois unités d'hospitalisation de maladies infectieuses (75 lits, dont 25 lits en niveau de sécurité biologique 3).
- Le laboratoire de diagnostic microbiologique (bactériologie, virologie, parasitologie) du CHU de Marseille.
- Trois unités de recherche (Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095 ; Emergence des Pathologies Virales, IRD 190, et Sciences Economiques et Sociales de la Santé et Traitement de l'Information Médicale, Inserm S912).
- Des plateformes de culturomique, génomique, microscopie électronique, protéomique, un insectarium, une biobanque et un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 de 1000 m^2 divisé en 4 modules de 250 m^2.
- Le CNR des arbovirus et le CNR des Rickettsies, Coxiella et Bartonella.

Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR sont réalisées dans le laboratoire de diagnostic microbiologique de l'IHU Méditerranée-Infection (rez-de-chaussée haut), les activités de culture dans le module 2 du laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3, troisième étage).

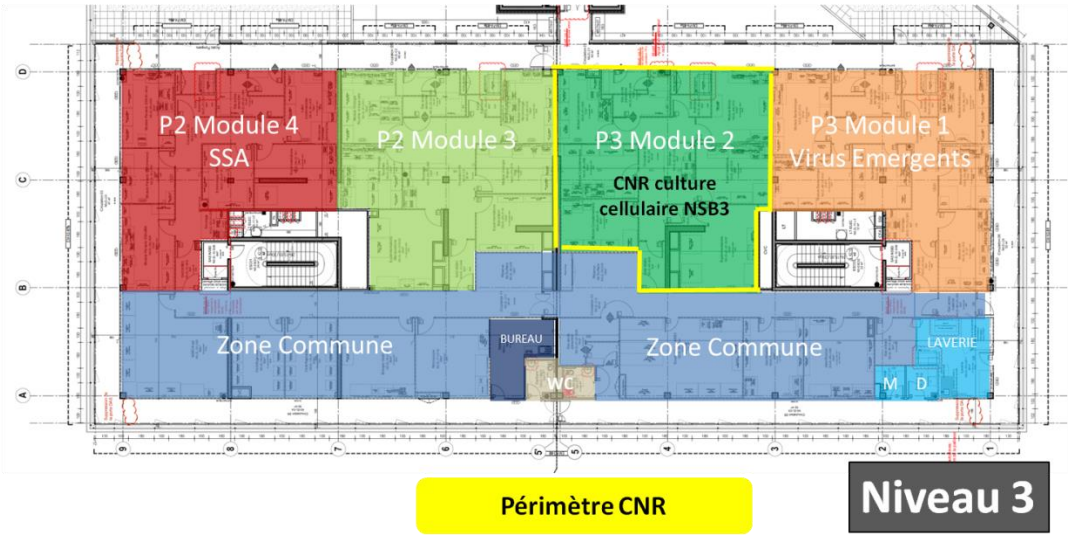
1.3.1. Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR

Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR sont réalisées dans le laboratoire de diagnostic microbiologique de l'IHU Méditerranée-Infection (rez-de-chaussée haut).



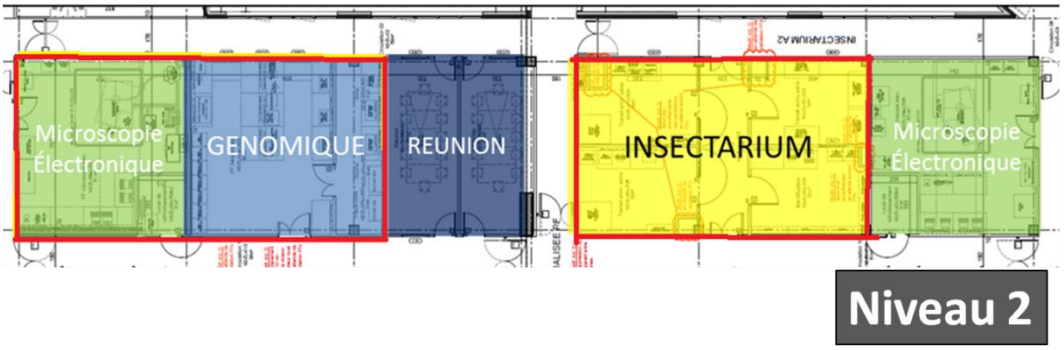
1.3.2. Les activités de culture du CNR

Les activités de culture du CNR sont réalisées dans le module 2 du laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3, troisième étage).



1.3.3. Les Plateformes

Les membres du CNR ont accès aux plateformes de microscopie électronique, génomique, et à l'insectarium de l'IHU (deuxième étage).



1.3.4. Les principaux équipements

1. Sérologie

- 1 étuve ThermoScientific (Aerus)
- 1 congélateur antigènes -80°C
- 20 congélateurs sérums -80°C
- 1 réfrigérateur
- 3 ordinateurs
- 1 imprimante en réseau
- 2 microscopres à fluorescence (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)

2. Biologie moléculaire – séquençage génomique

- 1 pyroséquenceur GS Junior
- 1 pyroséquenceur Ion Torrent (Applied Biosystems)
- 4 pyroséquenceurs MiSeq (Illumina)

- 2 séquenceurs 3130 (Applied Biosystem)
- 1 SmartCycler
- 10 Thermocyclers conventionnels (Applied biosystems, Eppendorf, Biometra)
- 5 thermocycleurs en temps réel CFX 96 (BioRad)
- 5 extracteurs d'ADN EZ-One (QIAGEN)
- 5 broyeur Fastprep
- 1 bain sec
- 1 Hydroshear (GeneMachines)
- 7 hottes BIOCAP DNA (Bioblock)
- 1 appareil à électroporation (Biorad)
- 1 Chambre UV + Camera CCD Quantum (Appligene)
- 6 cuves de migration / gels PCR (Eurogentec)
- 5 thermocycleurs (Applied Biosystem)
- 1 table UV + Imager (Appligene)
- 1 appareil pour électrophorèse à champ pulsé (Biorad)
- 1 appareil à électroporation (Biorad)
- cuve «vacuum blotter » (Biorad)
- 1 four à hybridation (Appligene)
- 1 hotte chimique (Kötterman)
- 1 Bioanalyser (Agilent)
- 1 extracteur Fast Prep (Savant)
- 1 speed vac (Savant)
- 1 centrifugeuse Beckman à plaque (Allegra X- 15R)
- 1 coulter Beckman Z2
- Lyophylisateur Cosmos 2 (Cryotec)

3. Biologie cellulaire

- 1 thermoshake (Ed Bühler)
- 1 ultra-centrifugeuse de paillasse (Beckman)
- 1 hotte à flux laminaire
- spectrofluorimètre pour plaques (Bio-Teck)
- 1 thermoshake (Gerhardt)
- 2 spectrophotomètres (Beckman, Shimadzu)
- broyeur de cellules (Bioblock)
- bombe à cavitation
- UV crosslinker (Bioblock)
- incubateurs à CO_2
- étuves sèches
- four Pasteur
- 4 hottes à flux laminaire
- 1 sorbonne (Kotterman)
- 1 compteur à scintillation (Packard)
- récupérateur de cellules (Wesbart)
- détecteur de radioéléments

4. Microscope pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules

- Microscopes inversés
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)

5. Culture en laboratoire NSB3 du CNR

- 1 PSM (Holten LaminAir)
- 1 PSM HeraSafe (Heraeus)
- 1 bain-marie (Firlabo)
- 1 centrifugeuse (Heraeus)
- 1 microscope inversé (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)
- 1 Cytospin 4 (Thermo Scientific)
- 3 incubateurs secs
- 2 incubateurs à Co2 HeraCell 240 (Heraeus)
- 1 poste informatique
- 1 réfrigérateur – congélateur à -20°C
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)
- Spectrometre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics)
- 1 PSM (Holten LaminAir)
- 1 PSM HeraSafe (Heraeus)
- 1 bain-marie (Firlabo)
- 1 centrifugeuse (Heraeus)
- 1 microscope inversé (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)
- 1 Cytospin 4 (Thermo Scientific)
- 3 incubateurs secs
- 2 incubateurs à Co2 HeraCell 240 (Heraeus)
- 1 poste informatique
- 1 réfrigérateur – congélateur à -20°C
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)

7. Equipement informatique propre au laboratoire

Les 240 ordinateurs du laboratoire sont équipés d'une connexion au réseau de l'Université avec accès libre à Internet. Il y a 20 imprimantes laser réseaux réparties sur tout le laboratoire.

Les 2 séquenceurs ainsi que le Lightcycler disposent chacun d'un ordinateur et d'une imprimante jet d'encre couleur, les 5 CFX sont chacun équipés d'un ordinateur.

Les BioInformaticiens disposent de 8 stations de travail très haute performance (multicoeur, 12 Go de Ram minimum).

1 serveur de sauvegarde est à disposition sur le réseau, d'une capacité de 15 To, chaque utilisateur peut avoir un compte réservé.

A disposition également, 1 serveur de calcul partagé de 196 cœurs et 1 To de mémoire associé à 64 To de disque pour les calculs importants du laboratoire.

Plateformes techniques de l'IHU auxquelles le CNR a accès

A. Animalerie, expérimentation animale et production d'anticorps

(Responsable : Philippe Parola, PU-PH)

Depuis l'année 2011 le développement de la plateforme « Animalerie » a permis le développement des élevages d'arthropodes (tiques poux, puces, moustiques, punaises et triatomes) et des programmes de recherche sur les interactions "arthropodes – microorganismes". Elle a recruté un technicien entomologiste (Jean-Michel Bérenger, TCH AP-HM), et une aide laboratoire (Anne-Marie Gottrau, ADT AMU).

Les élevages de tiques et de poux sont effectués sur lapins.
Les élevages de moustiques sont effectués sur souris mais aussi sur membranes artificielles.
Les élevages de puces, punaises, et triatomes sur membranes.
Les élevages de tiques, poux et puces infectés par des rickettsies s'effectuent en conditions de sécurité microbiologique de niveau 3 (NSB3).

B. Plateforme microscopie pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules, cytométrie

(Responsable : Jacques Bou Khalil, IR CNRS)

Cette plateforme comprend trois parties: A) Les systèmes d'acquisition d'images, comptages, et microdissection. B) Les outils d'analyse et reconstruction d'images en 3D. C) Les bases de données des images produites dans notre laboratoire.
Le matériel de cette plateforme est listé ci-dessous :

4. Microscope pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules

- Microscopes inversés
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)

C. Plateforme Génomique

(Responsable : Pierre-Edouard Fournier, PU-PH)

La plateforme est spécialisée dans le séquençage génomique des génomes bactéries intra-cellulaires et de virus. Cette activité en fait le premier centre de séquençage des microorganismes d'intérêt médical en France en termes de volume et d'impact des publications scientifiques, et la huitième plateforme au niveau mondial dans le domaine de la production et de la valorisation des génomes microbiens. En 2016, 206 génomes bactériens ont été séquencés par le laboratoire. Parmi ceux-ci, 6 concernent plus particulièrement les thématiques du laboratoire : Bartonella henselae MVT01, Bartonella henselae MVT02, Bartonella henselae MVT03, Bartonella tribocorum MVT04 Bartonella doshiae MVT05 et Bartonella schoenbuchensis MVT07.

D. Plateforme Bioinformatique

(Responsable : Anthony Levasseur, PU)

Depuis juin 2006, le CNR a constitué une plateforme de bioinformatique, composée de 5 bioinformaticiens ingénieurs de recherche et d'étude. Les activités de ce groupe s'inscrivent autour de 4 axes dont les champs d'applications concernent la structure, l'évolution, la diversité, la pathogénicité et le diagnostic de micro-organismes :

A- Bioanalyse des génomes, métagénomes et diversité : les bioinformaticiens réalisent l'assemblage, l'annotation et l'analyse de données de génomique, métagénomique et diversité (16S) de bactéries et virus (voir publications). Les données sont issues de la plateforme de séquençage de l'unité dotée de pyroséquenceurs Roche GS-FLX+, Illumina Mi-Seq et Ion Torrent.

B- Développement et administration d'outils et de matériel : les bioinformaticiens développent des scripts de structuration et de traitement de données. Ils administrent les clusters et serveurs de calcul et de stockage de données et les banques et données biologiques (NR, COG, RDP-II, RickBase, MST, …).

C- Services, communication et valorisation : les bioinformaticiens contribuent également à l'accompagnement et à la formation des masters, doctorants et postdoctorants. Ils réalisent la veille technologique, la présentation de résultats aux équipes de l'Unité dans une réunion hebdomadaire de génomique et la valorisation de ces résultats par la participation aux publications (voir publications).

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve depuis de nombreuses années les souches bactériennes d'espèces de culture fastidieuse, en particulier intra-cellulaires strictes ou facultatives : Rickettsia sp., Bartonella sp., C. burnetii.
A ce jour, plus de 1500 souches bactériennes sont conservées. L'importance de cette collection, la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies: (CSUR, WDCM 875, http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=14&titre=collection-de-souches), est d'autant plus grande que la majorité de ces souches est unique. Cette collection conserve actuellement 663 souches de *Bartonella*, 217 souches de *Rickettsia* et 312 souches de *Coxiella burnetii*, constituant les plus grandes collections mondiales de souches de bactéries de ces trois genres bactériens. Témoins de son implication dans la conservation et l'étude des bactéries de culture difficile, la majorité des nouvelles espèces de Rickettsia décrites officiellement depuis 2001 (*R. heilongjiangensis*, *R. asiatica*, *R. tamurae*, *R. raoultii*, *R. gravesii*) ont été décrites par le CNR. La pérennisation de cette collection est donc particulièrement cruciale.

Conservation sécurisée des souches bactériennes

A- Situation actuelle

La conservation des souches bactériennes est actuellement essentiellement réalisée en congélateurs à -80°C et azote liquide. La gestion des stocks est réalisée manuellement, avec étiquetage des tubes et saisie de l'état des stocks en fichier Excel.

B- Objectifs

L'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection va se doter en 2018 d'une biobanque automatisée permettant de stocker 1 million d'échantillons et souches à -80°C et 2 millions à -20°C. Les souches seront également conservées en azote gazeux à -196°C et sous forme lyophylisée à -20°C. Chaque appareil de congélation sera équipé d'un système d'alarme visuelle et sonore qui enverra en cas de problème un message d'alarme aux agents de sécurité de l'IHU. De plus, les tubes dans lesquels seront conservées les souches seront anonymisés et identifiés par des codes-barres uniques reconnus par un lecteur automatisé. L'avantage d'un tel système est, outre l'anonymisation des tubes qui renforce la sécurité, de permettre une traçabilité accrue de chaque tube et d'assurer une gestion optimisée des stocks. Une pièce de 200 m² sécurisée par cartes d'accès sera dédiée à la biobanque robotisée au sein de l'IHU.

C. Souchier de microorganismes fastidieux

L'Unité des Rickettsies, par sa spécificité de Centre National de Référence pour l'étude des rickettsies, a acquis une expérience unique dans la culture des bactéries de culture difficile, qu'elles soient intra- ou extra-cellulaires. La collection unique de souches bactériennes constituée par l'Unité des Rickettsies est riche de plus de mille souches de bactéries intra-cellulaires. Un technicien, Mr Jérôme Terras, est directement responsable de l'entretien du souchier, sous la responsabilité du Pr Fournier. Les moyens auxquels le laboratoire a accès pour cultiver les souches bactériennes sont les deux laboratoires de niveau de sécurité biologique 3. Le Pr Fournier est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous la référence ADE-021722012-9).

C.1. Protocoles de conservation

Les souches cultivées en laboratoire NSB3 sont conservées selon trois mode de conservation : congélateurs à -80°C, azote liquide et lyophilisation dans des locaux sécurisés (froid et accès). Ces souches sont organisées au sein de la Collection de souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR). Ces souches sont référencées dans un ordinateur lui aussi sécurisé dans lequel sont entrés aussi les références de typage de ces souches quand elles existent.

C.1.2. La collection CSUR

Le Centre National de Référence des Rickettsioses a décrit 12 des 30 espèces validées de *Rickettsia*. La description de nouvelles espèces de *Rickettsia* obéit aux nouvelles règles développées par le Comité International de Systématique des Procaryotes pour l'ensemble des bactéries, dont la mise à disposition des souches-type pour les scientifiques qui souhaitent les étudier. Les souches du CNR sont déposées dans la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR, WDCM 875) dont le curateur est le Pr Fournier (http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=14&titre=collection-de-souches).

La CSUR est l'une des rares collections dans le monde avec l'American Type Culture Collection qui accepte les bactéries intracellulaires strictes. Actuellement, **217 souches de *Rickettsia*, 312 souches de *Coxiella burnetii* et 663 souches de *Bartonella*** sont déposées dans la CSUR (Tableau 2), faisant de cette collection **la plus grande collection mondiale de bactéries intracellulaires strictes ou facultatives**. En effet, le total des souches de *Bartonella* et *Rickettsia* des collections ATCC, CIP, CCUG et DSMZ cumulées n'atteint pas 100 souches. Conformément à la législation sur la circulation des souches bactériennes, la CSUR ne distribue pas les souches de *Coxiella burnetii, Rickettsia prowazekii*, et *Rickettsia rickettsii*. La liste exhaustive des souches de *Rickettsia*, *Bartonella* et *Coxiella* disponibles à la CSUR est disponible online (http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=349&titre=centre-national-de-reference-des-rickettsia-coxiella-et-bartonella). Les souches peuvent être déposées ou demandées à la CSUR à l'aide du formulaire ci-dessous.

Tableau 2. Nombre de souches par espèce dans la collection de souches

Genres	Espèces	Nombre de souches
Bartonella.	*alsatica*	1
	australis	10
	bacilliformis	1
	birtlesii	5
	bovis	34
	capreoli	1
	chomelii	1
	clarridgeiae	27
	coopersplainensis	1
	doshiae	1
	elizabethae	1
	florenciae	2
	grahamii	1
	henselae	91
	koehlerae	2
	massiliensis	2
	phoceensis	1
	queenslandensis	5
	quintana	431
	rattaustraliani	5
	rattimassiliensis	9
	senegalensis	3
	schoenbuchensis	17
	taylorii	1
	tribocorum	23
	vinsonii	3
	weissi	4
Coxiella	*burnetii*	312
Rickettsia	*aeschlimannii*	7
	africae	34
	akari	1
	amblyommatis	1
	argasii	1
	asiatica	5
	australis	1
	bellii	1
	canadensis	1
	conorii	85
	felis	3
	gravesii	1
	heilongjiangensis	2
	helvetica	4
	honei	2
	japonica	3
	massiliae	7
	montanensis	1
	parkeri	2
	raoultii	8
	rhipicephali	1
	sibirica	15
	slovaca	21
	sp.	2
	tamurae	1
	typhi	1
Orientia	*tsutsugamushi*	4

CSUR
Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies
WDCM 875
Professeur Didier RAOULT
Directeur
Unité des Rickettsies
WHO Collaborative Center
Diagnosis and Study of Tick-Borne Diseases

STRAIN ORDER FORM

CSUR Account Number: *
Organization: *
First Name: *
Last Name: *
Phone: * (example: 33 (0)491 385517)
Fax:
E-mail: *
Street: *
City: *
Post Code: * (required)
Country: Countries

	CSUR ref	Product Description	Unit Price in EUR	Quantity	Price in EUR
ex	R1	Rickettsia tamurae strain AT-1	750.00	1	750.00
1			750.00	1	
2			750.00	1	
				Total:	

Please fax (33 (0)491 38 77 72) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

Faculté de Médecine - 27, bvd Jean MOULIN - 13385 MARSEILLE Cedex 5 -FRANCE
Tél :33 (0)491 32 43 75, Telefax : 33 (0)491 38 77 72, e-mail: Didier.Raoult @ medecine.univ-mrs.fr

CSUR
Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies
WDCM 875
Professeur Didier RAOULT
Directeur
Unité des Rickettsies
WHO Collaborative Center
Diagnosis and Study of Tick-Borne Diseases

STRAIN DEPOSIT FORM
To be completed by the strain's contributor or contributor's authorized representative. Please print or type.

*Agent:*_____ *Strain:*_____
Taxonomic classification :_____

1. Background information
   a. This strain was isolated by:_____
   b. From (host):_____ Organ:_____
   Tissue:_____ Fluid:_____
   Was this strain obtained from human subjects? ☐ Yes ☐ No
   c. Clinical disease or symptoms exhibited by host: _____
   d. Reference. *Please enclose a copy of relevant references.*
   e. Officially recognized as reference strain by (committee):_____
   f. List any special handling requirements:_____
   g. Recommended storage conditions (temp, etc.):_____
   h. Recommended method for rapid identification (*i.e.*, antibody and source):_____
   i. Host range:_____ Incubation:_____
   Circle host of choice for *in vitro* propagation *days/temp*
   j. Effect (type of CPE, etc.):_____
   k. Special characteristics (physical properties, stability, cross reactions, hemolysin production, presence or absence of mycoplasma, sequence information, etc.):_____
   l. If you did not isolate this strain, indicate from whom you received it: _____

   2. Reason for deposit (new taxon, attenuated strain, utility as a vector, etc.):_____

   3. Properties of material
   a. Propagated in (host cells, animal or tissue): _____
   b. Medium used, etc.:_____
   c. Titer (list as units/volume, *i.e.*, PFU/ml):_____ Titer date:_____
   d. Titer conditions (host system, route of inoculum, days to final reading):_____
   e. Final preparation (proportion of suspending medium, cryoprotectants, antibiotics, etc.):_____
   f. Passage level (full passage history of material deposited):_____

4. Safety information
a. Is the strain hazardous for humans?_____Animals?_____Plants?_____
If yes, what is the recommended Biosafety level for working with this culture? (refer online to www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4toc.htm):_____
b. Does this agent require any special permits? ☐ Yes ☐ No If yes, please specify?_____
c. List any routine vaccinations or surveillance provided to investigators handling this agent:_____

5. Legal status of deposit: check either **a** of **b** to determine the conditions under which the culture is deposited at CSUR (**either a or b MUST BE CHECKED**):
a) ☐ *This is a bailment deposit. The contributor designated below understands that this material is for deposit in the* CSUR *general collection. It will be examined, and if accepted by the* CSUR*, batches will be made and distributed to the scientific community for a fee to cover expenses.*
b) ☐ *This is a deed-of gift deposit. The contributor designated below hereby gives* CSUR *ownership of the transferred quantity of material, with the authority to reproduce, use, give, sell, or otherwise transfer the material to third parties who also may reproduce, use, and further transfer the material, as permitted by* CSUR.
Gift on behalf of the following donor:_____

6. CSUR may, in accordance with its then current procedures and resources, authenticate (if appropriate) and preserve the material.

7. This form states the entire agreement between the parties regarding the material. The undersigned are authorized to execute this agreement.

Contributor	*Duly Authorized for Contributor's Institution (if required by Contributor's Institution)*
_____ Signature Date	_____ Signature Date
_____ Printed Name and Title	_____ Printed Name and Title
_____ Institution	_____ Institution
_____ Mailing Address	_____ Mailing Address
_____	_____
_____ Telephone	_____ Telephone
_____ Fax	_____ Fax
_____ Email	_____ Email

Please fax (33 (0)491 38 77 72) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

Démarche qualité du laboratoire

Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture et sérologie du laboratoire. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Un GBEA a été rédigé pour les activités de détection moléculaire qui feront l'objet d'une accréditation en octobre 2018.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

A. La sérologie

La sérologie est un outil de première intention pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des maladies surveillées par le CNR.

Immunofluorescence indirecte

La sérologie se fait par immunofluorescence indirecte. Tous les antigènes sont cultivés en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0.

Pour la fièvre Q, les antigènes de phase II sont obtenus par culture de *Coxiella burnetii* (souche Nine Mile) sur fibroblastes embryonnaires humains de type HEL. Les antigènes de phase I sont obtenus par réactivation du phénotype virulent par passage sur cobaye. La production de ces antigènes est identique aux méthodes précédemment publiées. Les valeurs seuils utilisées pour le diagnostic de fièvre Q aiguë sont $\geq$ 1 :200 et $\geq$ 1 :50 pour les IgG et les IgM de phase II, respectivement, et > 1 :800 pour les IgG de phase I pour le diagnostic de fièvre Q persistante et focalisée.

Pour le diagnostic sérologique des rickettsioses, les rickettsies sont produites sur cellules de rein de singe de type Véro pour les rickettsies du groupe boutonneux, à l'exception de *R. felis* qui est cultivée sur fibroblastes de crapauds de type XTC2, et sur fibroblastes murins de type L929 pour les rickettsies du groupe typhus. La production des antigènes, leur purification et les différentes techniques sérologiques pour le diagnostic des rickettsioses sont identiques aux méthodes publiées. Les valeurs seuils utilisées pour le diagnostic de fièvre boutonneuse méditerranéenne sont $\geq$ 1 :128 et $\geq$ 1 :64 pour les IgG et les IgM, respectivement, et $\geq$ 1 :64 et $\geq$ 1 :32 pour les IgG et les IgM, respectivement, pour le diagnostic des autres rickettsioses. En raison des réactions croisées entre antigènes, l'immunofluorescence indirecte peut être complétée par une adsorption croisée pour préciser contre quel antigène est dirigée la réponse anticorps.

Pour le diagnostic sérologique des bartonelloses, les *Bartonella* sont produites sur cellules endothéliales humaines de type ECV-304. La production des antigènes, leur purification et les différentes techniques sérologiques pour le diagnostic des rickettsioses sont identiques aux méthodes publiées. La valeur seuil utilisée pour le diagnostic de maladie des griffes du chat est $\geq$ 1 :100 pour les IgG, et $\geq$ 1 :800 pour les IgG pour le diagnostic d'endocardite.

Le laboratoire possède une collection importante d'antigènes originaires de tous les continents, ce qui permet d'adapter les panels d'antigènes à l'épidémiologie des différentes zones d'endémie. Les antigènes testés pour un sérum donné en dépistage varient en fonction du lieu où les patients ont été contaminés. Ainsi, les patients européens sont testés contre *C. burnetii, B. henselae, B. quintana, A. phagocytophilum, R. conorii* subsp. *conorii*, *R. slovaca, R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. massiliae*, *R. helvetica, R. felis,* et *R. typhi*. Les patients contaminés en Afrique sont testés contre *C. burnetii, B. henselae, B. quintana, R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. aeschlimannii*, *R. felis,* et *R. typhi*. Les patients contaminés en Asie sont testés contre *C. burnetii, B. henselae, B. quintana, R. conorii* subsp. *indica*, *R. japonica*, *R. honei*, *R. tamurae*, *R. helvetica, R. felis, R. typhi*, et *Orientia tsutsugamushi* souches Kawazaki et Gilliam. Les patients contaminés en Amérique sont testés contre *C. burnetii, B. henselae, B. bacilliformis, B. quintana, A. phagocytophilum, R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. conorii* subsp. *Conorii, R. felis,* et *R. typhi*.

Pour chaque échantillon clinique positif, les médecins du CNR prennent contact avec le laboratoire et/ou le clinicien ayant prescrit l'examen pour obtenir des informations épidémio-cliniques.

Western blot

Pour confirmer le diagnostic de rickettsiose ou d'endocardite à Bartonella, le Western blot peut être utilisé et peut permettre soit directement soit après adsorption croisée de préciser l'espèce en cause. Les antigènes sont identiques à ceux utilisés en sérologie par IFI.

B. Détection moléculaire

La détection moléculaire des bactéries surveillées par le CNR est un outil de tout premier plan, notamment lorsque des arthropodes, biopsies cutanées, ou échantillons de sang EDTA ont été prélevés et nous ont été adressés. Tous les tests de PCR actuellement utilisés ont été développés au sein du CNR, validés et ont fait l'objet de publications scientifiques internationales. Les gènes ciblés et amorces utilisées sont répertoriés dans le Tableau 1. L'ADN des échantillons est extrait à l'aide de robots EZ1 (QIAGEN, Hilden, Allemagne) et les réactions de PCR réalisées à l'aide de thermocycleurs CFX (BioRad, Berkeley, CA, USA). Pour chaque réaction de PCR, un témoin positif et un témoin négatif sont utilisés. Un circuit de type « marche en avant » dédié (préparation des mix réactionnels → ajout ADN) est utilisé pour limiter les risques de contamination. Depuis 2012, le CNR promeut la détection moléculaire par écouvillonnage, qui évite la biopsie cutanée qui était auparavant l'échantillon de référence pour le diagnostic moléculaire et par culture des rickettsioses.

Tableau 1 : Liste des gènes et amorces utilisés par le CNR pour la détection moléculaire des différents microorganismes surveillés

ORGANISMES CIBLES	GENES CIBLES	NOM	SEQUENCES	TAILLE	DILUTION	AMPLICON
BARTONELLA						
Toutes Bartonella	ITS	Barto ITS3 F	GATGCCGGGGAAGGTTTTC	19		104 pdb
	1ère intention	Barto ITS3 R	GCCTGGGAGGACTTGAACCT	20		
		Barto ITS3 P	6FAM- GCGCGCGCTTGATAAGCGTG	20		
	ITS	Barto ITS2 F2	GGGGCCGTAGCTCAGCTG	18		171 pdb
		Barto ITS2 R2	TGAATATATCTTCTCTTCACAATTTC	26		
		Barto ITS2 P	6FAM- CGATCCCGTCCGGCTCCACCA	21		
Bartonella henselae	PAP	PAP 246F	TATGCCTTATGTTGCTGGTGGT	22		151 pdb
	1ère intention	PAP 396R	ACCACCGCCAAGAGTGAAAC	20		
		PAP246/396_MBP	6FAM- CAAGCAGCAGATGATGCAGAAATCGC	26		
	PAP 246F/396R ancienne son		*6FAM- CTGTCAGTTCTACTAAGGTAA*			
	GROEL	GROEL 493F	GGTGCTGGACAAAAGAGCGA	20		151 pdb
	2ème intention	GROEL 643R	TTGCTCCACCAACACGGATA	20		
		GROEL P 493F/643R	6FAM- AATTGCAAGAAAGACTTGCT	20		
Bartonella quintana	yopP	B qui 11580F	TAAACCTCGGGGGAAGCAGA	20		134 pdb
	1ère intention	B qui 11580R	TTTCGTCCTCAACCCCATCA	20		
		B qui 11580P	6FAM- CGTTGCCGACAAGACGTCCTTGC	23		
	fabF3	B qui 05300F	GCTGGCCTTGCTCTTGATGA	20		139 pdb
		B qui 05300R	GCTACTCTGCGTGCCTTGGA	20		
		B qui 05300P	6FAM- TGCAGCAGGTGGAGGAGAACGTG	23		
COXIELLA						
Coxiella burnetii	hypothetical p.	IS30a 3F	CGCTGACCTACAGAAATATGTCC	23		164 pdb
	1ère intention	IS30a 3R	GGGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG	25		
		IS30a F3-R3 P	6FAM- CATGAAGCGATTTATCAATACGTGTATGC	29		
	IS1111A	IS 1111 0706 F	CAAGAAACGTATCGCTGTGGC	21		154 pdb
	confirmation	IS 1111 0706 R	CACAGAGCCACCGTATGAATC	21		
		IS1111 07-06 P	6FAM- CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG	24		
EHRLICHIA						
Anaplasma phagocytophilum	polA	A_pha0001F	TTTGATTCGGGGTCGAAAAA	20		121 pdb
	1ère intention	A_pha0001R	AACGCTTCAACAGCCTCACG	20		
		A_pha0001P	6FAM- TCGCCCTAAAGCACCAGAGGATCTG	25		
	gatA	A_pha0748F	CGCACTACCGCATGCTCTG	19		129 pdb
		A_pha0748R	AGCCCATGGCAAATTCATCC	20		
		A_pha0748P	6FAM- TGCTTGCATGATGGGGAAATTGAACA	26		
	orf 1395	A_pha1395F	CAGAAGAACCGCAGGCGATA	20		138 pdb
		A_pha1395R	TCGACGTAGGTGAGCTGCAA	20		
		A_pha1395P	6FAM- TGACCAAAGATGCACATGGTGCACA	25		
Ehrlichia canis	taredoxin related	E_can0701F	TGAGGCCATTAAAGAATTCACAA	23		113 pdb
	1ère intention	E_can0701R	TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATTT	25		
		E_can0701P	6FAM- AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA	23		
	hyp. p.	E_can0503F	CAGCAAATTCCAATCTGCACTTC	23		146 pdb
		E_can0503R	GAGCTTCCAATTGATGGGTCTG	22		
		E_can0503P	6FAM- TGTTATCTAATGCAAAAATCCCCGGCA	27		
Neorickettsia sennetsu	gltA	glta sennetsu F	GGCTACAGCTAGTTTATGGGG	21		166 pdb
		glta sennetsu R	AGTTTTTATACACCCTGTGCCC	22		
		glta sennetsu	6FAM- GCGCGTTAAAAGAAAAGAAGAGAGAC	26		

C. Culture

Tous les échantillons reçus par le CNR pour culture (tout type de biopsie, arthropodes, sang hépariné, pourvu qu'ils aient été préservés à -80°C après prélèvement et envoyés en carboglace) sont transférés dans le laboratoire NSB3. Les techniciens y sont chargés de traiter ces échantillons sous hotte NSB3 : chaque échantillon est partagé en plusieurs aliquots dont un pour la culture, un pour la détection moléculaire et un qui sera conservé à -80°C pour d'éventuelles analyses ultérieures. Toutes les cultures sont réalisées en tube bijou. Cette méthode de culture, dans laquelle un tapis de cellules cultivées sur lamelle est placé au fond du tube, met en jeu une étape de centrifugation des prélèvements pour augmenter le ratio bactéries/cellules. Les cellules les plus utilisées en première intention sont les cellules endothéliales.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Fièvre Q :

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage de la séquence d'insertion IS1111

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique

Rickettsia :

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage des gènes GLTA et OMPA

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique

Bartonella :

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage du gène FTSZ et de la séquence intergénique 16S-23S rRNA

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique