

Rapport annuel d'activité

2021

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

**Année d'exercice
2020**



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

TABLE DES MATIÈRES

MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	6
ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR	7
2.1. Evolution des techniques.....	7
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	7
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	7
2.4. Collections de matériel biologique	7
2.5. Activités d'expertise	8
2.6. Activités de séquençage.....	9
ACTIVITES DE SURVEILLANCE	10
3.1. Description du réseau de partenaires	10
3.1.1. Collaborations avec l'ECDC	11
3.1.2. Coopérations institutionnelles	11
3.1.3. Collaborations avec les pays étrangers.....	12
3.1.4. Collaborations avec l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	14
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	15
3.2.1. Surveillance des rickettsioses, de la fièvre Q et des bartonelloses.....	15
3.2.2. Diagnostic de la fièvre Q	15
3.2.3. Diagnostic des Rickettsioses.....	19
3.2.4. Diagnostic des Bartonelloses	21
3.2.5. Représentativité des données du CNR	25
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes anti-infectieux	25
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	25
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	25
ALERTE.....	26

<i>ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL</i>	<i>26</i>
5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	26
5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	27
<i>TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....</i>	<i>27</i>
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.....	27
6.1.1. Fièvre Q	27
6.1.2. <i>Rickettsia</i>	28
6.1.3. <i>Bartonella</i>	28
6.2. Liste des publications et communications de l'année 2020, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	28
6.2.1. Fièvre Q	28
6.2.2. <i>Rickettsies</i>	30
6.2.3. <i>Bartonella</i>	30
COMMUNICATIONS.....	31
<i>COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX</i>	<i>31</i>
<i>PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....</i>	<i>32</i>
8.1. Démarche qualité	32
8.2. Activité de recherche en 2020	32
8.3. Activité d'expertise.....	32
8.3.1 Evaluation des kits diagnostiques en dépistage.....	32
8.3.2 Evaluation des kits en quantification	35
<i>ANNEXES 2020</i>	<i>39</i>
<i>Annexe 1 : Missions et organisation du CNR.....</i>	<i>40</i>
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	40
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	41
1.3 L'équipe impliquée dans les activités du CNR	42

1.4. Locaux et équipements.....	44
1.5. Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR	45
1.3.1. Les activités de culture du CNR	45
1.3.2. Les Plateformes	45
1.3.3. Les principaux équipements.....	46
1.3.4 Plateformes techniques de l'IHU auxquelles le CNR a accès	48
1.6. Collections de matériel biologique	50
Conservation sécurisée des souches bactériennes	50
1.6. Démarche qualité du laboratoire.....	61
<i>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</i>	<i>62</i>
2.1. Liste des techniques de référence	62
A. La sérologie	62
B. Détection moléculaire	63
2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR.....	65
<i>Annexe 3 : Autres Informations</i>	<i>66</i>

Résumé analytique des activités pour l'année 2020

La fièvre Q, les rickettsioses et bartonelloses sont des zoonoses communes et endémiques en France, grevées d'un taux de morbidité élevé. Depuis 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est installé au sein de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection à Marseille. Au cours de l'année 2020, le CNR n'a pas connu de changement majeur de personnel. Le CNR a poursuivi l'ensemble de ses activités en 2020 à l'exception de la culture des *Bartonella*, priorité ayant été donnée à la culture des souches de SARS-CoV-2. L'épidémie de COVID-19 a également eu comme conséquences une diminution globale des nombres de prélèvements reçus et des diagnostics de fièvre Q et rickettsiose.

En 2020, le CNR a reçu **13287** échantillons de sérum provenant de **9809** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, **7618** échantillons biologiques divers provenant de **5701** 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 **63.2**, **65.4** et **56.5%** des cas respectivement. En 2020, le CNR a diagnostiqué **98** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (-41% par rapport à 2019), **51** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (-38% par rapport à 2019), **27** nouveaux cas de rickettsioses (-35% par rapport à 2019) et **99** nouveaux cas de bartonelloses (-1% par rapport à 2019).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une forte diminution du nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë en 2020 (**75** vs **128** cas en 2019, -41%) et du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique), avec **49** cas en 2020 contre **74** en 2019 (-33.8%).

En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë a diminué entre 2019 et 2020, passant de **30** à **21** cas (-30%).

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a diminué, avec **27** diagnostics (vs 42 en 2019, -35%), dont **8** cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), **7** cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **1** cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), **8** cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), **2** cas de typhus murin (*R. typhi*) et **1** cas de rickettsiose d'espèce non déterminée.

Au cours de l'année 2020, le nombre de cas d'infections à *Bartonella* a légèrement diminué par rapport à 2019, avec **99** patients (-1%), dont **75** maladies des griffes du chat, **20** endocardites, **2** angiomatoses bacillaires et **2** pélioses hépatiques. Par rapport à 2019, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (75 vs 83) a diminué alors que le nombre de diagnostics d'endocardites a augmenté (20 vs 13, +35%).

Au cours de l'année 2020, Le CNR a testé 3 kits diagnostiques utilisés largement par les laboratoires de microbiologie de CHU et HIA pour le diagnostic de la fièvre Q, incluant les kits de sérologie par immunofluorescence Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA et Focus Q fever IgG, et le kit de sérologie en ELISA Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG.

Analytical summary of activities for year 2020

Q fever, rickettsioses and bartonellosis are common and endemic zoonoses in France, with a high morbidity rate. Since 2017, the French reference center (FRC) for rickettsiae, *Coxiella* and *Bartonella* is located at the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection in Marseille. In 2020, the FRC did not experience any major personnel change. The CNR continued all of its activities in 2020 with the exception of the cultivation of *Bartonella*, priority having been given to the cultivation of SARS-CoV-2 strains. The COVID-19 epidemic also resulted in an overall decrease in the numbers of samples received and diagnoses of Q fever and rickettsioses.

In 2020, the FRC received **13,287** serum samples from **9,809** patients. All sera were tested for the presence of antibodies against *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. In addition, **7618** varied biological samples from **5701** patients were received for culture and / or molecular detection. For the diagnoses of Q fever, rickettsiosis and bartonellosis, serum samples were sent as primary requests in 63.2, 65.4 and 56.5% of cases respectively. In 2020, the FRC diagnosed **98** new cases of acute Q fever (-41% compared to 2019), **51** new cases of persistent focused Q fever (-38% compared to 2019), **27** new cases of rickettsioses (-35 % compared to 2019) and **99** new cases of bartonellosis (-1 % compared to 2019).

Regarding Q fever, in mainland France we observed a sharp decrease in the number of diagnoses of acute Q fever in 2020 (**75** vs 128 cases in 2019, -41%) and in the number of diagnoses of focused forms of Q fever (chronic Q fever), with **49** cases in 2020 against 74 in 2019 (-33.8%).

In French Guiana, the number of acute Q fever diagnoses decreased between 2019 and 2020, from 30 to **21** cases (-30%).

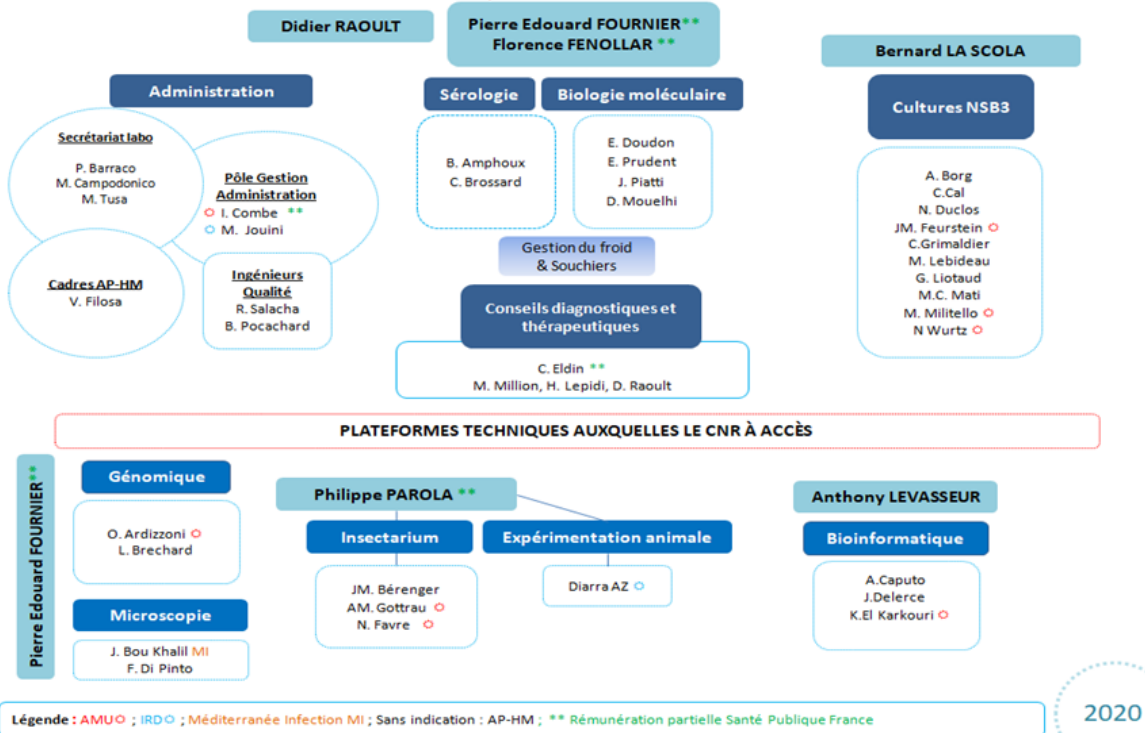
Regarding rickettsiae, the number of rickettsial diagnoses made at the FRC decreased, with **27** diagnoses (vs 42 in 2019, -35%), including **8** cases of Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* and *R. slovaca*), **7** cases of Mediterranean spotted fever (*Rickettsia conorii* and *R. massiliae*), **1** case of African tick-bite fever (*R. africae*), **8** cases of Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), **2** cases of murine typhus (*R. typhi*) and **1** case of rickettsiosis of undetermined species.

In 2020, the number of cases of *Bartonella* infections decreased slightly compared to 2019, with **99** patients (- 1%), including **75** cat scratch diseases, **20** endocarditis, **2** bacillary angiomatoses and **2** hepatic peliosis. Compared to 2019, the number of cat scratch disease diagnoses (**75** vs 83) decreased while the number of endocarditis diagnoses increased (**20** vs 13, + 35%).

In 2020, the FRC tested 3 diagnostic kits, widely used by microbiology laboratories from public or military hospitals in France for the diagnosis of Q fever, including the Vircell *Coxiella burnetii* I + II IFA IgG / IgM / IgA and Focus Q fever IgG immunofluorescence serology kits, and the Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG ELISA serology kit.

MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*



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.

RESUME DE LA PRODUCTION D'EXPERTISE EN 2020

- * Plus de **20 000** échantillons cliniques reçus,
- * Plus de **100 000** analyses réalisées,
- * Isolement de 26 souches de *Coxiella burnetii* et de 5 souches de *Rickettsia*,
- * Séquençage de 16 génomes de *Coxiella burnetii*, 5 de *Rickettsia* sp. et 33 de *Bartonella* sp.

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-MS).

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

En 2020, nous avons réalisé la comparaison de la technique de sérologie par immunofluorescence indirecte « maison » du CNR avec les kits Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA, Focus Q fever IgG et Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR fournit antigènes et ADN à plusieurs laboratoires français, pour le diagnostic de la fièvre Q, des rickettsioses et des bartonelloses, dont le CHU de Bordeaux, l'hôpital européen Georges Pompidou (Paris), le CHU de Lyon, le CHU de Strasbourg et le CHU de Tours.

2.4. Collections de matériel biologique

En 2020, le CNR a reçu **13287** échantillons de sérums et **7618** échantillons biologiques divers (sang, biopsies, liquides de ponctions, arthropodes ...)

De plus, **26** souches de *Coxiella burnetii* et **5** souches de *Rickettsia* ont été cultivées. En raison de l'utilisation du laboratoire NSB3 pour la culture du SARS-CoV-2 en priorité, les cultures de *Bartonella* n'ont pas pu être assurées d'avril à décembre, et donc aucune souche de *Bartonella* n'a été isolée en 2020.

2.5. Activités d'expertise

Echantillons		Type d'analyses réalisées
Type	Nombre	
Souches	0	
Sérums		SEROLOGIES
France	13151	
Etranger	136	<u>Antigènes testés pour tout sérum</u> : <i>Rickettsia conorii</i>, <i>R. typhi</i>, <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Bartonella henselae</i>, <i>B. quintana</i>, <i>Anaplasma phagocytophilum</i>, <i>Francisella tularensis</i> + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Europe et bassin méditerranéen</u> : <i>R. slovaca</i>, <i>R. massiliae</i>, <i>R. aeschlimannii</i>, <i>R. helvetica</i>, <i>R. raoultii</i>, <i>R. sibirica mongolitimonae</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Afrique sub-saharienne</u> : <i>R. africae</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Asie</u> : <i>R. sibirica mongolitimonae</i>, <i>R. japonica</i>, <i>R. honei</i>, <i>Orientia tsutsugamushi</i> (souches gilliam et Kawazaki), <i>Neorickettsia sennetsu</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Amérique</u> : <i>R. rickettsii</i>, <i>R. parkeri</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Australie</u> : <i>R. australis</i>, <i>R. honei</i>
Autres types de prélèvements		PCR
France	7542	PCR <i>C. burnetii</i> (2 gènes), <i>Rickettsia</i> sp. (2 gènes) ou <i>Bartonella</i> sp. (2 gènes) plus éventuellement ARNr 16S et ARNr 18S en fonction de la demande et du contexte épidémiologique et clinique.
Etranger	76	CULTURE CELLULAIRE Si PCR positive et échantillon reçu dans des conditions permettant la culture, culture sur cellules endothéliales.

DELAIS MOYENS DE RESTITUTION DES RESULTATS

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

2.6. Activités de séquençage

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

- **OUI :**
 - **Accès interne : 4 séquenceurs Illumina MiSeq, 2 séquenceurs Gridlon, 1 séquenceur Promethlon et 1 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, diagnostic direct.**

Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

- **Nombres de séquences réalisées dans l'année : 16 génomes de *Coxiella burnetii*, 5 génomes de *Rickettsia* et 33 génomes de *Bartonella*.**
- **Modalités de sélection des souches pour séquençage : séquençage systématique des souches de *C. burnetii* cultivées au sein du CNR.**

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

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

ELEMENTS CLEFS DE L'ANNEE

En 2020, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* a reçu **13287** échantillons de sérum provenant de **8909** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, **7618** échantillons biologiques divers provenant de **5701** 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 **63.2**, **65.4** et **56.5%** des cas respectivement. En 2020, le CNR a diagnostiqué **98** nouveaux cas de fièvre Q aigüe (-41% par rapport à 2019), **51** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (-38% par rapport à 2019), **27** nouveaux cas de rickettsioses (-35% par rapport à 2019) et **99** nouveaux cas de bartonelloses (- 1% par rapport à 2019).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une forte diminution du nombre de diagnostics de fièvre Q aigüe en 2020 (**75** vs **128** cas en 2019, -41%) et du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique), avec **49** cas en 2020 contre **74** en 2019 (-33.8%).

En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aigüe a diminué entre 2019 et 2020, passant de **30** à **21** cas (-30%).

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a diminué, avec **27** diagnostics (vs 42 en 2019, -35%), dont **8** cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), **7** cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **1** cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), **8** cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), **2** cas de typhus murin (*R. typhi*) et **1** cas de rickettsiose d'espèce non déterminée.

Au cours de l'année 2020, le nombre de cas d'infections à *Bartonella* a légèrement diminué par rapport à 2019, avec **99** patients (- 1%), dont **75** maladies des griffes du chat, **20** endocardites, **2** angiomatoses bacillaires et **2** pélioses hépatiques. Par rapport à 2019, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (75 vs 83) a diminué alors que le nombre de diagnostics d'endocardites a augmenté (20 vs 13, +35%).

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 contrôlés positifs aux Laboratoires des CHU de Bordeaux (Pr. BEBEAR), Lyon (Pr. VENDENESCH), Paris (Pr. MAINARDI), Strasbourg (Pr. JAULHAC), Tours (Pr. MEREGHETTI) et du CHG d'Aix en Provence (Dr. BRIEU) 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, 1^{er} Président de l'ESCAR. En 2016 et 2017, le Pr Fournier a été 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.

Le CNR collabore avec les cinq centres collaborateurs OMS sur les rickettsioses (ci-dessous) et avec l'institut Pasteur, dirigé depuis 2020 par le Dr Emmanouil ANGELAKIS, ancien membre du CNR.

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

-
- Argentine : M. Prieto – Réseau national de surveillance des rickettsioses
 - Belgique : M. Hing - CNR belge des Rickettsies
 - Danemark : B. Jensen – CNR danois des Rickettsies
 - 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)
 - Welcome trust d'Oxford (Grande-Bretagne, Thaïlande) et Hôpital de Ventiane (Laos)
 - Hôpital de Tamilnadu (Inde)
 - Hôpital de Bangkok (Thaïlande)
-

- 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)
- Institut Pasteur Alger (Algérie)
- Institut Pasteur Casablanca (Maroc)
- Université d'Edirne (Turquie)
- Hôpital de Bamako (Mali)
- Hôpital Principal de Dakar (Sénégal)
- Université de Lausanne (Suisse)
- Université de Palerme (Italie)
- Institut Pasteur Athènes (Grèce)
- Hôpital d'Oslo (Norvège)
- Institut Vétérinaire de Palmerston (Nouvelle-Zélande)
- CDC Atlanta (USA)

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	Dr Emmanouil Angelakis	Athènes
	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	Omsk
Slovaquie	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
Thaïlande	Dr Yupin Supputamongkol	Bangkok
	Pr George Watt	Bangkok
Océanie		
Australie	Pr Stephen Graves	Victoria
	Pr John Stenos	Geelong
Guyane 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 Marina Ereemeeva	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*. Depuis 2017, le CNR et le LNR analysent conjointement le pangéome de *Coxiella burnetii*.

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

3.2.1. 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.

3.2.2. Diagnostic de la fièvre Q

En 2020, 13287 échantillons de sérum provenant de 9809 patients ont été testés au CNR pour la présence d'anticorps contre *C. burnetii* contre 15265 prélèvements de 12228 patients en 2019 (-9.1%). De plus, nous avons reçu 7618 échantillons divers (sang, biopsies ganglionnaires, valves cardiaques, biopsies vasculaires, osseuses, ...) de 5701 patients (contre 8656 échantillons de 5062 patients en 2019, -12%) pour diagnostic moléculaire et culture.

A. Diagnostic sérologique

Au total, **400 patients** se sont révélés positifs en IgG ($\geq 1:100$) et/ou IgM ($\geq 1:50$). **Quatre-vingt-dix-huit** nouveaux cas de fièvre Q aiguë ont été diagnostiqués en 2020 contre **166** (-41%) en 2019, et **51** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée contre **83** (-38.5%) en 2019. Enfin, **251** patients présentaient une cicatrice sérologique de fièvre Q ancienne ou un profil de fièvre Q persistante focalisée diagnostiquée avant 2020.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Quatre-vingt-dix-huit patients ont fait l'objet d'une détection de *C. burnetii* positive par détection moléculaire.

C. Diagnostic par culture

En outre, **26** souches de *Coxiella burnetii* ont été isolées en culture cellulaire de biopsies d'anévrismes de l'aorte (5), de valves cardiaques (19) et de sang (2).

D. Fièvres Q aiguës

Le nombre de patients atteints de fièvre Q aiguë en 2020 et pour lesquels le CNR a reçu des prélèvements était de **98**, répartis en **74** patients en France métropolitaine, **21** patients en Guyane française, **1** patient à la Réunion et **1** patient en Suisse. L'incidence de la fièvre Q aiguë en France (métropole et départements d'Outre Mer) calculée à partir des diagnostics obtenus au CNR en 2020 est de **0.14** pour 100.000 personnes, en baisse par rapport à 2019 (0.25). Ce taux d'incidence est un taux minimum qui sous-estime la réalité puisque la maladie n'est pas à déclaration obligatoire. Aucune épidémie de fièvre Q n'a été décelée en 2020 en France. Parmi les 98 patients atteints de fièvre Q aiguë, **56 (76.7%)** étaient de sexe masculin (sex ratio M/F 3.29). L'âge moyen des patients atteints de fièvre Q était de **51.6 +/- 17.2** ans. Le plus jeune patient atteint de fièvre Q aiguë avait 11 ans, et le plus âgé 89 ans. **Quarante-neuf** des 98 patients atteints de fièvre Q aiguë présentaient une hépatite fébrile (50%), **23** une pneumonie (23.4%), **18** une fièvre isolée (18.4%), **2** un lymphome (1.0%), **1** une endocardite aiguë (1.0%), **1** une méningite (1.0%), **1** une thrombose mésentérique (1.0%) (Tableau 3).

Tableau 3 : Données démographiques des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués au CNR en 2020

Forme Clinique	Nombre	Age moyen +/- écart-type	Sex ratio M/F
Hépatite	49	47.9 +/- 17.3	2.3
Fièvre isolée	19	57.2 +/- 16.9	3.7
Pneumonie	23	54.4 +/- 18.7	2.8
Endocardite aiguë	1	71	1/0
Thrombose mésentérique	1	57	0/1
Méningite	1	27	1/0
Lymphome	1	43, 76	1/1

La répartition temporelle des cas métropolitains de fièvre Q aiguë en fonction du mois du diagnostic pour 2020 montre un pic en avril (10.2%) et un en juillet (17.3%) (Figure 1). Il est à noter que cette répartition diffère de celles des années 2018 et 2019 (premier pic limité à avril et second pic en juillet contre août). La répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q en 2020 est présentée dans la Figure 2. La majorité des nouveaux cas de fièvre Q aiguë (39.7%) a été diagnostiquée dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA), suivie par les régions Nouvelle Aquitaine (23.3%), Occitanie (10.9%), Pays de la Loire (9.6%) et Auvergne-Rhône-Alpes (6.8%). Quarante-six des patients ayant contracté la fièvre Q en métropole

présentaient une hépatite (63.0%), vingt une fièvre isolée (27.4%), 2 un lymphome (2.8%), 1 une forme pulmonaire (1.4%), 1 une méningite (1.4%), 1 une thrombose mésentérique (1.4%) et 1 une endocardite aigüe (1.4%).

Outre-mer, la Guyane est la région française où la fièvre Q a la plus forte incidence, avec **21** nouveaux cas de fièvre Q aigüe diagnostiqués en 2020 (Figure 3), soit une incidence pour 100.000 habitants de 8.4, en baisse par rapport à l'année 2019 (10.4). Au plan clinique, la fièvre Q en Guyane s'est manifestée en 2020 en majorité par une pneumonie interstitielle fébrile (19 patients, 90.4%), suivie de fièvre isolée (2 patients, 9.6%), ce qui diffère significativement à nouveau de la fièvre Q aigüe en métropole ($p < 10^{-2}$). De plus, deux cas d'endocardite ont été diagnostiqués en Guyane en 2020. En outre, le CNR a reçu en 2020 des prélèvements de sérum pour 18 patients suivis pour fièvre Q ayant été diagnostiquée au cours des années précédentes, dont 17 patients ayant développé une fièvre Q aigüe et un une fièvre Q chronique.

Enfin, le CNR a diagnostiqué un cas de fièvre Q aigüe en Suisse et un cas à la Réunion.

Figure 1. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aigüe diagnostiqués par le CNR en 2020 en France métropolitaine

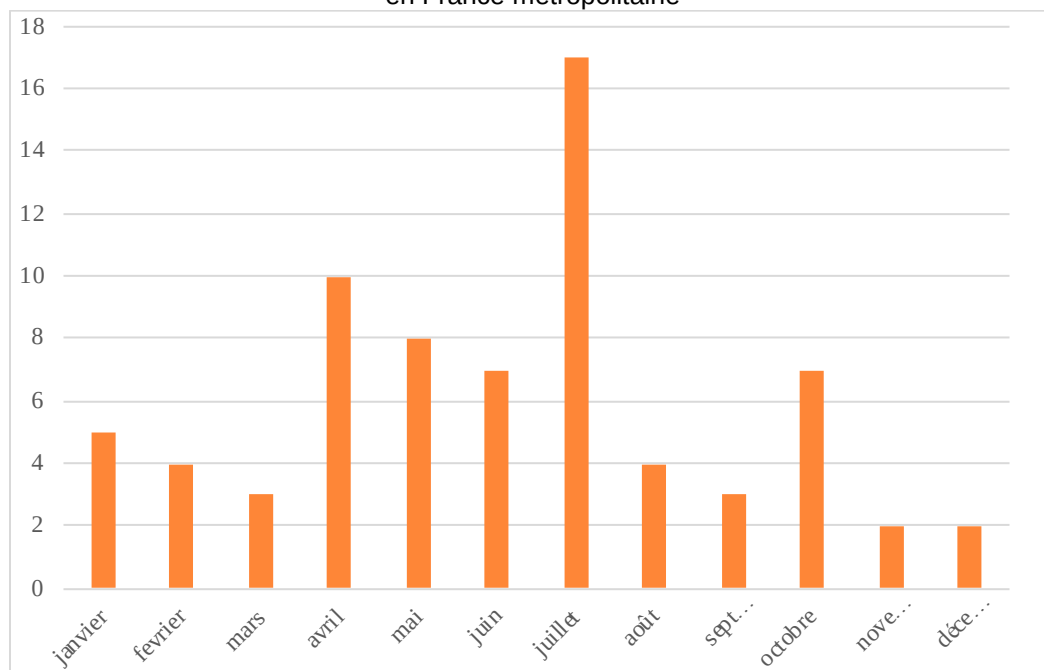


Figure 2. Répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q diagnostiqués par le CNR en France métropolitaine en 2020

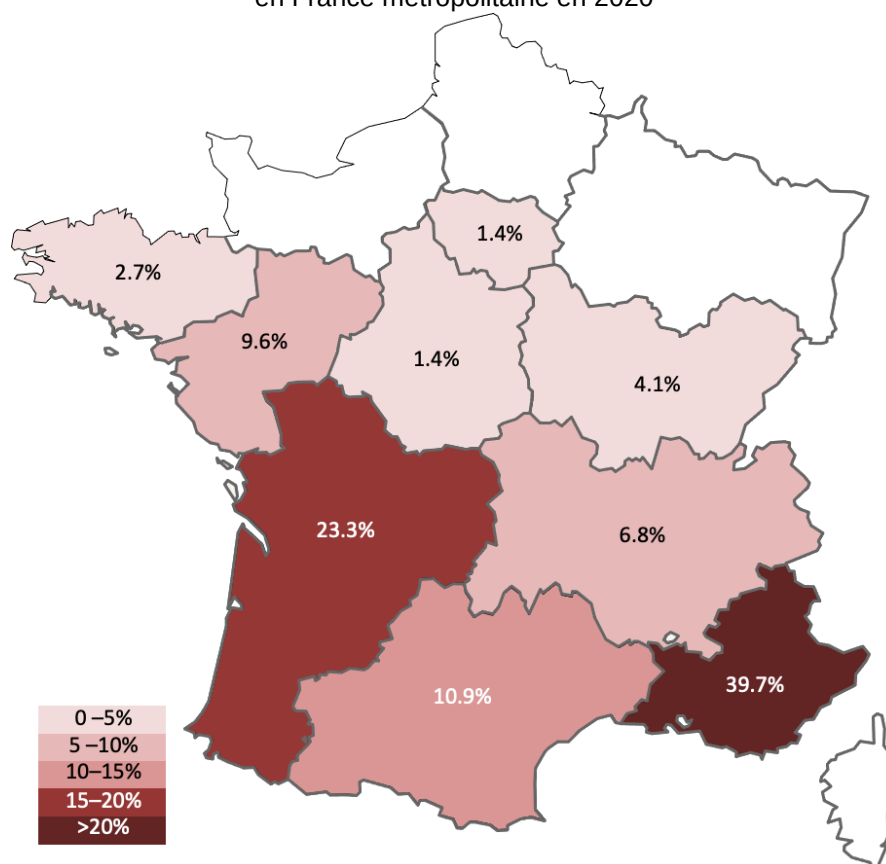
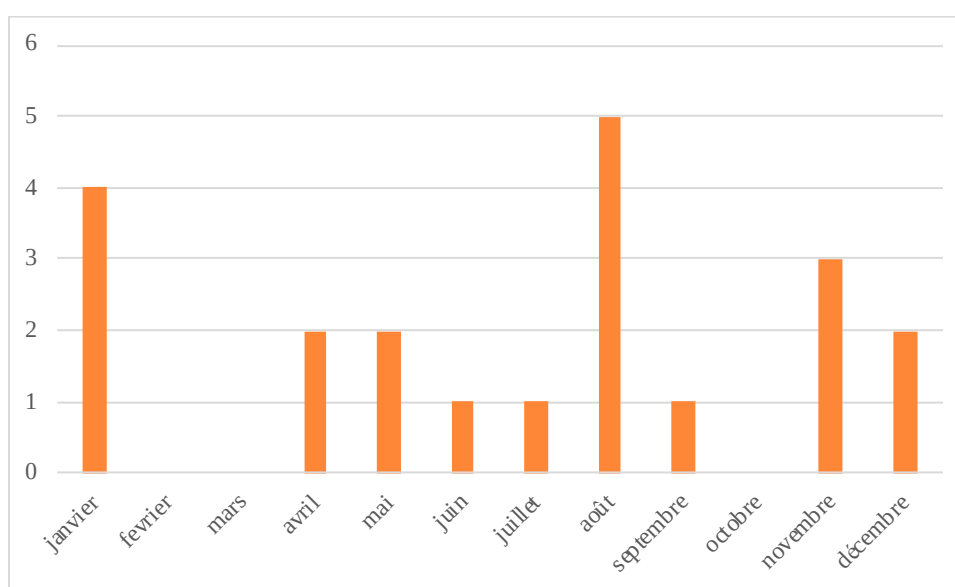


Figure 3. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2020 en Guyane française



E. Epidémies de fièvre Q aigüe en France en 2020

Aucune épidémie de fièvre Q n'a été détectée par le CNR en 2020 en France.

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

Cinquante-et-un nouveaux cas d'infection persistante focalisée à *C. burnetii* (fièvre Q chronique) ont été diagnostiqués par le CNR en 2020 contre **83** en 2019 (-38.5%). Parmi ces patients, le sex ratio H/F était de 2,61 (38/13) et l'âge moyen était de 63.3 +/- 18.7 ans. Les infections focales à *C. burnetii* se répartissaient selon les formes suivantes : endocardites (N = 28, 54.9%) et infections vasculaires (N = 23, 45.0%). Les patients atteints d'infections vasculaires présentaient un âge plus élevé que ceux présentant une endocardite (70.5 +/- 8.2 ans vs 58.7 +/- 23.6 ans). Concernant l'origine des patients présentant une forme persistante focalisée de fièvre Q, la région PACA est première (6 endocardites et 4 infections vasculaires), suivie de Nouvelle Aquitaine (2 EI, 6 IV), Occitanie (3 EI, 5 IV), Auvergne-Rhône-Alpes (3 EI, 2 IV et 1EI+IV), Pays de la Loire (1 EI, 2 IV), Bourgogne-Franche Comté (1 EI, 2 IV), Bretagne (1 EI), île de France (1 IV), Hauts de France (1 EI). En dehors de la France métropolitaine, 2 endocardites ont été diagnostiquées en Guyane française, 4 EI en Israël et 1 EI dans chacun des pays suivants : Belgique, Grèce et Portugal.

3.2.3. Diagnostic des Rickettsioses

En 2020, 26 cas de rickettsioses ont été diagnostiqués au CNR contre 42 en 2019 (-38%).

A. Diagnostic sérologique

Parmi les **13287** patients testés, un diagnostic de rickettsiose a été porté chez **26** patients (Figure 4). Ces diagnostics incluent les diagnostics suivants : **8 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite** (SENLAT, *R. raoultii* et *R. slovaca*), **8 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis** (LAR, *R. sibirica mongolitimonae*), **7 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne** (FBM, *Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **2** cas de typhus murin (TM, *R. typhi*), **1 cas d'African tick-bite fever** (ATBF, *R. africae*), et **un** cas de rickettsiose d'espèce indéterminée. Les caractéristiques des patients infectés par type d'infection ainsi que le lieu géographique de la piqûre 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

Neuf cent cinquante-deux prélèvements de 782 patients ont fait l'objet d'un diagnostic par biologie moléculaire. Quarante (4,2%) de ces prélèvements se sont révélés positifs et ont permis de contribuer au diagnostic de rickettsioses pour 21 des 26 patients positifs. La nature des prélèvements les plus

fréquemment positifs étaient les biopsies cutanées d'escarre (55%) écouvillons d'escarre (37.5%) et les et les échantillons de sérum (7.5%).

C. Diagnostic par culture

En outre, 5 souches de rickettsies ont été isolées en culture cellulaire de tiques, incluant 3 souches de *R. slovaca* et 2 de *R. conorii*.

D. Répartition des cas de rickettsioses diagnostiqués

Les 8 patients présentant un tableau de SENLAT sont issus des régions suivantes : Auvergne-Rhône-Alpes, Nouvelle Aquitaine, PACA, Pays de la Loire, et la maladie a été contractée de juin à novembre. Les 8 patients présentant une LAR ont été infectés en région PACA, Occitanie ou Pays de la Loire. Les cas sont survenus entre avril et juin (Figure 4). Les 7 cas de FBM sont survenus d'avril à août en région PACA (Figure 4, Tableau 4), qui est l'une des régions du pourtour méditerranéen français les plus endémiques pour cette rickettsiose associée à la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus*. Parmi les deux patients atteints de typhus murin l'un revenait de la réunion et l'autre de Madagascar. Le cas d'ATBF a été contracté lors de la visite d'un parc animalier en Afrique du sud, où la maladie est endémique et transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. Le cas de rickettsiose non étiquetée a été contracté en janvier en région Grand Est.

Figure 4. Répartition mensuelle des cas de rickettsioses diagnostiqués en 2020

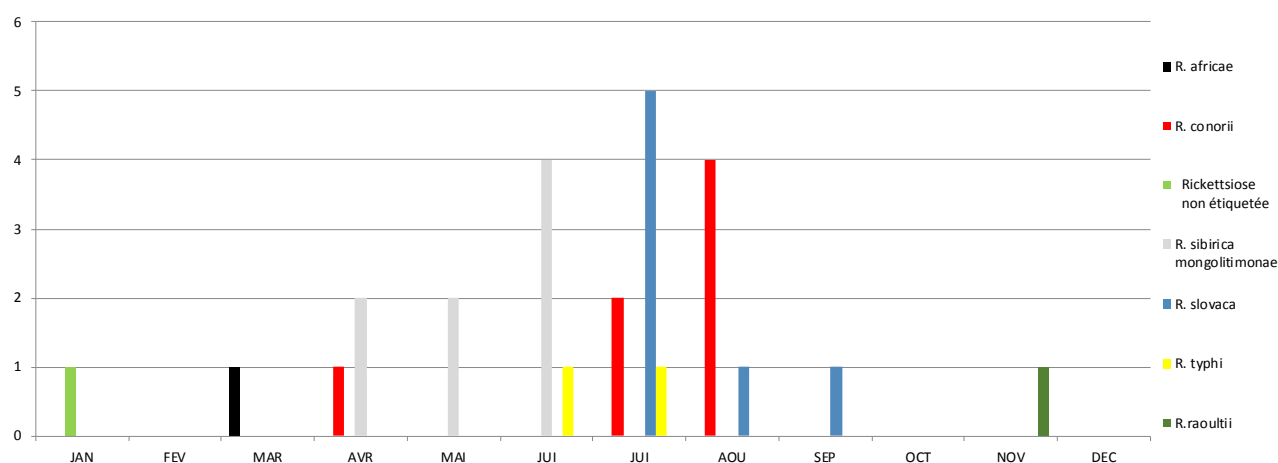


Tableau 4. Caractéristiques des patients chez lesquels un diagnostic de rickettsiose a été posé en 2020 (N = 26)

Infection	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard	Lieu de piqure
SENLAT	4/4	59.7 +/- 13.2	Auvergne-Rhône-Alpes, Nouvelle Aquitaine, PACA, Pays de la Loire
Lymphangitis Associated Rickettsiosis	5/3	60.0 +/- 11.4	Occitanie, PACA, Pays de la Loire
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	6/6	47.1 +/- 18.4	PACA
Typhus murin	2/0	22, 23	La Réunion, Madagascar
African tick-bite fever	1/0	61	Afrique du Sud

3.2.4. Diagnostic des Bartonelloses

En 2020, 99 cas d'infections à *Bartonella* sp. ont été diagnostiqués au CNR, contre 100 en 2019 (- 1%). Soixante-quinze de ces patients étaient atteints de **maladie des griffes du chat** (MGC). Un diagnostic d'**endocardite** a été porté chez 20 patients : à *B. henselae* (13 patients), *B. quintana* (6 patients) et *B. grahamii* (1 patient). Deux cas de **péliohe hépatique** et deux cas d'**angiomatose bacillaire** à *B. henselae* ont également été diagnostiqués.

A. Diagnostic sérologique

Vingt-quatre échantillons de sérums (pour 24 patients) se sont révélés positifs (taux d'IgG $\geq 1:100$) en sérologie. Les sérums positifs étaient ceux de patients atteints de maladie des griffes du chat, d'endocardite ou d'angiomatose bacillaire.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Cent des 1702 prélèvements adressés pour diagnostic moléculaire, pour 98 patients, se sont révélés positifs.

C. Diagnostic par culture

Aucune souche de *Bartonella* n'a été cultivée en 2020, un effort particulier ayant été mis sur les cultures cellulaires, notamment virales, en raison de l'épidémie COVID-19. Les cultures de *Bartonella* ont repris en 2021.

D. Maladie des griffes du chat

Un diagnostic de maladie des griffes du chat (MGC) a été porté chez 75 patients (Figure 5). Les patients atteints de MGC étaient majoritairement des femmes (40/75) d'un âge moyen de 34.3 +/- 25.2 (contre 38.5 +/- 19.6 ans pour les hommes). 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 : 62% des cas sont diagnostiqués de novembre à mai. La répartition géographique des cas de MGC (Figure 6) montrait une prédominance des cas dans le ¼ sud-ouest de la France. Comme depuis 2013 : la région Nouvelle Aquitaine arrivait en tête avec 28.1 %, suivie par les régions Pays de la Loire (16.9%), PACA (15.5%) et Hauts de France (11.3%). Il est à noter qu'à la différence des autres pathologies qui font l'objet de l'expertise du CNR, les cas de maladie des griffes du chat en région PACA n'étaient pas majoritaires et ne représentaient que 15.5% de l'ensemble des diagnostics en France métropolitaine malgré le biais que représente la présence du CNR dans cette région. Cette donnée souligne en particulier la forte incidence de la maladie des griffes du chat en Nouvelle Aquitaine.

Figure 5. Répartition temporelle des cas de maladies des griffes du chat en 2020 par mois de diagnostic

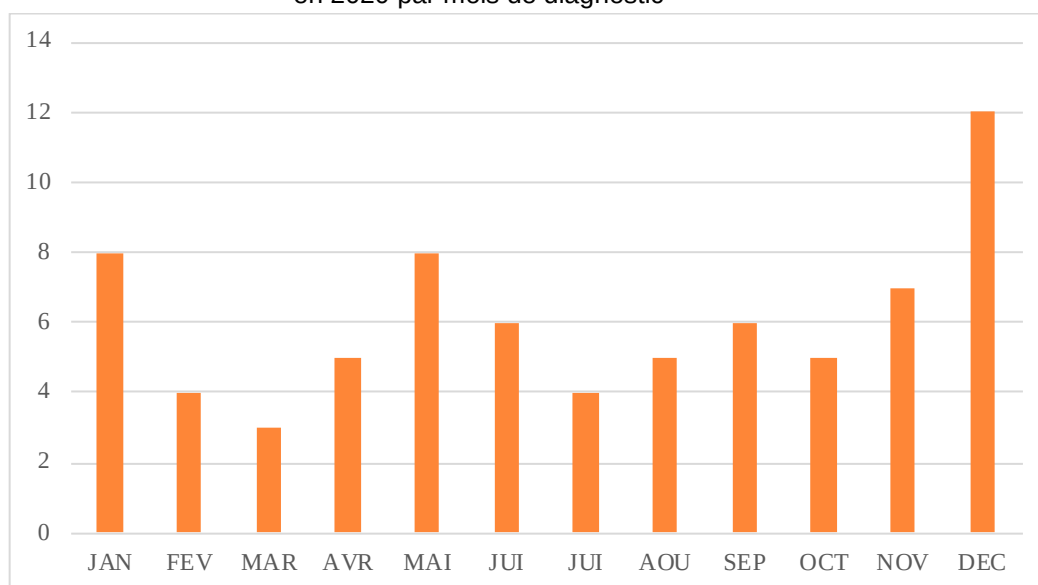
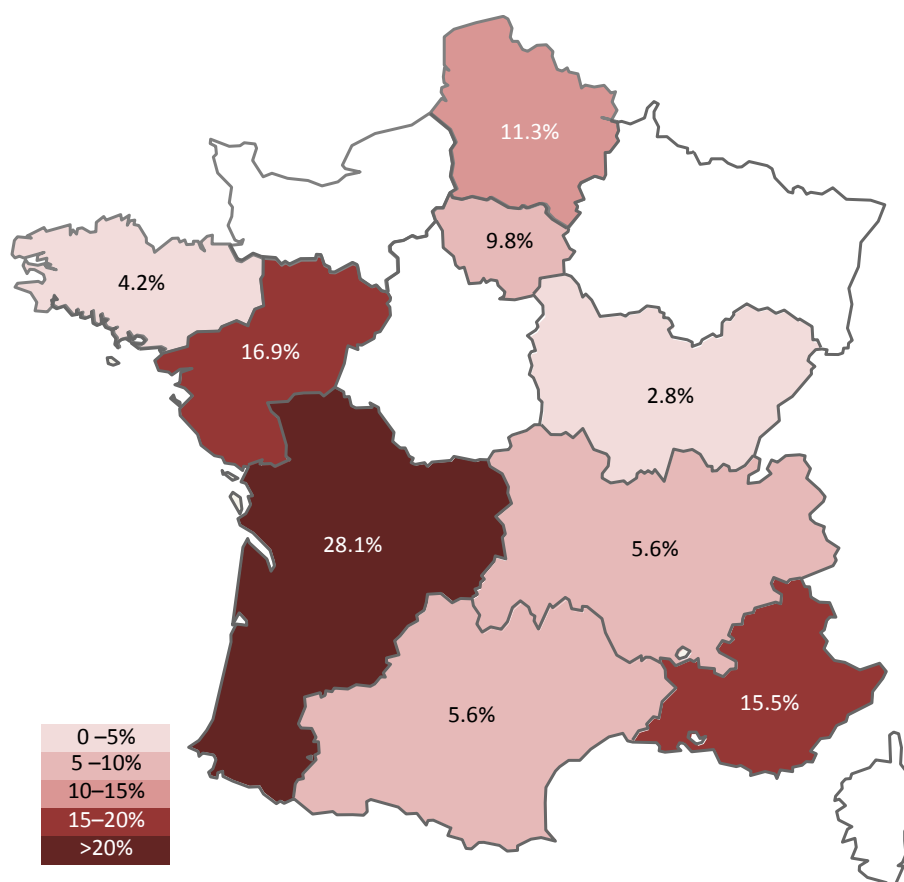


Figure 6. Répartition géographique des cas de maladie des griffes du chat diagnostiqués par le CNR en France en 2020



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 **13** patients, d'endocardite à *B. quintana* chez **6** patients, de péliose hépatique et d'angiomatose bacillaire à *B. henselae* chez **deux** et **deux** patients immunodéprimés, respectivement.

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	Région d'origine
Endocardite à <i>B. henselae</i>	13	12/1	63.4+/- 11.5	Auvergne-Rhône-Alpes, Bretagne, Nouvelle Aquitaine, Grande-Bretagne
Endocardite à <i>B. quintana</i>	6	6/0	62.4+/- 24.1	Hauts de France, Nouvelle Aquitaine, PACA,
Bactériémie à <i>B. grahamii</i>	1	1/0	63	PACA
Péliohe hépatique à <i>B. henselae</i>	2	2/0	40, 55	Bretagne, Nouvelle Aquitaine,
Angiomatose bacillaire à <i>B.henselae</i>	2	1/1	4, 59	PACA

3.2.5. 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 proposé en 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 puis d'épidémie de COVID-19, cette analyse n'a pas été possible.

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. Une méthode d'évaluation de la sensibilité des souches de *Coxiella burnetii* à l'hydroxychloroquine a été mise au point par le CNR en 2017.

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

ALERTE

En 2020, le CNR n'a détecté ou été associé à l'investigation d'aucune épidémie de fièvre Q.

ACTIVITES DE RETRO-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 2020, le CNR a reçu 8 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 seniors 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 <https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/> 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 2020 le CNR n'a pas été sollicité par le Ministère de la Santé, le HCSP, la HAS ou l'OMS.

TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE 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 2020, les chercheurs du CNR ont mis au point une méthode de culture à haut débit de *Coxiella burnetii* (4) et montré le rôle déterminant du facteur de transcription T-Bet, impliqué dans la réponse Th1, dans le contrôle de *Coxiella burnetii* chez les souris (7).

En France, nous avons observé une séroprévalence de la fièvre Q de 2.1% parmi les populations sans domicile fixe à Marseille (9), décrit un cas rare d'infection chronique de prothèse aortique de type Bentall (8) et un cas de vascularite auto-immune associée à une fièvre Q chronique (12) et utilisé le génotypage pour identifier la source d'un cas de fièvre Q chez un éleveur (14).

En Guyane française, le CNR a participé à l'identification du Capybara comme réservoir d'une épidémie de fièvre Q dans la forêt amazonienne (13).

Plusieurs collaborations avec des équipes étrangères ont été menées pour étudier les génotypes de *C. burnetii* circulant au Liban (6), la séroprévalence de la fièvre Q à Sao Tome et Principe (4), la présence de *C. burnetii* dans les rongeurs et leurs ectoparasites au Mali (10), l'absence de responsabilité de la bactérie chez les patients fébriles au Gabon (11), et le rôle potentiel des camélidés dans la transmission de la maladie au Maghreb et au Proche et Moyen orient (5).

Enfin, deux revues sur la fièvre Q ont également été publiées (1,2).

6.1.2. *Rickettsia*

En 2020, l'équipe du CNR a mis au point des critères génomiques permettant de classer les isolats de *Rickettsia* dans des espèces existantes ou nouvelles (16). Nous avons également publié une étude rétrospective des 61 cas de typhus murin diagnostiqués à la Réunion de 2012 à 2017 (20), et un cas d'encéphalite à *R. sibirica mongolitimonae* a été décrit (19).

trois collaborations avec des équipes étrangères ont été menées pour étudier la présence de *R. felis* dans les puces de chat *Ctenocephalides felis* à Sao Tome et Principe (15), démontrer la persistance de *R. conorii* dans des prélèvements de sang de chiens asymptomatiques en Italie (17), la présence de rickettsies dans des tiques de chiens en Algérie (18).

Enfin, une revue en langue française sur les rickettsioses a été publiée (21).

6.1.3. *Bartonella*

En 2020, le CNR a détecté par PCR *Bartonella quintana* dans 7.5% de 107 poux du corps et 3.1% de 63 morpions prélevés chez l'homme en France métropolitaine (23), et dans 1.2% de 507 poux du corps prélevés chez 37 personnes sans domicile fixe à Marseille de 2013 à 2018 (24). Enfin, nous avons conduit une étude paléo-microbiologique et avons détecté *B. quintana* dans la pulpe dentaire de cinq sur 21 squelettes de personnes décédées entre les 5^{ème} et 17^{ème} siècles (22).

6.2. Liste des publications et communications de l'année 2020, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Fièvre Q

- 1: Melenotte C, Million M, Raoult D. New insights in *Coxiella burnetii* infection: diagnosis and therapeutic update. Expert Rev Anti Infect Ther. 2020;18:75-86. doi: 10.1080/14787210.2020.1699055.
- 2: Melenotte C, Mezouar S, Mège JL, Gorvel JP, Kroemer G, Raoult D. Bacterial infection and non-Hodgkin's lymphoma. Crit Rev Microbiol. 2020;46:270-287. doi: 10.1080/1040841X.2020.1760786.
- 3: Devaux CA, Osman IO, Million M, Raoult D. *Coxiella burnetii* in dromedary camels (*Camelus dromedarius*): a possible threat for humans and livestock in North Africa and the Near and Middle East? Front Vet Sci. 2020;7:558481. doi: 10.3389/fvets.2020.558481.
- 4: Hsi TE, Hsiao SW, Minahan NT, Yen TY, de Assunção Carvalho AV, Raoult D, Fournier PE, Tsai KH. Seroepidemiological and molecular investigation of spotted fever group rickettsiae and *Coxiella*

burnetii in Sao Tome Island: A One Health approach. Transbound Emerg Dis. 2020;67 Suppl 2:36-43. doi:10.1111/tbed.13191.

5: Francis R, Mioulane M, Le Bideau M, Mati MC, Fournier PE, Raoult D, Bou Khalil JY, La Scola B. High-content screening, a reliable system for *Coxiella burnetii* isolation from clinical samples. J Clin Microbiol. 2020;58:e02081-19. doi: 10.1128/JCM.02081-19.

6: Dabaja MF, Greco G, Blanda V, Tempesta M, Bayan A, Torina A, Vesco G, D'Agostino R, Lelli R, Ezzedine M, Mortada H, Raoult D, Fournier PE, Mortada M. Multispacer sequence typing of *Coxiella burnetii* from milk and hard tick samples from ruminant farms in Lebanon. Vet Ital. 2020;56:289-296. doi:10.12834/VetIt.1799.13290.1.

7: Mezouar S, Lepidi H, Omar Osman I, Gorvel JP, Raoult D, Mege JL, Bechah Y. T-Bet controls susceptibility of mice to *Coxiella burnetii* infection. Front Microbiol. 2020;11:1546. doi: 10.3389/fmicb.2020.01546.

8: Ghellab L, Melenotte C, Million M, Leveille L, Thomas P, Collart F, Raoult D. Persistent *Coxiella burnetii* cardiovascular infection on Bentall-De Bono prosthesis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 May;39:1003-1010. doi:10.1007/s10096-020-03816-9.

9: Ly TDA, Louni M, Hoang VT, Dao TL, Badiaga S, Brouqui P, Tissot-Dupont H, Raoult D, Fournier PE, Gautret P. Epidemiological serosurvey of vector-borne and zoonotic pathogens among homeless people living in shelters in Marseille: cross-sectional one-day surveys (2005-2015). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39:1663-1672. doi: 10.1007/s10096-020-03889-6.

10: Diarra AZ, Kone AK, Doumbo Niare S, Laroche M, Diatta G, Atteynine SA, Coulibaly M, Sangare AK, Kouriba B, Djimde A, Dabo A, Sagara I, Davoust B, Ranque S, Thera MA, Raoult D, Doumbo OK, Parola P. Molecular detection of microorganisms associated with small mammals and their ectoparasites in Mali. Am J Trop Med Hyg. 2020;103:2542-2551. doi: 10.4269/ajtmh.19-0727.

11: Boumbanda Koyo CS, Oyegue-Liabagui SL, Mediannikov O, Cortaredona S, Kouna LC, Raoult D, Lekana-Douki JB, Fenollar F. High circulation of malaria and low prevalence of bacteremia in febrile and afebrile children in Northeastern Gabon. Am J Trop Med Hyg. 2020;102:121-129. doi: 10.4269/ajtmh.19-0368.

12: Lacombe V, Planchais M, Boud'Hors C, Croué A, Melenotte C, Raoult D, Dubée V, Vandamme YM. *Coxiella burnetii* endocarditis as a possible cause of ANCA-associated vasculitis. Rheumatology (Oxford). 2020 Sep 1;59(9):e44-e45. doi:10.1093/rheumatology/kez648.

13: Christen JR, Edouard S, Lamour T, Martinez E, Rousseau C, de Laval F, Catzefflis F, Djossou F, Raoult D, Pommier de Santi V, Epelboin L. Capybara and brush cutter involvement in Q fever outbreak in remote area of Amazon rain forest, French Guiana, 2014. Emerg Infect Dis. 2020;26:993-997. doi:10.3201/eid2605.190242.

14: Medkour H, Davoust B, Angelakis M, Thiéry R, Raoult D, Rousset E, Parola P, Eldin C. A sporadic case of acute Q fever and identification of the animal source of the infection. Folia Microbiol (Praha). 2020;65:797-800. doi:10.1007/s12223-020-00788-3.

6.2.2. Rickettsies

- 15: Tsai KH, Yen TY, Wu WJ, Carvalho R, Raoult D, Fournier PE. Investigation of *Ctenocephalides felis* on domestic dogs and *Rickettsia felis* infection in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Zoonoses Public Health*. 2020;67:892-902. doi: 10.1111/zph.12776.
- 16: Diop A, El Karkouri K, Raoult D, Fournier PE. Genome sequence-based criteria for demarcation and definition of species in the genus *Rickettsia*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70:1738-1750. doi: 10.1099/ijsem.0.003963.
- 17: Lucchese L, Ravagnan S, Da Rold G, Toniolo F, Wurzbürger W, Mion M, Carminato A, Fournier PE, Capelli G, Natale A, Vascellari M. Survival of *Rickettsia conorii* in artificially contaminated whole and leukoreduced canine blood units during the storage period. *Parasit Vectors*. 2020;13:118. doi: 10.1186/s13071-020-3991-9.
- 18: Sadeddine R, Diarra AZ, Laroche M, Mediannikov O, Righi S, Benakhla A, Dahmana H, Raoult D, Parola P. Molecular identification of protozoal and bacterial organisms in domestic animals and their infesting ticks from north-eastern Algeria. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020;11:101330. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101330.
- 19: Loarte MDC, Melenotte C, Cassir N, Cammilleri S, Dory-Lautrec P, Raoult D, Parola P. *Rickettsia mongolitimonae* Encephalitis, Southern France, 2018. *Emerg Infect Dis*. 2020;26:362-364. doi: 10.3201/eid2602.181667.
- 20: Grouteau G, Lancelot O, Bertolotti A, Poubeau P, Manaquin R, Foucher A, Jaubert J, Parola P, Pagès F, Camuset G. Emergence of murine typhus in La Réunion, France, 2012-2017. *Med Mal Infect*. 2020;50:22-27. doi:10.1016/j.medmal.2019.06.003.
- 21: Eldin C, Parola P. Rickettsioses. *Rev Prat*. 2020;70:201-205.

6.2.3. Bartonella

- 22: Oumarou Hama H, Barbieri R, Guirou J, Chenal T, Mayer A, Ardagna Y, Signoli M, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. An outbreak of relapsing fever unmasked by microbial paleoserology, 16th century, France. *Am J Phys Anthropol*. 2020;173:784-789. doi: 10.1002/ajpa.24138.
- 23: Amanzougaghene N, Mediannikov O, Ly TDA, Gautret P, Davoust B, Fenollar F, Izri A. Molecular investigation and genetic diversity of *Pediculus* and *Pthirus* lice in France. *Parasit Vectors*. 2020;13:177. doi: 10.1186/s13071-020-04036-y.
- 24: Ly TDA, Amanzougaghene N, Hoang VT, Dao TL, Louni M, Mediannikov O, Gautret P. Molecular evidence of bacteria in clothes lice collected from homeless people living in shelters in Marseille. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2020;20:872-874. doi: 10.1089/vbz.2019.2603.

COMMUNICATIONS

En 2020, l'équipe du CNR, fortement impliquée par ailleurs dans le diagnostic et la prise en charge de la COVID-19, n'a participé à aucun congrès.

COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE 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 et 2018, 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 2019.

Par ailleurs, le CNR collabore avec le Dr Elsa JOURDAIN (INRA) au travers du projet Expaircox visant à étudier la séroprévalence des anticorps contre *Coxiella burnetii* des donneurs de sang de la région de Niort, où la fièvre Q présente une incidence élevée. Plusieurs séries de prélèvements ont été adressés au CNR par l'établissement français du sang (Dr Xavier LAFARGE) et feront l'objet d'analyses en 2021.

PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES

8.1. Démarche qualité

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 font l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC. Le rapport de cette visite ne nous a pour l'instant pas été communiqué. Un GBEA a été rédigé pour les activités de détection moléculaire.

8.2. Activité de recherche en 2020

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 poursuivra aussi les analyses pangénomiques des bactéries des genres *Rickettsia* et *Bartonella*.

L'étude ExpairCox sera poursuivie en 2021.

8.3. Activité d'expertise

En 2020, le CNR a poursuivi la comparaison avec la méthode de sérologie par microimmunofluorescence de kits sérologiques commercialisés pour le diagnostic de la fièvre Q. Les trois kits les plus utilisés par les laboratoires de CHU ou d'HIA effectuant les sérologies fièvre Q sont les kits Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA, Focus Q fever IgG et Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG.

8.3.1 Evaluation des kits diagnostiques en dépistage

Dans un premier temps nous avons utilisé les sérums de 76 patients dont 28 étaient atteints d'une forme focalisée persistante (chronique), 21 présentaient une fièvre Q aiguë, 18 avaient une cicatrice sérologique d'infection guérie et 9 étaient des témoins négatifs atteints d'autres pathologies. Chez les 67 patients atteints de fièvre Q, le diagnostic avait été confirmé par PCR spécifique. Les kits Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA et Focus Q fever IgG ont été évalués sur 16 patients et le kit Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG sur 60 patients.

Les dilutions de sérum utilisées étaient celles préconisées par les fabricants : 1/64 (IgG) et 1/24 (IgM) pour le kit Vircell IFA, 1/16 pour le kit Focus, et 1/32 pour le kit Vircell ELISA. Pour la technique d'immunofluorescence du CNR, la dilution utilisée était de 1/50. Les lames d'immunofluorescence ont été lues en parallèle par deux techniciens du CNR ayant une grande expérience en sérologie de la fièvre Q. Etaient considérés comme corrects les titres d'anticorps ayant au plus une dilution d'écart avec le titre obtenu par la méthode du CNR. Les positivités obtenues contre les antigènes de phases 1 et/ou 2 étaient considérées indistinctement comme positives. Pour les kits Focus Q fever IgG et Vircell Coxiella burnetii ELISA IgG, seuls les titres d'IgG ont été pris en compte pour les évaluations, ce qui ramène à 11 et 51 les nombres de vrais positifs et 5 et 9 les nombres de vrais négatifs, respectivement. Pour le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA, les titres IgG et IgM ont été pris en compte pour les évaluations, ce qui ramène à 11 et 8 les nombres de vrais positifs en IgG et IgM, respectivement, et 15 et 8 les nombres de vrais négatifs.

Tableau 6 : Comparaison du dépistage sérologique de la fièvre Q fait à l'aide des kits Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA, Focus Q fever IgG et Vircell Coxiella burnetii ELISA IgG, ainsi que la technique sérologique « maison » du CNR. La couleur jaune indique les résultats erronés de dépistage.

Patient	Résultats de la sérologie CNR						Immunoglobuline	Résultat Focus		Résultat Vircell IFA		Résultat Vircell ELISA
	IgG1	IgM1	IgA1	IgG2	IgM2	IgA2		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2	
1	0	0	0	0	0	0	IgG					Négatif
2	400	50	200	100	50	200	IgG					Positif faible
3	1600	0	0	800	0	0	IgG					Positif
4	3200	0	1600	1600	0	1600	IgG					Positif
5	1600	0	200	1600	0	200	IgG					Positif
6	0	0	0	0	0	0	IgG					Positif
7	200	0	400	100	0	400	IgG					Positif
8	100	1600	0	0	1600	0	IgG					Négatif
9	400	0	800	400	0	800	IgG					Positif
10	800	0	400	800	0	200	IgG					Positif
11	400	800	0	400	400	0	IgG					Positif
12	1600	800	0	1600	800	0	IgG					Positif
13	200	800	0	200	800	0	IgG					Positif
14	0	800	0	0	800	0	IgG					Négatif
15	800	800	200	800	800	200	IgG					Positif
16	1600	0	0	1600	0	0	IgG					Positif
17	800	1600	0	800	1600	0	IgG					Positif
18	200	800	0	200	800	0	IgG					Négatif
19	0	800	0	0	800	0	IgG					Négatif
20	0	0	0	0	0	0	IgG					Positif
21	0	0	0	0	0	0	IgG					Négatif
22	0	0	0	0	0	0	IgG					Négatif
23	0	0	0	0	0	0	IgG					Négatif
24	400	0	0	200	0	0	IgG					Positif faible
25	6400	0	3200	6400	0	3200	IgG					Positif
26	800	0	0	800	0	0	IgG					Négatif
27	400	0	0	100	0	0	IgG					Négatif
28	200	0	0	100	0	0	IgG					Négatif
29	400	0	800	200	0	800	IgG					Positif
30	25600	0	100	25600	0	100	IgG					Positif
31	800	0	0	100	0	0	IgG					Positif
32	200	50	0	200	50	0	IgG					Positif
33	100	0	0	100	0	0	IgG					Positif
34	800	0	50	800	0	50	IgG					Positif
35	200	0	0	200	0	0	IgG					Positif
36	400	0	0	400	0	0	IgG					Positif
37	800	200	0	800	200	0	IgG					Positif
38	200	100	0	200	100	0	IgG					Positif
39	3200	0	50	3200	0	50	IgG					Positif
40	1600	0	0	1600	0	0	IgG					Négatif
41	800	0	0	800	0	0	IgG					Positif
42	0	0	0	0	0	0	IgG					Négatif
43	200	0	0	200	0	0	IgG					Positif
44	400	0	50	400	0	50	IgG					Positif
45	400	0	0	200	0	0	IgG					Négatif
46	400	0	0	200	0	0	IgG					Positif
47	100	0	0	100	0	0	IgG					Positif
48	6400	0	100	6400	0	100	IgG					Négatif
49	3200	0	1600	3200	0	1600	IgG					Positif
50	800	0	0	800	0	0	IgG					Positif
51	100	0	0	100	0	0	IgG					Négatif
52	12800	0	200	12800	0	200	IgG					Positif faible
53	800	0	200	800	0	200	IgG					Positif
54	3200	0	1600	1600	0	1600	IgG					Positif
55	6400	0	3200	6400	0	3200	IgG					Positif
56	25600	0	100	25600	0	100	IgG					Positif
57	3200	0	50	3200	0	50	IgG					Négatif
58	6400	0	100	6400	0	100	IgG					Positif faible
59	3200	0	1600	3200	0	1600	IgG					Négatif
60	800	0	200	800	0	200	IgG					Positif
61	400	100	0	400	100	0	IgG	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	
62	3200	0	200	800	0	200	IgM			Négatif	Positif faible	
							IgG	Positif	Positif	Positif	Positif	
63	3200	0	0	3200	0	0	IgM			Positif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Positif	Positif	
64	3200	0	200	3200	0	300	IgM			Positif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Positif	Positif	
65	0	200	0	0	200	0	IgM			Positif faible	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Positif	
66	100	100	0	100	50	0	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Positif	
67	200	400	0	200	400	0	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Négatif	Positif	Positif	Positif	
68	100	0	0	100	0	0	IgM			Positif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Positif	
69	100	0	0	100	0	0	IgM			Négatif	Négatif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Négatif	
70	400	0	0	400	0	0	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Positif	
71	0	50	400	0	50	400	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Négatif	Positif	
72	1600	400	800	1600	400	800	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Positif	Positif	Positif	Négatif	
73	0	100	0	0	100	0	IgM			Positif	Positif	
							IgG	Fluorescence sans bactéries	Fluorescence sans bactéries	Négatif	Positif	
74	1600	400	100	1600	400	100	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Fluorescence sans bactéries	Fluorescence sans bactéries	Négatif	Positif	
75	0	0	0	0	0	0	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Négatif	Négatif	Négatif	Positif	
76	0	0	0	0	0	0	IgM			Négatif	Positif	
							IgG	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	

Tableau 6 : Comparaison du dépistage sérologique de la fièvre Q fait à l’aide des kits Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA, Focus Q fever IgG et Vircell Coxiella burnetii ELISA IgG, ainsi que la technique sérologique « maison » du CNR. La couleur jaune indique les résultats erronés de dépistage.

Les résultats du dépistage montrent qu'en dépistage IgG, le kit Focus, ne détectant que les IgG de phases 1 et 2, était en désaccord avec le CNR dans deux des 11 patients positifs et deux des cinq patients négatifs. Pour deux prélèvements une fluorescence aspécifique a été obtenue et considérée comme négative. Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative étaient respectivement de 81.8%, 60%, 81.8% et 60%.

En dépistage IgG, le kit Vircell *Coxiella burnetii* ELISA IgG était en désaccord avec le CNR dans 11 des 51 patients positifs et deux des neuf patients négatifs. Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative étaient respectivement de 90.9%, 5%, 71.4% et 50%.

En dépistage IgG, le kit Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA était en désaccord avec le CNR dans 1 des 11 patients positifs et quatre des cinq patients négatifs. Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative étaient respectivement de 78.4%, 77.8%, 95.2% et 38.9%.

En dépistage IgM, le kit Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA était en désaccord avec le CNR dans 1 des 11 patients positifs et quatre des cinq patients négatifs. Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative étaient respectivement de 100%, 25%, 57.1% et 100%.

8.3.2 Evaluation des kits en quantification

En quantification, nous avons testé les kits Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA et Focus Q fever IgG. Nous avons utilisé les sérums de 70 patients dont 33 étaient atteints d'une forme focalisée persistante (chronique), 21 présentaient une fièvre Q aigüe, 15 avaient une cicatrice sérologique d'infection guérie et 1 était un témoin négatif atteint d'endocardite à *Streptococcus gallolyticus*. Chez les 69 patients atteints de fièvre Q, le diagnostic avait été confirmé par PCR spécifique. Les kits Focus Q fever IgG et Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA ont été évalués sur 51 et 32 des 70 patients, respectivement.

Pour les deux kits, les dilutions de sérum utilisées étaient des dilutions de 2 en 2 de 1/64 à 1/4096. Les sérums étant positif à la dilution 1/4096 ont fait l'objet de dilutions supplémentaires jusqu'à négativation de la fluorescence. Pour la technique d'immunofluorescence du CNR, les dilutions de 2 en 2 ont été poussées du 1/50 au 1/6400. Les lames d'immunofluorescence ont été lues en parallèle par deux techniciens du CNR ayant une grande expérience en sérologie de la fièvre Q. Étaient

considérés comme corrects les titres d'anticorps ayant au plus une dilution d'écart avec le titre obtenu par la méthode du CNR.

Tableau 7 : Comparaison des taux d'anticorps contre *C. burnetii* obtenus à l'aide des kits Focus Q fever IgG, Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA, ainsi que la technique sérologique « maison » du CNR. La couleur jaune indique des taux d'anticorps supérieurs d'au moins deux dilutions, alors que la couleur verte indique des taux d'anticorps inférieurs d'au moins deux dilutions.

Patient	Résultats de la sérologie CNR						Immunoglobuline	Résultat Focus		Résultat Vircell IFA	
	IgG1	IgM1	IgA1	IgG2	IgM2	IgA2		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
1	400	0	0	200	0	0	IgG	1024	512		
2	6400	0	3200	6400	0	3200	IgG	16384	16384		
3	800	0	0	800	0	0	IgG	2048	1024		
4	400	0	0	100	0	0	IgG	1024	1024		
5	200	0	0	100	0	0	IgG	1024	128		
6	400	0	800	200	0	800	IgG	1024	1024		
7	25600	0	100	25600	0	100	IgG	16384	16384		
8	800	0	0	100	0	0	IgG	1024	1024		
9	800	0	0	100	0	0	IgG	8192	2048		
10	200	50	0	200	50	0	IgG	128	128		
11	100	0	0	100	0	0	IgG	512	512		
12	800	0	50	800	0	50	IgG	512	2048		
13	200	0	0	200	0	0	IgG	1024	1024		
14	400	0	0	400	0	0	IgG	1024	1024		
15	800	200	0	800	200	0	IgG	512	2048		
16	200	100	0	200	100	0	IgG	128	512		
17	3200	0	50	3200	0	50	IgG	16384	16384		
18	1600	0	0	1600	0	0	IgG	1024	4096		
19	800	0	0	800	0	0	IgG	512	2048		
20	3200	0	1600	1600	0	1600	IgG	4096	4096		
21	200	0	400	100	0	400	IgG	1024	1024		
22	400	0	800	400	0	800	IgG	2048	512		
23	800	0	400	800	0	200	IgG	2048	2048		
24	1600	800	0	1600	800	0	IgG	8192	1024		
25	200	800	0	200	800	0	IgG	16384	2048		
26	0	800	0	0	800	0	IgG	128	Négatif		
27	200	800	0	200	800	0	IgG	1024	64		
28	200	0	0	200	0	0	IgG	4096	1024		
29	400	0	50	400	0	50	IgG	8192	1024		
30	400	0	0	200	0	0	IgG	4096	4096		
31	400	0	0	200	0	0	IgG	4096	2048		
32	100	0	0	100	0	0	IgG	1024	512		
33	6400	0	100	6400	0	100	IgG	65536	16384		
34	3200	0	1600	3200	0	1600	IgG	65536	65536		
35	800	0	0	800	0	0	IgG	8192	8192		
36	100	0	0	100	0	0	IgG	1024	1024		
37	12800	0	200	12800	0	200	IgG	65536	65536		
38	800	0	200	800	0	200	IgG	8192	8192		
39	400	100	0	400	100	0	IgG	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
40	3200	0	200	800	0	200	IgG	4096	4096	2048	2048
41	3200	0	0	3200	0	0	IgG	4096	4096	2048	1024
42	3200	0	200	3200	0	200	IgG	4096	1024	2048	512
43	1600	0	0	800	0	0	IgG	1024	4096	Négatif	4096
44	800	0	0	800	0	0	IgG	2048	512	1024	512
45	400	0	0	400	0	0	IgG	Négatif	512	Négatif	512
46	800	0	50	800	0	0	IgG	1024	2048	512	256
47	3200	0	50	1600	0	200	IgG	4096	4096	4096	4096
48	0	200	0	0	200	0	IgM	Négatif		256	256
49	200	50	0	200	50	0	IgG	128	1024	Négatif	1024
							IgM			64	64
50	100	100	0	100	50	0	IgG	64	512	Négatif	512
							IgM			Négatif	256
51	100	100	0	100	50	0	IgG	Négatif	512	128	1024
52	400	200	200	400	200	200	IgG			512	512
							IgM			64	Négatif
							IgA			512	512
53	3200	0	1600	1600	0	1600	IgG			4096	4096
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			1024	1024
54	1600	0	200	1600	0	200	IgG			1024	1024
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
55	0	0	0	0	0	0	IgG			Négatif	Négatif
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
56	200	0	400	100	0	400	IgG			128	256
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			256	256
57	400	0	800	400	0	800	IgG			128	128
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			1024	1024
58	800	0	400	800	0	200	IgG			1024	1024
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			256	64
59	0	1600	0	0	1600	0	IgG			Négatif	Négatif
							IgM			Négatif	512
							IgA			Négatif	Négatif
60	1600	0	0	800	0	0	IgG			512	512
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
61	400	800	0	400	400	0	IgG			Négatif	512
							IgM			Négatif	2048
							IgA			Négatif	Négatif
62	1600	800	0	1600	800	0	IgG			Négatif	1024
							IgM			2048	512
							IgA			Négatif	Négatif
63	200	800	0	200	800	0	IgG			512	512
							IgM			512	2048
							IgA			Négatif	Négatif
64	800	800	0	800	800	0	IgG			Négatif	2048
							IgM			1024	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
65	1600	0	0	1600	0	0	IgG			2048	2048
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
66	800	1600	0	800	1600	0	IgG			1024	1024
							IgM			2048	4096
							IgA			Négatif	Négatif
67	3200	0	0	1600	0	0	IgG			4096	4096
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
68	800	0	0	800	0	0	IgG			1024	1024
							IgM			Négatif	Négatif
							IgA			Négatif	Négatif
69	0	800	0	0	800	0	IgG			Négatif	Négatif
							IgM			2048	1024
							IgA			Négatif	Négatif
70	0	50	200	0	50	200	IgG			Négatif	Négatif
							IgM			64	64
							IgA			512	512

La quantification des IgG de phase 1 avec le kit Focus Q fever IgG était concordante avec les résultats du CNR chez 28 des 51 patients testés (54.9%). Pour 19 patients (37.2%), le taux détecté était supérieur d'au moins deux dilutions et, pour quatre patients, inférieur d'au moins deux dilutions (7.8%).

La quantification des IgG de phase 2 avec le kit Focus Q fever IgG était concordante avec les résultats du CNR chez 25 des 51 patients testés (49%). Pour 25 patients (49%), le taux détecté était supérieur d'au moins deux dilutions et, pour un patient, inférieur d'au moins deux dilutions (2%).

La quantification des IgG de phase 1 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 25 des 32 patients testés (78.1%). Pour 7 patients, le taux détecté était inférieur d'au moins deux dilutions (21.9%).

La quantification des IgG de phase 2 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 24 des 32 patients testés (75%). Pour sept patients (21.9%), le taux détecté était supérieur d'au moins deux dilutions, et pour un patient inférieur d'au moins deux dilutions (3.1%).

La quantification des IgM de phase 1 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 19 des 20 patients testés (95%). Pour un patient, le taux détecté était inférieur d'au moins deux dilutions (5%).

La quantification des IgM de phase 2 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 17 des 20 patients testés (85%). Pour un patient, le taux détecté était supérieur d'au moins deux dilutions (5%) et, pour deux patients, inférieur d'au moins deux dilutions (10%).

La quantification des IgA de phase 1 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 17 des 19 patients testés (89.5%). Pour deux patients, le taux détecté était inférieur d'au moins deux dilutions (10.5%).

La quantification des IgA de phase 2 avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA était concordante avec les résultats du CNR chez 18 des 19 patients testés (94.7%). Pour un patient, le taux détecté était inférieur d'au moins deux dilutions (5.3%).

1.3.1. Conclusions

Les tests de dépistage ont mis en évidence que Le kit Vircell Coxiella burnetii ELISA IgG avait la meilleure sensibilité (90.9%) pour les IgG, mais une faible spécificité (5%).

La meilleure combinaison sensibilité/spécificité a été obtenue avec le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA (78.4%/77.8%).

Pour ce qui est de la quantification, le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA a démontré une meilleure concordance pour les IgG avec les résultats du CNR que le kit Focus Q fever IgG, à la fois pour la phase 1 et la phase 2. Cette différence est liée au fait que 37.2% et 49% des titres étaient surévalués par le kit Focus Q fever IgG en phases 1 et 2, respectivement, alors que le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA a sous-évalué les titres de phase 1 de 21.9% et surévalué les titres en phase 2 de 21.9%.

Par ailleurs, le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA a démontré une concordance de 85 à 95% avec le CNR pour les titres IgM et IgA, en phases 1 et 2.

En conclusion, le kit Vircell Coxiella burnetii I+II IFA IgG/IgM/IgA est celui qui a présenté la meilleure concordance avec la méthode d'immunofluorescence « maison » du CNR, à la fois en dépistage et en quantification.

ANNEXES 2020

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

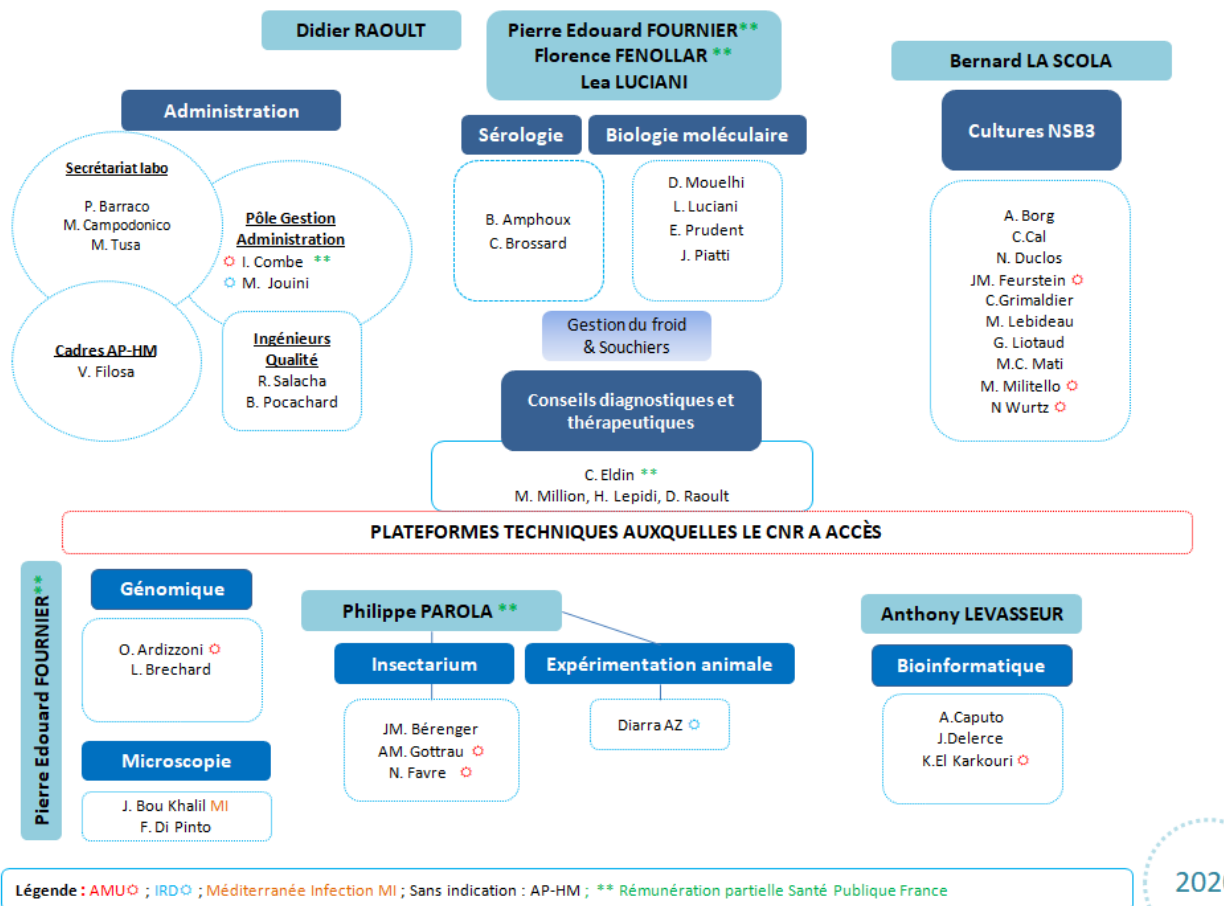
Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* (CNR), créé en 1985, a vu son agrément renouvelé par le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé pour la période du 1^{er} janvier 2017 au 31 décembre 2021 (JORF n°0058 du 09-03-2017, texte n°20). Le CNR reçoit plus de **20 000** prélèvements (sérums, 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

Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*



1.3 L'équipe impliquée dans les activités du CNR

Enseignants chercheurs et chercheurs

Nom	Prénom	Tutelle	Fonction
ELDIN	Carole	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
FOURNIER	Pierre-Edouard	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur, directeur
FENOLLAR	Florence	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LA SCOLA	Bernard	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LEPIDI	Hubert	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LEVASSEUR	Anthony	AMU	Enseignant-Chercheur
LUCIANI	Lea	AMU	Enseignant-Chercheur
MILLION	Matthieu	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
PAROLA	Philippe	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
RAOULT	Didier	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur, directeur adjoint

Ingénieurs et équipe technique

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
AMPHOUX	Bernard	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien Sérologie
ARDIZZONI	Olivia	AMU	Technicienne plateforme génomique
BERENGER	Jean-Michel	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien animalerie – insectarium
BORG	Audrey	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
BOU KHALIL	Jacques	Fondation Méditerranée Infection	Ingénieur de Recherche en Microscopie et Cytométrie
BRECHARD	Ludivine	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Plateforme génomique
BROSSARD	Catherine	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne Sérologie
CAL	Céline	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
CAPUTO	Aurélie	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en Bioinformatique
DECLOQUEMENT	Philippe	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Plateforme protéomique
DELERCE	Jérémie	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en Bioinformatique
DIARRA	Adama Zan	IRD	Ing Recherche Plateforme animalerie/insectarium

DI PINTO	Fabrizio	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en microscopie électronique
DUCLOS	Nathalie	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
EL KARKOURI	Khalid	AMU	Ingénieur Recherche en Bioinformatique
FEUERSTEIN	Jean-Marc	AMU	Technicien fonctionnement NSB3
GOTTRAU	Anne-Marie	AMU	Aide Technique en animalerie
GRIMALDIER	Clio	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
LE BIDEAU	Marion	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
LIAUTAUD	Gilles	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien cultures cellulaires NSB3
MASOTTI	Noëlle	AMU	Aide Technique en animalerie /insectarium
MATI	Marie-Charlotte	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
MILITELLO	Muriel	AMU	Inge Etude en Techniques Biologiques NSB2/NSB3
MOUELHI	Dounia	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne en biologie moléculaire
PIATTI	Julie	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne en biologie moléculaire
POCACHARD	Bérangère	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Qualité
PRUDENT	Elsa	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur plateforme
SALACHA	Richard	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Qualité
WURTZ	Nathalie	AMU	Ingénieur Responsable laboratoire NSB3

AMU : Aix-Marseille Université ; FMI : Fondation Méditerranée Infection ; AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille ; IRD : Institut de Recherche pour le Développement

Equipe administrative

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
BARRACO	Priscilla	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire
COMBE	Isabelle	AMU	Cadre administrative recherche
FILOSA	Véronique	CHU MARSEILLE - APMH	Cadre laboratoires
JOUINI	Manel	IRD	Cadre gestionnaire recherche
PATTI	Gwendoline	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire
TUSA	Marie	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire

AMU : Aix-Marseille Université ; IRD : Institut de Recherche pour le Développement

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. Le Pr La Scola est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous les références ADE-083212017-7 et ADE-083222017-8, respectivement).

1.4. Locaux et équipements



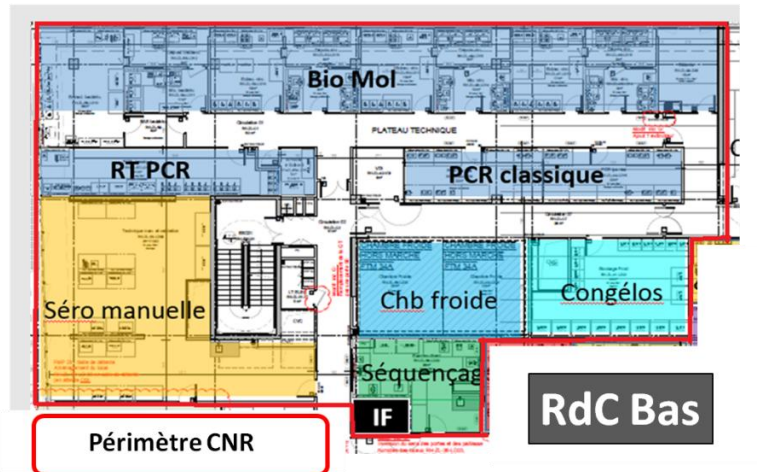
Depuis janvier 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est localisé dans les locaux de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée-Infection. Cet institut dédié à la prise en charge et à l'étude des maladies infectieuses comporte :

- 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.
- Quatre unités de recherche dont **MEPHI D-258** (Microbes Evolution Phylogénie et Infections) et **VITROME D-257** (Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes) issues de l'ancienne UMR URMITE et validées par l'HCERES pour le contrat d'établissement 2018-2022. Et les UMR **UVE D-190** (Unité des Virus Emergents), et **1252-SESSTIM** (Sciences Economiques et Sociales de la Santé et Traitement de l'Information Médicale).
- Des plateformes de culturomique, génomique, microscopie électronique, protéomique, un insectarium, une biobanque et un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 de 1000 m² divisé en 4 modules de 250 m².
- Les CNR des Arbovirus (Isabelle Leparc-Goffart), CNR Paludisme (Bruno Pradines) et le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*.
- Le Centre de Référence pour la prise en charge des Maladies Vectorielles à Tiques de la Région Sud (CRMVT Sud), créé en 2020.

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).

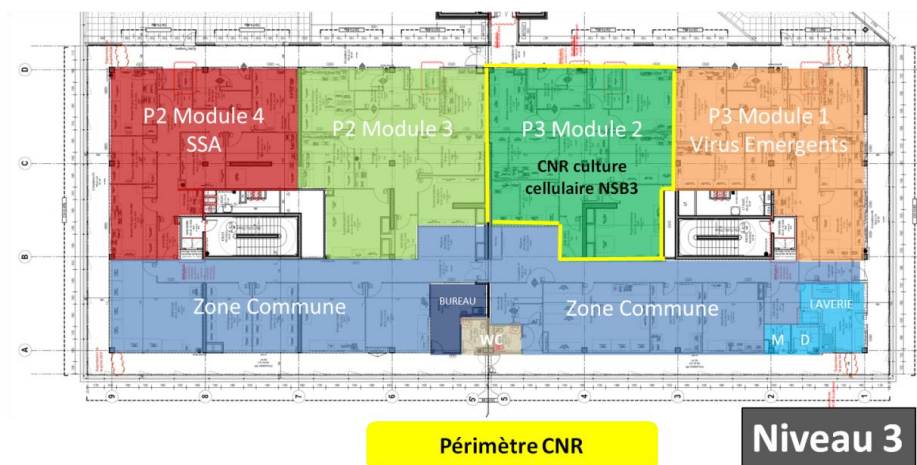
1.5. Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR

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).



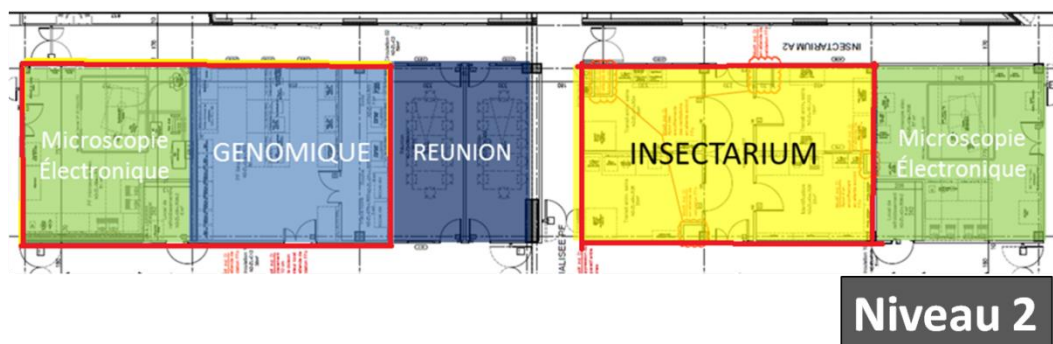
1.3.1. Les activités de culture du CNR

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



1.3.2. Les Plateformes

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



1.3.3. 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
- Un spotter d'antigènes pour la préparation des lames de sérologie
- Un automate à Western blot Jess (Protein Simple, San Jose, CA, USA)
- 2 microscopes à fluorescence (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)

2. Biologie moléculaire – séquençage génomique

- 4 séquenceurs à haut débit MiSeq (Illumina)
- 2 séquenceurs à haut débit GridION (Oxford Nanopore)
- 1 séquenceur à haut débit PromethION (Oxford Nanopore)
- 2 séquenceurs 3500XL (Applied Biosystem)
- 10 Thermocyclers conventionnels (Applied biosystems, Eppendorf, Biometra)
- 10 thermocycleurs en temps réel LC480 (Roche)
- 10 extracteurs d'ADN EZ-One (QIAGEN)
- 5 broyeur Fastprep
- 1 bain sec
- 1 Hydroshear (GeneMachines)
- 7 hottes BIOCAP DNA (Bioblock)
- 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)
- 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

- Lyophilisateur 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 CO₂
- 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. Microscopes 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)
- microscope électronique à balayage TM4000+ (Hitachi)

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)
- Spectromètre 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)

6. 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. Vingt imprimantes laser-réseau sont réparties sur tout le laboratoire.

Les séquenceurs disposent chacun d'un ordinateur et d'une imprimante couleur, les thermocycleurs LC480 sont chacun équipés d'un ordinateur.

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

1 serveur de sauvegarde est à disposition sur le réseau, d'une capacité de 15 To, chaque utilisateur a 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.

1.3.4 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". En 2020, un Ingénieur de recherche de l'IRD, M Adama Zan Diarra, a été recruté pour superviser la plateforme.

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, Ingénieur)

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)
- microscope électronique à balayage TM4000+ (Hitachi)

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 2020, 2000 génomes bactériens ont été séquencés par le laboratoire. Parmi ceux-ci, 16 souches de *Coxiella burnetii*, 5 souches de *Rickettsia* et 33 souches de *Bartonella*.

D. Plateforme Bioinformatique

(Responsable : Anthony Levasseur, PU)

Depuis juin 2006, le CNR a constitué une plateforme de bioinformatique, composée de 3 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 :

1- 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.

2- 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, ...).

3- 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 du CNR dans une réunion hebdomadaire de génomique et la valorisation de ces résultats par la participation aux publications (voir publications).

1.6. 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., *Coxiella burnetii*, *ehrlichiae*.

A ce jour, plus de 15000 souches bactériennes sont conservées. L'importance de cette collection, la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies: (CSUR, WDCM 875, <https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/collection-de-souches/>), est d'autant plus grande que la majorité de ces souches est unique. Cette collection conserve actuellement 663 souches de *Bartonella*, 231 souches de *Rickettsia* et 355 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, dont des pathogènes humains (*R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*) 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 s'est doté en 2018 d'une biobanque automatisée permettant de stocker 1 million d'échantillons et souches à -80°C et 2 millions à -20°C. La

biobanque automatisée a été mise en fonction en 2020. Les souches sont également conservées en azote gazeux à -196°C et sous forme lyophilisée à -20°C. Chaque appareil de congélation est équipé d'un système d'alarme visuelle et sonore qui envoie en cas de problème un message d'alarme aux agents de sécurité de l'IHU. De plus, les tubes dans lesquels sont 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 est dédiée à la biobanque robotisée au sous-sol 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 de souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR) est riche de plus de mille souches de bactéries intra-cellulaires. Deux techniciens, Mrs Amael Fadlane et Stéphane Alibar, sont responsables de l'entretien du souchier, sous la responsabilité du Pr Fournier. La CSUR a accès au laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 de l'IHU. Le Pr La Scola est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous les références ADE-083212017-7 et ADE-083222017-8, respectivement).

C.1. Protocoles de conservation

Les souches cultivées en laboratoire NSB3 sont conservées selon trois modes 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.2. La collection CSUR

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 (<https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/collection-de-souches/>).

La CSUR est l'une des rares collections dans le monde avec l'American Type Culture Collection et la DSMZ qui accepte les bactéries intracellulaires strictes. Actuellement, **231 souches de *Rickettsia*, 355 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. 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 (<https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/>). 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
<u>Bartonella</u>	<i>alsatica</i>	1
	<i>australis</i>	10
	<i>bacilliformis</i>	1
	<i>birtlesii</i>	5
	<i>bovis</i>	34
	<i>capreoli</i>	1
	<i>chomelii</i>	1
	<i>clarridgeiae</i>	27
	<i>coopersplainensis</i>	1
	<i>doshiae</i>	1
	<i>elizabethae</i>	1
	<i>florenciae</i>	2
	<i>grahamii</i>	1
	<i>henselae</i>	91
	<i>koehlerae</i>	2
	<i>massiliensis</i>	2
	<i>phoceensis</i>	1
	<i>queenslandensis</i>	5
	<i>quintana</i>	433
	<i>rattaustraliani</i>	5
	<i>rattimassiliensis</i>	9
	<i>senegalensis</i>	3

	<i>schoenbuchensis</i>	17
	<i>taylorii</i>	1
	<i>tribocorum</i>	23
	<i>vinsonii</i>	3
	<i>weissi</i>	4
<u><i>Coxiella</i></u>	<i>burnetii</i>	355
<u><i>Rickettsia</i></u>	<i>aeschlimannii</i>	7
	<i>africae</i>	36
	<i>akari</i>	1
	<i>amblyommatis</i>	1
	<i>argasii</i>	1
	<i>asiatica</i>	5
	<i>australis</i>	1
	<i>bellii</i>	1
	<i>canadensis</i>	1
	<i>conorii</i>	90
	<i>felis</i>	3
	<i>gravesii</i>	1
	<i>heilongjiangensis</i>	2
	<i>helvetica</i>	4
	<i>honei</i>	2
	<i>japonica</i>	3
	<i>massiliae</i>	7
	<i>montanensis</i>	1
	<i>parkeri</i>	2
	<i>raoultii</i>	8
	<i>rhipicephali</i>	1
	<i>sibirica</i>	15

	<i>slovaca</i>	33
	<i>sp.</i>	2
	<i>tamurae</i>	1
	<i>typhi</i>	1
<u><i>Orientia</i></u>	<i>tsutsugamushi</i>	4

CSUR

Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies

WDCM 875

Professeur Didier RAOULT

Directeur

IHU Méditerranée-Infection

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: ▼

	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				1	
2				1	
Total:					

Please fax (33 (0)413 732 402) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)



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** or **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) 4 13 73 24 02) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

1.6. 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 2012) sous la référence 8-3446. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC (rapport d'activités SH-10-0469-1 v00). Un GBEA a été rédigé pour les activités de détection moléculaire.

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 2012) sous la référence 8-3446. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC (rapport d'activités SH-10-0469-1 v00).

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 pannels 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 est 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 LC480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). 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 des *Rickettsia* 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 CIBLE	NOM	SEQUENCES	TAILLE	DILUTION	AMPLICO
BARTONELLA						
Toutes Bartonella	ITS	Barto ITS3 F	GATGCCGGGGAAGGTTTTC	19		104 pdb
	1ère intention	Barto ITS3 R	GCCTGGGAGGACTTGAACCT	20		
		Barto ITS3 P	6FAM- GCGGCGCGCTTGATAAGCGTG	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	TATGCCTTATGTGTGCTGGTGGT	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	GGTGTCTGGACAAAAGAGCGA	20		151 pdb
	2ème intention	GROEL 643R	TTGCTCCACCAACACGGATA	20		
		GROEL P 493F/643R	6FAM- AATTGCAAGAAGACTTGCT	20		
Bartonella quintana	yopP	B qui 11580F	TAAACCTCGGGGGAAGCAGA	20		134 pdb
	1ère intention	B qui 11580R	TTTCGTCTCAACCCCATCA	20		
		B qui 11580P	6FAM- CGTTGCCGACAAGACGTCTCTGC	23		
	fabF3	B qui 05300F	GCTGGCCTTGCTCTTGATGA	20		139 pdb
		B qui 05300R	GCTACTCTGCTGCTCTGGA	20		
		B qui 05300P	6FAM- TGCAGCAGGTGGAGGAGAACGTG	23		
COXIELLA						
Coxiella burnetii	hypothetical p.	IS30a 3F	CGCTGACCTACAGAAATATGTCC	23		164 pdb
	1ère intention	IS30a 3R	GGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG	25		
		IS30a F3-R3 P	6FAM- CATGAAGCGGATTATCAATACGTGTATGC	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	TTTGATTTCGGGGTCGAAAAA	20		121 pdb
	1ère intention	A_pha0001R	AACGCTTCAACAGCCTCAGC	20		
		A_pha0001P	6FAM- TCGCCCTAAAGCACCAGAGGATCTG	25		
	gatA	A_pha0748F	CGCACTACCGCATGCTCTG	19		129 pdb
		A_pha0748R	AGCCCATGGCAAATTCATCC	20		
		A_pha0748P	6FAM- TGCTTGCATGATGGGAAATTGAACA	26		
	orf 1395	A_pha1395F	CAGAAGAACCAGCGGATA	20		138 pdb
		A_pha1395R	TCGACGTAGGTGAGCTGCAA	20		
		A_pha1395P	6FAM- TGACCAAAGATGCACATGGTGACA	25		
Ehrlichia canis	taoredoxin related	E_can0701F	TGAGGCCATTAAAGAATTCACAA	23		113 pdb
	1ère intention	E_can0701R	TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATT	25		
		E_can0701P	6FAM- AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA	23		
	hyp. p.	E_can0503F	CAGCAAATTCCAATCTGCACTTC	23		146 pdb
		E_can0503R	GAGCTTCCAATTGATGGGTCTG	22		
		E_can0503P	6FAM- TGTTATCTAATGCAAAAATCCCGGCA	27		
Neorickettsia sennetsu	gltA	gltA sennetsu F	GGCTACAGCTAGTTTATGGGG	21		166 pdb
		gltA sennetsu R	AGTTTTTATACACCTGTGCCC	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.

Annexe 3 : Autres Informations

Déclaration Publique d'Intérêts

FOURNIER PIERRE-EDOUARD

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

Déclaration Publique d'Intérêts

Le **22/12/2019 12:19:59**

Je soussigné(e) **FOURNIER PIERRE-EDOUARD**

Reconnais avoir pris connaissance de l'obligation de déclarer tout lien d'intérêts, direct ou par personne interposée, que j'ai ou ai eu au cours des cinq dernières années, avec les entreprises, établissements ou organismes dont les activités, les techniques et les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes au sein duquel/desquels j'exerce mes fonctions ou ma mission, ou de l'instance/des instances collégiale(s), commission(s), conseil(s), groupe(s) de travail dont je suis membre ou auprès duquel/desquels je suis invité(e) à apporter mon expertise, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les mêmes secteurs.

Il m'appartient, à réception soit de l'ordre du jour de chaque réunion pour laquelle je suis sollicité(e), soit de l'expertise que l'organisme souhaite me confier, de vérifier si l'ensemble de mes liens d'intérêts sont compatibles avec ma présence lors de tout ou partie de cette réunion ou avec ma participation à cette expertise. En cas d'incompatibilité, il m'appartient d'en avertir l'interlocuteur désigné au sein de l'institution et, le cas échéant, le président de séance avant sa tenue. En cas de conflits d'intérêts, ma présence est susceptible d'entacher d'irrégularité les décisions, recommandations, références ou avis subséquents et d'entraîner leur annulation.

J'indique mon numéro RPPS (répertoire partagé des professionnels de santé), si je suis un professionnel de santé : 10003374542

Je m'engage à actualiser ma DPI à chaque modification de mes liens d'intérêts. En l'absence de modification, je suis tenu(e) de vérifier ma DPI au minimum annuellement.

Article L. 1454-2 du code de la santé publique : « Est puni de 30 000 euros d'amende le fait pour les personnes mentionnées au I et II de l'article L. 1451-1 et à l'article L. 1452-3 d'omettre, sciemment, dans les conditions fixées par ce même article, d'établir ou de modifier une déclaration d'intérêts afin d'actualiser les données qui y figurent ou de fournir une information mensongère qui porte atteinte à la sincérité de la déclaration. »

Liste des missions/fonctions

Institution :

Santé Publique France (SPF)

Instance:

RESPONSABLES CNR MANDAT 2017-2022

Mandat :

Autre - Non renseignée

1. Activité(s) principale(s), rémunérée(s) ou non, exercée(s) actuellement et au cours des 5 dernières années, à temps plein ou à temps partiel

Activité(s) salariée(s)

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Adresse : 58 Boulevard Charles Livon 13284 MARSEILLE 07 FRANCE

Fonction : Professeur des Universités

Période : 01/09/2008 à aujourd'hui

Spécialité : Microbiologie Clinique

Lieu d'exercice : IHU Méditerranée-Infection 13005 MARSEILLE 05 FRANCE

2. Activité(s) exercée(s) à titre secondaire

2.1. Participation à une instance décisionnelle d'un organisme public ou privé dont l'activité, les techniques ou les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

COMITÉ DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DES HÔPITAUX DE L'AP-HM

Fonction occupée : Président

Rémunération : aucune

Période : 03/2010 - 03/2016

2.2. Activité(s) de consultant, de conseil ou d'expertise exercée(s) auprès d'un organisme public ou privé entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

HCERES

Fonction occupée : Membre de jury HCERES

Sujet : Evaluation de l'unité de recherche IRSD du Pr Nathalie VERGNOLLE

Rémunération : Au déclarant

Montant perçu (Déclarant) : Total 200 euros

Période : 25/11/2019 - 27/11/2019

HCERES

Fonction occupée : Jury d'évaluation d'unité de recherche

Sujet : Evaluation de l'unité 'infection et inflammation' du Pr Jean-Louis HERRMANN

Rémunération : Au déclarant

Montant perçu (Déclarant) : Total 200 euros

Période : 25/11/2018 - 26/11/2018

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.3.2 Autres travaux scientifiques

HAUT COMITÉ DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Sujet : Recommandations nationales - Recommandations sur la prévention et la prise en charge de la fièvre Q en France - Rédaction de Recommandations sur la fièvre Q

Rémunération : aucune

Période : 05/2012 - 10/2013

2.4. Rédaction d'article(s) et intervention(s) dans des congrès, conférences, colloques, réunions publiques diverses ou formations organisés ou soutenus financièrement par des entreprises ou organismes privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.4.1 Rédaction d'article(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4.2 Intervention(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.5. Invention ou détention d'un brevet ou d'un produit, procédé ou toute autre forme de propriété intellectuelle non brevetée en relation avec le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

3. Direction d'activités qui ont bénéficié d'un financement par un organisme à but lucratif dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

4. Participations financières directes, sous forme d'actions ou d'obligations détenues et gérées directement ou de capitaux propres dans le capital d'une société dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

5. Proches parents ayant des activités ou des intérêts financiers dans toute structure dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

6. Fonctions et mandats électifs exercés actuellement

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

7. Autre lien, dont vous avez connaissance, qui est de nature à faire naître des situations de conflits d'intérêts

☒ Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique