

**Rapport annuel d'activité**

**2018**

**Centre National de Référence  
des Corynebactéries du complexe  
*diphtheriae***



**Année d'exercice**

**2017**

## TABLE DES MATIERES

Résumé analytique .....	5
Analytical summary .....	6
1. Missions et organisation du CNR .....	7
2. Activités d'expertise .....	7
2.1 Évolutions des techniques en 2017 .....	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....	8
2.4 Collections de matériel biologique .....	8
2.5 Activités d'expertise .....	8
2.5.1 Nombre d'échantillons reçus et analysés en 2017 .....	8
2.6 Activités de séquençage .....	9
3. Activités de surveillance .....	11
3.1 Description du réseau de partenaires .....	11
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	11
3.2.1 Isolats porteurs du gène <i>tox</i> ( <i>tox+</i> ) .....	11
3.2.2 Isolats non porteurs du gène <i>tox</i> ( <i>tox-</i> ) .....	12
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	13
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux. ....	16
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....	16
4. Alerte .....	16
5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	16
5.1 Conseils et expertise aux professionnels de santé .....	16
5.2 Conseils et expertise aux autorités sanitaires.....	17
5.3 Conseils et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...) .....	17
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR .....	18
6.1 Activités de recherche en cours .....	18
6.2 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR.....	18
6.2.1 Publications nationales .....	18
6.2.2 Publications internationales réalisées : .....	18
6.2.3 Communications nationales (invitées) .....	19
6.2.4 Communications internationales (invitées) .....	19
6.2.5 Conférences sur invitations .....	19
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux .....	19
7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR .....	19
7.2 Échanges techniques entre le CNR et le LNR ? (préciser échanges de souches, échanges méthodologiques...) .....	19
7.3 Projets partagés (études, comité scientifique, groupe de travail ou d'experts .. ?) où le CNR et le LNR apportent et échangent leur expertise .....	19
7.4 Si les collaborations entre le CNR et le LNR ne sont pas effectives, préciser les perspectives et/ou conditions de renforcement des liens .....	19
<b>8. Programme d'activité pour les années suivantes .....</b>	<b>19</b>

## ANNEXES

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR .....	21
1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR .....	21
1.2 Organisation du CNR.....	21
1.3 Locaux et équipement .....	22
1.4 Collections de matériel biologique .....	23
1.5 Description de la démarche qualité du laboratoire .....	24
1.5.1 Démarche qualité des CNR de l'Institut Pasteur .....	24
1.5.2 Participation du CNR à un contrôle qualité externe (CQE).....	25
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	26
Annexe 3 : Autres informations.....	27
Annexe 4 : Caractéristiques des isolats <i>tox+</i> collectés en 2017 .....	28
Annexe 5 : Caractéristiques des isolats <i>tox-</i> collectés en 2017 .....	29
Liste des abréviations et acronymes.....	4

## Liste des abréviations et acronymes

<b>Acronyme</b>	<b>Dénomination</b>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>cgMLST</b>	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CQE</b>	Control de Qualité Externe
<b>ECDC</b>	European Center for Disease Prevention and Control
<b>EIL</b>	Essaie Inter Laboratoire
<b>HCSP</b>	Haut Comité de Santé Publique
<b>SPF</b>	Sante Publique France
<b>LREMS</b>	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site de l'Institut Pasteur
<b>MALDI-TOF</b>	Spectrométrie de masse à temps de vol (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation -Time of Flight)
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaine
<b>qPCR</b>	Réaction de polymérisation en chaine en temps réel (ou quantitative)

## Résumé analytique

La diphtérie est une maladie infectieuse contagieuse, potentiellement mortelle et à prévention vaccinale, causée par les souches toxigènes des espèces bactériennes *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) et *C. ulcerans*. Cette dernière est un pathogène zoonotique qui peut être transmis à l'homme par certains animaux domestiques comme les chiens et les chats. Dans la mesure où certaines souches d'une troisième espèce de corynebactéries, *C. pseudotuberculosis*, peuvent également produire la toxine et causer des symptômes diphtériques, on regroupe cette espèce avec les deux agents majeurs de la diphtérie dans le « complexe *diphtheriae* », qui forme une branche à part dans la phylogénie des corynebactéries.

La toxine diphtérique est responsable des symptômes de la diphtérie. La toxine est portée par un phage qui peut infecter certaines souches de corynebactéries du complexe *diphtheriae* et s'intégrer dans leur chromosome, rendant les souches lysogénisées capables de produire la toxine. D'autres infections (bactériémies, endocardites, ...) peuvent être causées par des souches non toxigènes du complexe *diphtheriae*.

La diphtérie fait partie des maladies à déclaration obligatoire. Le vaccin à base de toxine inactivée protège très efficacement contre la maladie. La couverture vaccinale élevée, surtout chez les enfants (98%), a permis une élimination quasi-totale de la maladie en France. Cependant, les isolats continuent à circuler et il est crucial de maintenir une surveillance active de la diphtérie car : (1) Des cas d'infection à *C. diphtheriae* importés de zones endémiques continuent à être rapportés; (2) Des cas autochtones sont causés par *C. ulcerans*, souvent liés aux animaux de compagnie ; et (3) Des souches multi-résistantes aux anti-infectieux émergent.

En 2017, 3 cas d'infection chez 3 humains, tous importés, et 1 cas d'infection vétérinaire autochtone chez un cheval dus à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique (*tox+*), ont été rapportés. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 55 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 5 cas cliniques. Enfin, *C. ulcerans tox-* a été isolé 3 fois.

L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que 20% des isolats *tox-* analysés en 2017 sont résistants au triméthoprim, 19% à la pénicilline et 12 % au sulfamide. En ce qui concerne les isolats *tox+*, 27% sont résistants à la pénicilline, 18% au sulfamide et 18% à la clindamycine. L'analyse temporelle de la résistance à ces antibiotiques indique que ce niveau de résistance se maintient depuis plusieurs années.

## Analytical summary

Diphtheria is a contagious, potentially fatal and vaccine-preventable infectious disease caused by toxigenic strains of the bacterial species *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) and *C. ulcerans*. The latter is a zoonotic pathogen that can be transmitted to humans by domestic animals such as dogs and cats. Since some strains of a third species of corynebacteria, *C. pseudotuberculosis*, can also produce the toxin and cause diphtheria symptoms, this species is grouped with the two major agents of diphtheria in the "*diphtheriae* complex", which forms a unique branch in the phylogeny of corynebacteria.

The diphtheria toxin is responsible for the symptoms of diphtheria. The toxin gene is carried by a phage that can infect the strains of the *diphtheriae* complex. Once the phage integrates into the bacterial chromosome, the lysogenized strains can produce the toxin. Other infections (bacteremia, endocarditis ...) can be caused by non-toxigenic strains of the *diphtheriae* complex.

Diphtheria is a notifiable disease. The inactivated toxin (toxoid) vaccine protects very effectively against the disease. High immunization coverage, especially among children (98%), has led to an almost complete elimination of the disease in France. However, isolates continue to circulate and it is critical to maintain an active surveillance of diphtheria because (1) Cases of *C. diphtheriae* infection imported from endemic areas continues to be reported; (2) Indigenous cases are caused by *C. ulcerans*, often associated with pets; and (3) Antibiotic multi-resistant strains are emerging.

In 2017, 3 cases of human infection, all imported, and 1 case of indigenous veterinary infection in a horse due to *C. diphtheriae* carrying the *tox* gene in their genetic material (*tox+*), were reported. *C. diphtheriae tox-* was detected 55 times. *C. ulcerans tox+* was identified in 5 clinical cases. Finally, *C. ulcerans tox-* was isolated 3 times.

The antimicrobial resistance analysis shows that 20% of the *tox-* isolates analyzed in 2017 are resistant to trimethoprim, 19% to penicillin and 12% to sulfonamide. Regarding the *tox+* isolates, 27% are resistant to penicillin, 18% to sulfonamide and 18% to clindamycin. The temporal analysis of resistance to these antibiotics indicates that this level of resistance has been stable for several years.

## 1. Missions et organisation du CNR

Les missions générales du Centre National de Référence (CNR) des Corynebactéries du complexe *diphtheriae* (CCd) comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Les missions sont détaillées plus spécifiquement en **Annexe 1**.

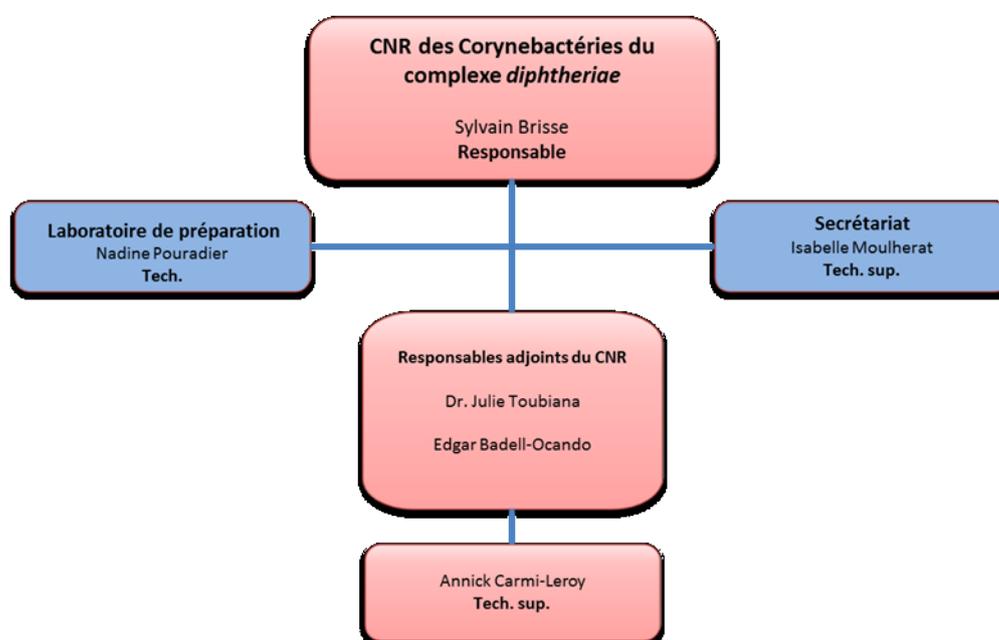
Le CNR CCd est hébergé au sein de l'unité de recherche « Biodiversité & Epidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, créée officiellement en juillet 2017 et dirigée par Sylvain Brisse.

Le CNR CCd est placé sous la responsabilité de Sylvain Brisse. Cette équipe assure seule les missions de CNR : il n'y a pas de laboratoire associé.

Depuis 2017, Julie Toubiana, médecin infectiologue, est adjointe supplémentaire du CNR et intervient en particulier pour les aspects cliniques.

L'organisation du CNR est schématisée dans la **figure 1** ci-dessous.

**Figure 1 : Organisation du CNR**



## 2. Activités d'expertise

En 2017, 3 cas d'infections humaines, tous importés, et 1 cas d'infection vétérinaire autochtone chez un cheval dus à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique (*tox+*), ont été rapportés. *C. diphtheriae non* porteur du gène *tox* dans leur matériel génétique (*tox-*) a été détecté 55 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 5 cas cliniques. Enfin, *C. ulcerans tox-* a été isolé 3 fois.

### 2.1 Évolutions des techniques en 2017

En 2017, le CNR a mis au point l'identification des corynebactéries du complexe *diphtheriae* et la détection du gène *tox* par une unique PCR en temps réel multiplex. La technique est une amélioration de la PCR quadruplex développée par nos collègues de Public Health England. Cette approche reste à accréditer.

Depuis 2017, la séquence génomique (technologie Illumina) de tous les isolats reçus ou isolés au CNR est réalisée. Cela permet de déterminer le génotype des souches à haute résolution, et d'extraire les gènes d'intérêt médical (toxine, autres gènes de virulence, gènes de résistance), améliorant ainsi la surveillance des souches et de leur évolution.

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

En 2017 nous avons évalué la technique d'identification et de détection du gène *tox* par PCR multiplex en temps réel pour les corynebactéries du complexe *diphtheriae*. Cette technique a été publiée en 2016 par une équipe de Public Health England (De Zoysa et al. J. Med. Microbiol. 2016). Dans un premier temps, la technique a été testée et validée sur un thermocycleur de la marque Qiagen, modèle Rotor-Gene Q. Des résultats conformes à l'attendu ont été obtenus, sur isolats et sur échantillons cliniques (écouvillons et tissus). La technique a ensuite été transposée sur un autre type de thermocycleur, plus répandu, le LC480 de la marque Roche. Des résultats équivalents entre les deux appareils ont été trouvés.

La technique permet de réaliser de manière simultanée la confirmation de l'identification (moyennant la non-distinction entre *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*) ainsi que la détection du gène *tox*, et ce de manière plus rapide que la PCR en point final actuellement utilisée.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer : la limite de détection de la technique, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude. Notre objectif 2018 sera de constituer un dossier de validation de la méthode, qui puisse être soumis au COFRAC pour accréditation avant son utilisation en routine au CNR.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2017, nous n'avons pas transféré de techniques vers d'autres laboratoires (aucune demande). Un transfert de nos tests de diagnostic et détection du gène de la toxine vers la Guyane est en cours.

## 2.4 Collections de matériel biologique

Notre collection s'est enrichie de 72 isolats nouveaux, lesquels provenaient essentiellement des laboratoires hospitaliers de France métropolitaine, ou de Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Guyane.

Cinq isolats de notre collection ont été envoyés à Public Health England, Londres, au laboratoire «Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit (RVPBRU)» dans le cadre d'un essai inter-laboratoire (EIL) que nous avons organisé en octobre 2017.

## 2.5 Activités d'expertise

Les prélèvements biologiques (prélèvements oro et naso-pharyngés, membranes, écouvillons) ainsi que les isolats que nous avons reçus en 2017 provenaient essentiellement des microbiologistes hospitaliers de France métropolitaine, ou de Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et la Guyane.

### 2.5.1 Nombre d'échantillons reçus et analysés en 2017

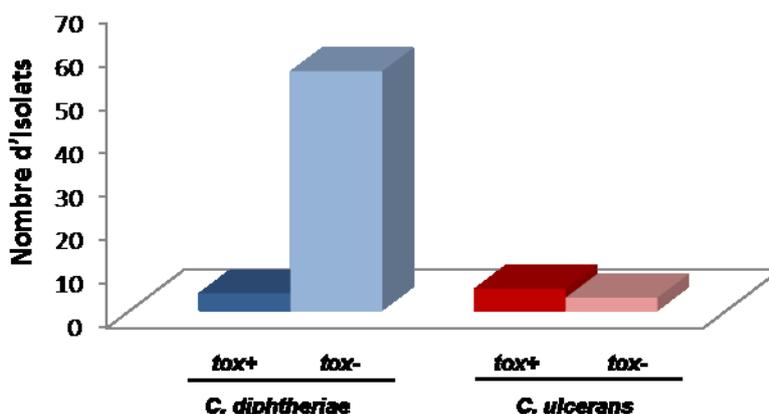
Pendant l'année 2017, nous avons reçu 89 échantillons à analyser. Ces échantillons incluaient :

- Des souches pour lesquelles nous avons recherché le gène *tox*, l'identification de l'espèce, vérifié leur pureté, et que nous avons purifiées si les cultures reçues étaient poly-microbiennes.
- Des prélèvements (tissus ou écouvillons) que nous avons mis en culture et/ou sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée.

Parmi les 89 échantillons reçus, 22 étaient négatifs, aucune bactérie appartenant au complexe *diphtheriae* n'ayant pu être isolée à partir de ces prélèvements. Une partie de ces prélèvements (6/22 ; soit 27%) correspondait à des échantillons de screening prélevés lors d'une enquête épidémiologique autour d'une possible contamination nosocomiale chez 5 patients atteints de mucoviscidose colonisés par *C. diphtheriae*. Six autres prélèvements correspondaient à des échantillons qui nous ont été adressés en raison de symptômes cliniques suggestifs d'une angine diphtérique. Huit autres prélèvements (soit 37%) correspondaient à des identifications erronées réalisées par les laboratoires de biologie médicale et hospitaliers. Un échantillon négatif (soit 4,5%) correspondait à une demande de recherche de *C. pseudotuberculosis* sur une biopsie d'un ganglion axillaire. Le dernier échantillon négatif correspondait à un isolat qui n'a poussé sur aucun milieu lors de la mise en culture.

Pour les 67 échantillons restants nous avons pu isoler ou confirmer la présence de corynebactéries appartenant au complexe *diphtheriae*. Ces 67 échantillons (**Figure 2**) comprenaient 4 *C. diphtheriae* et 5 *C. ulcerans* *tox+*, ainsi que 55 *C. diphtheriae* et 3 *C. ulcerans* *tox-*.

**Figure 2 : Nombre d'isolats cliniques de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* analysés par le CNR en 2017**



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

Parmi les 67 échantillons positifs, 61 correspondaient à des isolats, qui ont tous été testés pour leur sensibilité aux anti-infectieux. Les résultats sont donnés dans le point 3.3.

## **2.6 Activités de séquençage**

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

Oui, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux Laboratoires de Référence dans le Réseau International des instituts Pasteur et Instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina ; la plateforme prend en charge la fabrication des librairies et le séquençage. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

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

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les

hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié. Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNR fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

En 2017, notre CNR a bénéficié de la collaboration de bioinformaticiens du C3BI pour la mise en place de la méthode de génotypage cgMLST et pour développer une approche de 'whole genome SNPs'.

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

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

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

OUI, nous analysons les génotypes des souches après le séquençage génomique à des fins de santé publique.

- *Si OUI, pour quelles activités :*

Nous extrayons des informations en relation avec le *gène tox*, gènes de résistance aux antimicrobiens, les gènes de ménage utilisés pour faire le génotypage MLST ainsi que le cgMLST.

- *Investigations d'épidémies :*

Nos méthodes de génotypage MLST et cgMLST nous permettent de connaître si certaines souches sont reliées épidémiologiquement (cas groupés).

- *Surveillance :*

Le génotypage des souches nous permet de surveiller l'émergence de lignées particulières, notamment au niveau de la résistance aux antibiotiques.

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

Les séquences sont assemblées (logiciel SPAdes) puis les allèles des 7 gènes de ménage utilisés pour faire le génotypage MLST sont déterminés en utilisant la base de données internationale d'allèles dont notre CNR est le curateur, sur le site pubmlst; également, une méthode cgMLST est en cours de développement. Une classification phylogénétique avec les séquences présentes dans la base de données des génomes peut ainsi être réalisée à la demande.

Nous déterminons également la présence des gènes *tox* et *pld* (gène impliqué dans la virulence des isolats appartenant aux espèces *ulcerans* et *pseudotuberculosis*) ainsi que la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S (confirmation d'identification). Les gènes de résistance sont extraits en utilisant BLAST à partir d'une combinaison de bases de données sources (ResFinder, CARD, ArgAnnot, NCBI).

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

- *Aucune épidémie n'a eu lieu en 2017.*

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

*Nombres de séquences réalisées dans l'année : 55*

*Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...*

Aucune sélection : Nous séquençons tous les isolats reçus dans l'année qui ont pu être mis en culture. A noter, le séquençage des isolats reçus à la fin (novembre/décembre) de l'année 2017 n'a pas pu être finalisé avant la rédaction de ce rapport.

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

Nous déposons toutes les séquences dans notre plateforme BIGSdb privée. A l'occasion de publications, les séquences seront déposées au format fastq dans ENA et également dans notre plateforme BIGSdb publique en cours de construction.

### 3. Activités de surveillance

En 2017, 3 cas d'infection chez 3 humains, tous importés, et 1 cas d'infection vétérinaire autochtone chez un cheval dus à des *C. diphtheriae tox+*, ont été rapportés. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 55 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 5 cas cliniques. Enfin, *C. ulcerans tox-* a été isolé 3 fois.

L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que 20% des isolats *tox-* analysés en 2017 sont résistants au triméthoprim, 19% à la pénicilline et 12 % au sulfamide. En ce qui concerne les isolats *tox+*, 27% sont résistants à la pénicilline, 18% au sulfamide et 18% à la clindamycine. L'analyse temporelle de la résistance à ces antibiotiques indique que ce niveau de résistance se maintient depuis plusieurs années.

#### 3.1 Description du réseau de partenaires

Il n'y a pas de réseau de partenaires constitué pour la diphtérie ; la maladie étant à déclaration obligatoire et les isolats faciles à cultiver, tous les laboratoires d'analyse de biologie médicale ou de microbiologie d'hôpital sont susceptibles de nous envoyer des isolats. En 2017, 51 correspondants nous ont envoyé des échantillons à analyser ; 47 correspondants sont en France Métropolitaine et 4 en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants reste stable par rapport à 2016.

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

##### 3.2.1 Isolats porteurs du gène *tox* (*tox+*)

En 2017, nous avons reçu ou isolé 9 isolats porteurs du gène *tox* : 4 *C. diphtheriae* et 5 *C. ulcerans*. Concernant les isolats de *C. diphtheriae*, 3 appartiennent au biovar *gravis* et 1 au biovar *mitis*.

Les caractéristiques des isolats *tox+* sont détaillées dans le Tableau 1 en annexe. Un résumé est donné ci-dessous.

##### **Caractéristiques démographiques et cliniques :**

Isolats *C. diphtheriae tox+* : Parmi les 4 *C. diphtheriae tox+* reçus en 2017, 1 provenait de la Nouvelle Calédonie, 1 de La Réunion, 1 de Madagascar et 1 a été isolé à partir d'un prélèvement vétérinaire dans l'oreille d'un cheval à Marcy l'Etoile (Rhône). Parmi les 3 isolats humains, 2 ont été obtenus à partir de prélèvements cutanés (plaies) et 1 à partir d'un prélèvement respiratoire. Les 3 patients étaient 2 hommes et 1 femme, âgés de 4, 66 et 71 ans. Les 3 isolats humains ainsi que l'isolat vétérinaire sont tous producteurs de la toxine diphtérique (test ELEK +).

Isolats *C. ulcerans tox+* : Les 5 isolats *C. ulcerans tox+* ont été collectés en France Métropolitaine, dans différentes régions. Les 5 isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains cutanés (plaies). Les 5 patients étaient 2 hommes et 3 femmes âgés de 40, 59, 64, 82 et 94 ans. Les 5 isolats sont producteurs de la toxine diphtérique (test ELEK positif). Le contact avec des animaux de compagnie n'a pu être vérifié pour aucun cas, de même que leur statut vaccinal.

### **Sensibilité aux antibiotiques :**

Un des 4 isolats *C. diphtheriae tox+* est résistant à 4 antibiotiques (pénicilline, sulfamide, triméthoprime et cotrimoxazole), et 1 isolat est résistant à deux antibiotiques (pénicilline et sulfamide) Parmi les 5 *C. ulcerans tox+* deux sont résistants à la clindamycine et un des deux est également résistant à la pénicilline (voir partie 3.3).

### **Typage épidémiologique :**

L'analyse génotypique par MLST des isolats *C. diphtheriae tox+* montre que :

- L'isolat FRC0485, isolé en Nouvelle Calédonie, appartient au ST380. Ce ST a été récemment décrit en Australie dans un isolat obtenu à partir d'un prélèvement cutané chez un individu ayant voyagé aux Iles Salomon (Doyle, CJ *et al*, Emerg Infect Dis. 2017).
- L'isolat FRC0421, isolé chez un patient qui rentrait des Comores, appartient au ST109. Ce ST a déjà été trouvé en France Métropolitaine chez deux patients : un qui rentrait de Madagascar et un autre qui rentre de Mayotte.
- L'isolat FRC0505, isolé à Madagascar, appartient au ST421. Nous avons déjà trouvé ce ST précédemment, en 2015, dans un isolat obtenu chez un individu originaire de La Réunion.
- Les isolats FRC0501 et FRC0522 ont chacun un ST nouveau : ST521 et ST528 respectivement.

L'analyse génotypique des isolats *C. ulcerans tox+* montre que :

- Le ST de l'isolat FRC0495 est ST332, déjà décrit pour des isolats circulant en France et en Allemagne ;
- Le ST des isolats FRC0500, FRC0542 et FRC550 est ST328. Ces isolats ont été isolés dans différentes régions en France métropolitaine. Ce ST a été aussi trouvé sur des isolats circulants récemment en Allemagne, Norvège et Belgique.

### **3.2.2 Isolats non porteurs du gène tox (tox-)**

En 2017, le CNR a reçu ou isolé 58 isolats *tox-* : 55 *C. diphtheriae* et 3 *C. ulcerans*. En ce qui concerne les isolats de *C. diphtheriae*, le biovar a pu être déterminé pour 50 des isolats : 24 appartiennent au biovar *gravis*, 12 au biovar *belfanti* et 14 au biovar *mitis*.

Les caractéristiques des isolats *tox-* sont résumées dans le Tableau 2 en annexe. Un résumé est donné ci-dessous.

#### **Caractéristiques démographiques et cliniques :**

*C. diphtheriae tox-* : Parmi les 55 isolats reçus 30 ont été isolés chez des individus vivant en France métropolitaine (55%) et 25 en France d'Outre-Mer (45%). Le pourcentage de patients de sexe masculin est de 66% et celui de sexe féminin est de 34%. L'âge des patients de métropole variait de 5 à 81 ans, et de 1 à 75 ans pour les patients de France d'Outre-Mer. Les isolats de *C. diphtheriae tox-* ont été collectés majoritairement à partir de prélèvements cutanés (65%), ainsi que de prélèvements réalisés au niveau du tractus respiratoire supérieur (32%) et un prélèvement a été collecté à partir d'une hémoculture.

*C. ulcerans tox-* : 3 patients étaient infectés par des isolats *C. ulcerans tox-* en 2017. Les 3 patients vivaient en France métropolitaine. Deux patients avaient 26 ans et un patient avait 79 ans. Les 3 isolats *C. ulcerans tox-* ont été collectés à partir de prélèvements cutanés. Pas de contact animal documenté.

#### **Sensibilité aux antibiotiques :**

12 des *C. diphtheriae tox-* sont résistants à 2 ou plus antibiotiques (voir partie 3.3).

### Typage épidémiologique :

C. diphtheriae tox- : Le typage épidémiologique a pu être réalisé pour 47 des 55 isolats *tox-* analysés. Nous avons trouvé 37 ST différents dont 14 qui n'avaient pas été décrits auparavant. Ce résultat confirme la grande diversité des isolats *tox-*.

C. ulcerans tox- : Nous avons pu analyser le typage épidémiologique de 2 isolats parmi les 3 isolats de *C. ulcerans tox-* isolés en France. Chaque isolat a un ST différent. Le ST de l'isolat FRC499 isolé à Metz est ST339. Ce ST avait été trouvé récemment en Allemagne. L'isolat FRC0548 isolé à Vierzon a le ST325. Ce ST a été déjà décrit en France, Allemagne et en Belgique aussi bien dans des isolats obtenus à partir des prélèvements humains et également chez des isolats d'origine vétérinaire (chats et chiens) porteurs du gène *tox*.

### Biotypage et analyse géographique des isolats C. diphtheriae tox-

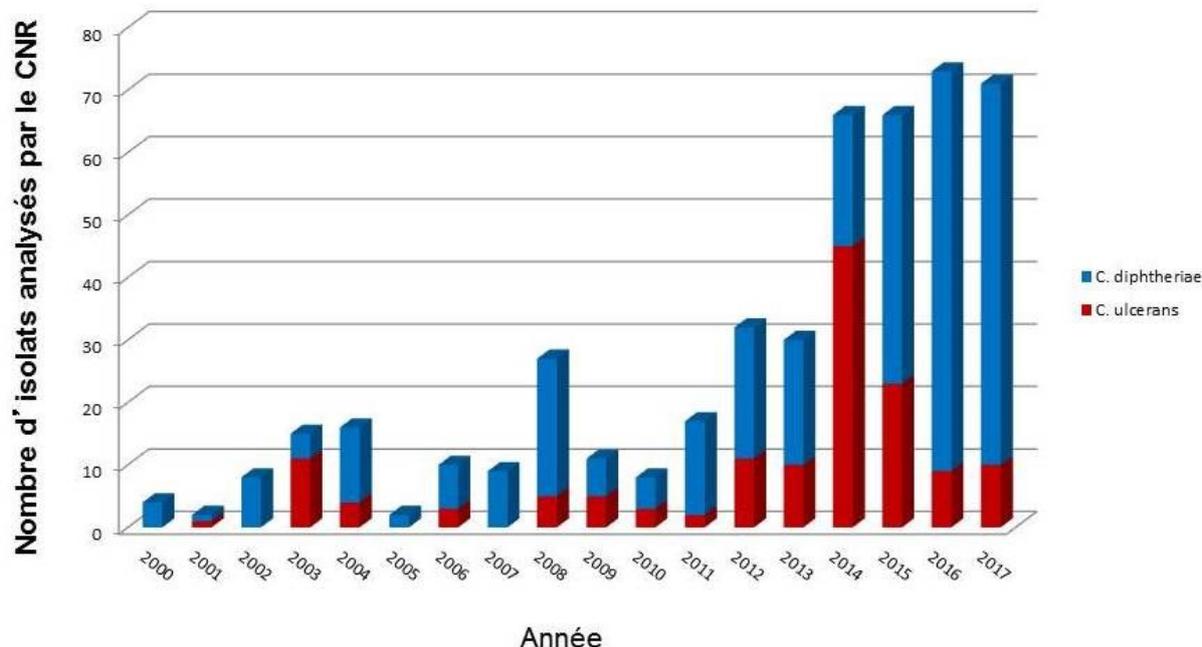
Parmi les 55 isolats *C. diphtheriae tox-* reçus au CNR en 2017, 50 ont pu être cultivés et leur biotype déterminé. Vingt-quatre isolats *tox-* appartiennent au biovar *gravis* (48%), 12 au biovar *belfanti* (24%) et 14 au biovar *mitis* (28%).

De manière similaire aux observations des années précédentes, la répartition des biovars de *C. diphtheriae tox-* est nettement différente en fonction du site géographique de provenance. Ainsi, le biovar *belfanti*, fréquent en France métropolitaine, est absent en France d'Outre-Mer.

### Tendance temporelle :

La Figure 3 montre que le nombre d'isolats reçus en 2017 reste stable par rapport à 2016.

**Figure 3. Analyse temporelle du nombre d'isolats reçus au CNR-CCd entre 2000 et 2017**



### 3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Toutes les corynebactéries appartenant au complexe *diphtheriae* reçus ou isolés au CNR sont testés en déterminant leur sensibilité à un panel de 22 antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité est mise en évidence par cette méthode, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode E-test.

Nous utilisons les seuils de sensibilité des Corynebactéries publiés en 2017 par le CA-SFM. Ces seuils sont indiqués dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Seuils critiques de sensibilité pour les Corynebactéries**

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
	S ≤	R ≥		S ≥	R <
Pénicilline G	0.12	0.12	1 unité	29	29
Ciprofloxacine	1	1	5	25	25
Moxifloxacine	0.5	0.5	5	25	25
Gentamicine	1	1	10	23	23
Clindamycine	0.5	0.5	2	20	20
Tétracycline	2	2	30	24	24
Rifampicine	0.06	0.5	5	30	25
Vancomycine	2	2	5	17	17
Linézolide	2	2	10	25	25
Triméthoprim-sulfaméthoxazole <sup>1</sup>	1	2	1.25-23.75	19	16

<sup>1</sup> Triméthoprim-sulfaméthoxazole avec le ratio 1 :19. Les seuils critiques sont exprimés en concentration du triméthoprim.

Source : CA-SFM 2017

Les pourcentages d'isolats résistants à chaque antibiotique sont donnés par catégorie d'isolat sur la Figure 4.

#### Isolats porteurs du gène *tox* :

*C. diphtheriae tox+* (N=4) : 75% des isolats sont résistants à la pénicilline, 50% aux sulfamides, 25% au triméthoprim et 25% au cotrimoxazole. Parmi les 4 isolats, 1 est résistant à 4 antibiotiques et 1 est résistant à deux antibiotiques.

*C. ulcerans tox+* (N=5) : 1 isolat est résistant à la clindamycine

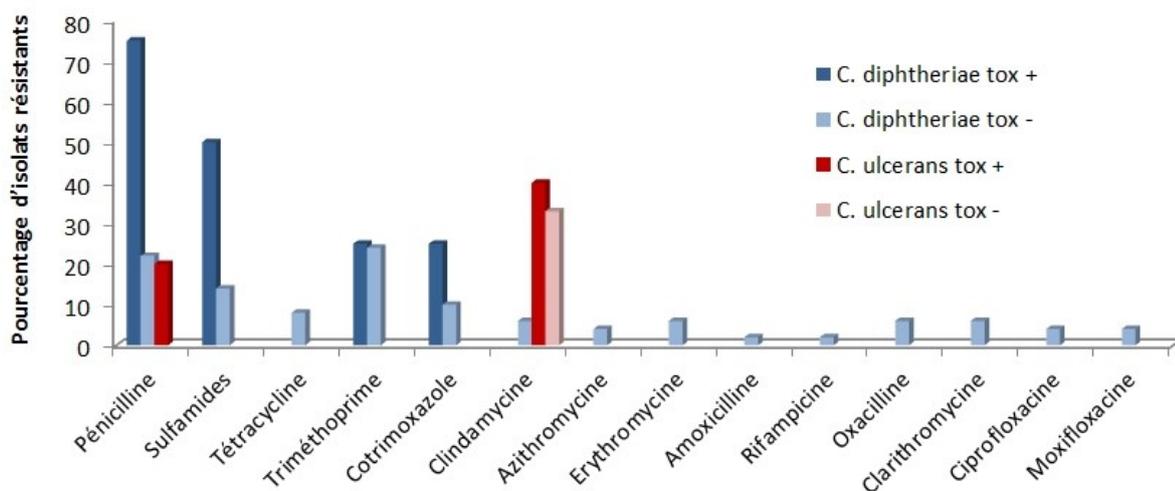
#### Isolats non porteurs du gène *tox* :

*C. diphtheriae tox-* (N=50) : 22 % des isolats sont résistants à la pénicilline, 24 % au triméthoprim, 14 % aux sulfamides, 10 % au cotrimoxazole, 8 % à la tétracycline, 6% à la clarithromycine, 6% à l'érythromycine, 6 % à l'oxacilline, 4% à la clindamycine, 4% à l'azithromycine, 4 % à la ciprofloxacine, 4 % à la moxifloxacine, 2 % à l'amoxicilline, 2 % à la rifampicine,

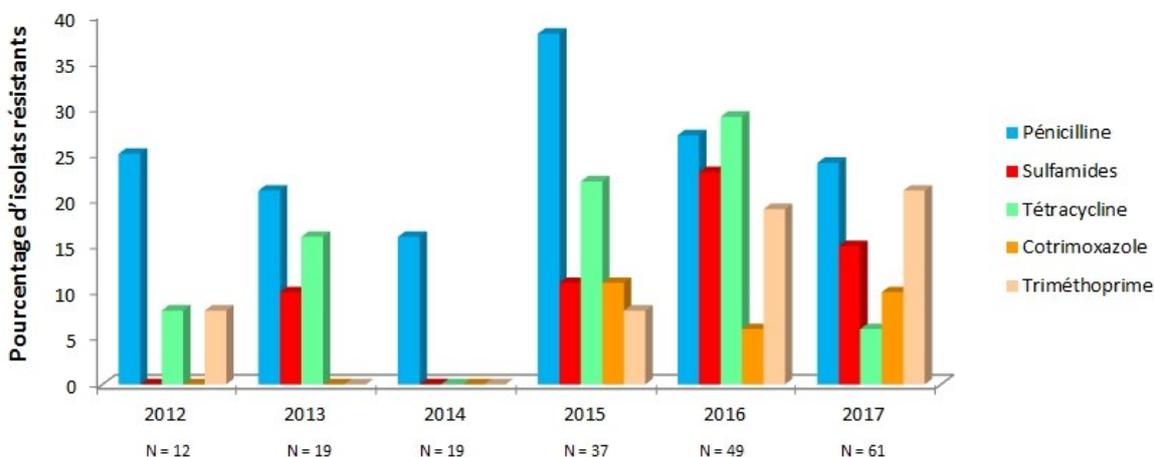
Neuf isolats sont multi-résistants : 7 isolats sont résistants à 4 ou plus antibiotiques et 2 isolats sont résistants à 3 antibiotiques.

*C. ulcerans tox-* (N=3) : Un isolat est résistant à la clindamycine.

**Figure 4. Résistance aux anti-infectieux des isolats analysés au CNR en 2017**



**Figure 5. Analyse temporelle de la résistance aux anti-infectieux pour la période 2012-2017**



**Tendance temporelle :**

La Figure 5 présente la tendance temporelle. Le taux important de résistance à la pénicilline observé en 2016 se maintient en 2017 pour les isolats *C. diphtheriae tox+*. On observe également une augmentation de la résistance au triméthoprième et au cotrimoxazole aussi bien chez les isolats *tox+* que chez les *tox-*. Cependant, on observe une diminution très nette du taux de résistance à la tétracycline et une légère augmentation du taux de résistance au triméthoprième chez les isolats analysés en 2017, par rapport à 2016.

En ce qui concerne la résistance aux macrolides, recommandés en cas d'allergie aux pénicillines, le taux reste faible en 2017.

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.

**National** : Comme indiqué dans le point 4, nous informons Santé Publique France en temps réel pour chaque détection d'un isolat porteur du gène *tox*. Des analyses des isolats circulant en France métropolitaine ainsi qu'en France d'Outre-Mer sont faites ponctuellement. Une publication conjointe concernant l'épidémiologie de la diphtérie à Mayotte a été publiée en 2017 (voir le point 3.5).

**International** : Depuis 2013, le réseau Européen Diphtheria Surveillance Network été interrompu par manque de financement. Nous avons consolidé en 2016 une collaboration avec le laboratoire de Norman Fry (Public Health England, Microbiology Reference Services, Colindale, Londres) pour partager expertises, envoi de données, de souches, etc. Des rencontres entre le responsable du CNR et N. Fry ont eu lieu, ainsi qu'une visite d'E. Badell, adjoint du CNR, en mars 2017 sur le site de Colindale. Enfin, un EIL entre les deux Laboratoires a eu lieu en octobre et en décembre.

Les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données de référence des génotypes MLST de *C. diphtheriae* (<http://pubmlst.org>) qui permet la comparaison internationale des souches. De ce fait le CNR joue un rôle central à l'international concernant la biodiversité des souches du complexe *diphtheriae*.

### 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2017 nous avons continué les discussions autour du projet en collaboration avec Santé Publique France et des collègues vétérinaires visant à mieux définir la prévalence et les facteurs de risque de portage de *C. ulcerans* chez les chiens et les chats. Le protocole d'étude est en cours de finalisation (coordination par L. Fonteneau, SPF).

Le CNR a participé à une étude rétrospective, coordonnée par SPF, sur la situation de la diphtérie à Mayotte (Belchior, E. *et al* . Emerg Infect Dis. 2017).

## 4. Alerte

Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP :

Site : [http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304\\_conduitediphtherie.pdf](http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf).

Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignement afin de collecter un maximum d'informations cliniques ainsi que des données sur le mode de vie du patient (présence d'animaux, voyages...). Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox*, il contacte directement Santé Publique France par courriel ([alerte@santepubliquefrance.fr](mailto:alerte@santepubliquefrance.fr) et [dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr](mailto:dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr)), au même moment que le laboratoire expéditeur.

En 2017, 8 alertes pour des isolats obtenus à partir de prélèvements humains, ainsi que un signalement d'un isolat porteur du gène *tox* obtenu à partir d'un prélèvement vétérinaire, ont été faites.

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

### 5.1 Conseils et expertise aux professionnels de santé

Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ;

- Pas des enseignements ni des formations aux professionnels de santé en ce qui concerne la diphtérie en 2017

Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques ;

- Pas de transfert des techniques en 2017

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

- Participation à la rédaction et à la relecture du chapitre Diphtérie du référentiel national d'infectiologie E-Pilly version 2017 (Julie Toubiana).

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

Rétro-information aux partenaires ;

Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le **site internet** (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;

Les résultats de la recherche du gène *tox* et la confirmation d'identification sont envoyés aux laboratoires demandeurs dans les 48 h ouvrables, mais généralement dans la journée en cas de réception de la souche avant 12h ou le lendemain matin en cas de réception l'après-midi.

Les données qui concernent les corynebactéries qui portent le gène *tox* sont envoyées en parallèle à la cellule de SPF en charge de la diphtérie.

Un compte-rendu avec l'ensemble d'analyses réalisées (recherche du gène *tox*, identification, recherche du biovar et, le cas échéant, antibiogramme) sont envoyées par courrier postale quelques jours après réception de l'échantillon (entre 10 et 15 jours ouvrés).

Les informations concernant la diphtérie et les activités du CNR sont disponibles pour les professionnels de santé et le grand public via notre site web (dernière mise à jour : 13/01/2017) :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae>

Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2016) est en ligne sur le site web du CNR.

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

Nous pouvons être joints aux heures ouvrables, au CNR, par téléphone au poste du responsable, des adjoints et du secrétariat. Le CNR peut également être joint par courriel et un numéro de portable est disponible en cas d'urgence. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR.

En 2017, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. Nous avons reçu 22 appels de la part des médecins biologistes, infectiologues, dermatologues qui voulaient des renseignements divers sur la diphtérie et/ou pour l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié à cette activité.

Sollicitations par téléphone en 2017	
Hôpitaux	17
Pédiatres libéraux, Médecins généralistes, biologiste LABM	3
Collectivités	2
TOTAL	22

## 5.2 Conseils et expertise aux autorités sanitaires

En 2017 nous n'avons pas participé à ce type d'expertise.

## 5.3 Conseils et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...)

Comme indiqué précédemment, les médias et le grand public peuvent trouver des informations sur la diphtérie et les activités du CNR dans notre site web. Aucun conseil n'est donné aux particuliers qui appellent au CNR. Ils sont dirigés vers leur médecin traitant.

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

### 6.1 Activités de recherche en cours

#### Séquençage génomique (WGS, pour whole genome sequencing) des isolats de *Corynebacterium* et bio-informatique

Le typage des souches de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* a jusqu'à présent été réalisé systématiquement par la technique MLST, basée sur le séquençage de 7 gènes. Cependant, cette approche n'est pas assez discriminante pour étudier la transmission ou même l'évolution fine des populations. Par ailleurs, la méthode MLST ne fournit pas d'information sur les gènes d'intérêt pour le diagnostic (toxine, biotypes) et la résistance aux antibiotiques. Notre objectif est de tirer profit du séquençage génomique pour ces divers champs d'application : identification et phylogénie, typage, analyse des gènes de virulence et de la toxine, et gènes de résistance. Ces différents objectifs requièrent des développements de stratégies d'analyse spécifiques qui ont démarré en 2016 et se poursuivent actuellement. Les gènes MLST, *tox*, *pld* et *16S rRNA* sont désormais extraits des séquences génomiques (logiciel BioNumerics). Un système de typage cgMLST est en développement.

#### Caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons souvent des profils de multirésistance. Nous réalisons un profilage génomique des gènes de résistance putatifs des isolats à partir de leur séquence génomique. Par ailleurs nous démarrons des analyses GWAS (Genome-wide association studies) pour définir le degré d'association entre génotype et phénotype pour différentes classes d'antibiotiques et définir dans quels cas le phénotype pourra être 'prédit' avec confiance à partir de la séquence génomique. Enfin, nous caractériserons les éléments génétiques mobiles qui portent les gènes de résistance.

#### Etude microbiologique de portage à *C. diphtheriae* chez des patients atteints de mucoviscidose

Nous avons suspecté avec le CHU de Dijon une possible transmission croisée entre 4 patients atteints de mucoviscidose, colonisés par *C. diphtheriae* entre 2011 et 2016. Le génotypage des isolats par MLST a montré que les 4 isolats ont le même ST, ST208. Cependant, la technique de MLST n'est pas suffisante pour pouvoir conclure s'ils sont vraiment identiques. Nous avons donc, en 2017, fait des analyses plus approfondies au niveau du génome complet des isolats. Ces analyses confirment qu'il s'agit d'une seule souche. De plus, une étude de portage chez le personnel soignant du CHU de Dijon, proche des patients, a été réalisée mais aucun portage n'a pu être mis en évidence parmi les individus prélevés.

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

#### 6.2.1 Publications nationales

Aucune

#### 6.2.2 Publications internationales réalisées :

- Steffen Grosse-Kock, Valentina Kolodkina, Edward C. Schwalbe, Jochen Blom, Andreas Burkovski, Paul A. Hoskisson, **Sylvain Brisse**, Darren Smith, Iain C. Sutcliffe, Leonid Titov, Vartul Sangal. Genomic analysis of endemic clones of toxigenic and non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Belarus during and after the major epidemic in 1990s. *BMC Genomics*, 2017, Volume 18, Number 1, Page 1
- Typhaine Billard-Pomares, Cécile Rouyer, Violaine Walewski, **Edgar Badell-Ocando**, Marc Dumas, Coralie Zumelzu, Françoise Jaureguy, **Sylvain Brisse**, Frédéric Caux, Olivier Bouchaud, Etienne Carbonnelle. Diagnosis in France of a Non-Toxigenic *tox* Gene-Bearing Strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a Young Male Back From Senegal. *Open Forum Infectious Diseases*, 2017, 4(1), ofw271. <http://doi.org/10.1093/ofid/ofw271>

- Emmanuel Belchior, Sabine Henry, **Edgar Badell**, Louis Collet, Thierry Benoit-Cattin, Anne-Marie de Montera, Nicole Guiso, Olivier Patey, Daniel Levy-Bruhl, Laurent Filleul, Francois Chieze, and Sophie Olivier. Diphtheria in Mayotte, 2007–2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(7):1218-1220.

### **6.2.3 Communications nationales (invitées)**

*Aucune*

### **6.2.4 Communications internationales (invitées)**

*Aucune*

### **6.2.5 Conférences sur invitations**

*Aucune*

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

### **7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR**

Pas de LNR ; mais des contacts avec l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort existent, en liaison avec Santé Publique France, au sujet de *C. ulcerans*.

### **7.2 Échanges techniques entre le CNR et le LNR ? (préciser échanges de souches, échanges méthodologiques...)**

Non applicable.

### **7.3 Projets partagés (études, comité scientifique, groupe de travail ou d'experts .. ?) où le CNR et le LNR apportent et échangent leur expertise**

Non applicable.

### **7.4 Si les collaborations entre le CNR et le LNR ne sont pas effectives, préciser les perspectives et/ou conditions de renforcement des liens**

Non applicable.

## **8. Programme d'activité pour les années suivantes**

### ***Evaluation de la PCR quantitative (qPCR) pour la détection de la toxine***

La détection de la toxine repose actuellement sur la PCR en point final, accréditée au CNR. Cette méthode est spécifique, sensible et rapide (6 à 8 heures entre la réception de la souche et le résultat). Cependant, une PCR en temps réel (qPCR) pourrait encore améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de la détection, tout en présentant des avantages pratiques.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans les points 2.1 et 2.2, une méthode qPCR adaptée aux corynebactéries du complexe *diphtheriae* a été récemment publiée par nos collègues de Public Health England et nous souhaitons l'implanter au CNR. L'adjoint du CNR est allé se former à la méthode dans les locaux de Public Health England et une stagiaire de mastère a eu pour sujet l'évaluation de la méthode sur des isolats du CNR.

Nous avons testé deux types de thermocycleur : Le RotorGeneQ, de chez Qiagen, qui n'est pas très répandu, sur lequel la technique a été décrite et le LC480, de la marque Roche, qui est plus répandu. Des résultats conformes à l'attendu et équivalents entre les deux appareils ont été trouvés.

Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour que la technique puisse être utilisée en routine au CNR.

En effet, il faut déterminer la limite de détection de la technique, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude. Nous allons réaliser ces expériences en 2018. Notre objectif sera de constituer un dossier de validation de la méthode et pouvoir le soumettre au COFRAC prochainement pour avoir l'accréditation de la technique.

#### **Amélioration des renseignements cliniques associés aux isolats envoyés.**

Nous améliorerons les modalités de recueil de données cliniques et biologiques associées aux isolats recueillis au CNR :

- La fiche d'accompagnement des échantillons sera revue pour intégrer un questionnaire destiné au clinicien qui sera associé au formulaire actuel envoyé aux biologistes ;
- La dématérialisation des renseignements fournis par les laboratoires demandeurs d'expertise est en cours à l'Institut Pasteur.

#### **Diversité génomique des isolats du complexe *diphtheriae* et dynamique des gènes de toxine et leur expression**

Plusieurs questions importantes pour la surveillance de la diphtérie peuvent maintenant être étudiées par l'analyse génomique des isolats. D'une part, il existe une diversité, largement méconnue, des éléments génétiques portant le gène *tox* responsable des symptômes majeurs de la diphtérie. Récemment, plus d'un siècle après la découverte de la toxine, le séquençage génomique de souches de *C. ulcerans* a révélé qu'en plus du phage toxinogène, d'autres éléments génétiques sont porteurs du gène *tox*. Les implications sur la détection de la toxine sont potentiellement importantes et doivent être évaluées. Nous étudierons le contexte génomique du gène *tox*, en nous appuyant sur la collection du CNR. Par ailleurs, la production de la toxine et sa diffusion dans les populations sont affectées par les éléments génétiques qui la portent. De façon plus générale, la dynamique génomique des deux espèces majeures *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* reste mal caractérisée et cela représente un frein à la compréhension de la diffusion de la toxine. Par exemple, pourquoi les isolats du biotype belfanti sont-ils toujours *tox*-? Cela suggère une incompatibilité génomique entre le phage et le fond génétique de ce biotype, que nous chercherons à comprendre. Enfin, la présence du gène *tox* n'est pas toujours accompagnée de sa détection phénotypique. Pour certains isolats, cela est dû à des altérations du gène *tox* (décalage de phase de lecture ou insertion d'une transposase), mais pour d'autres, la raison est inconnue et sera investiguée.

L'unité qui héberge le CNR développera ces axes de recherche dans les années à venir, ce qui permettra de mieux comprendre l'épidémiologie de la diphtérie et son évolution, et devrait contribuer à mieux contrôler la maladie.

## **ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR**

### **2.1. Liste des techniques de référence : diagnostique/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux**

Pour tout isolat envoyé ou obtenu au CNR nous recherchons en priorité **la présence du gène *tox* par PCR en point final** après extraction du matériel génétique de la bactérie. Nous vérifions **l'expression de la toxine** à l'aide du test Elek, qui est un test d'immuno-précipitation dans un milieu gélosé. Le sérum est fourni par l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg.

Pour l'identification des bactéries du complexe *diphtheriae* nous utilisons d'une part la **culture sur un milieu sélectif, le milieu de Tinsdale** fabriqué au laboratoire. D'autre part, nous réalisons **l'identification moléculaire des bactéries par PCR multiplex des gènes *dtxR*, *ARNr 16S* et *pld***, qui permettent d'identifier les trois espèces de corynebactéries appartenant au complexe *diphtheriae*.

Nous complétons l'identification par des **techniques de microbiologie** telles que : **coloration de Gram, test Rosco et test Hiss sérum** ainsi que par **spectrométrie de masse MALDI-TOF**.

En parallèle nous réalisons le **typage moléculaire des isolats** par la technique multilocus sequence typing (MLST). Un système de typage core genome multilocus sequence typing (cgMLST, basé sur près de 1300 gènes) est en cours de développement.

**La sensibilité aux antibiotiques** de tous les isolats est réalisée à l'aide de disques sur milieu gélosé Mueller-Hinton complété avec du sang de cheval et, lorsqu'une résistance (ou sensibilité intermédiaire) est détectée, nous déterminons les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test. Les interprétations suivent les recommandations 2016 de la Société Française de Microbiologie.

### **2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR**

Voir partie 2.1. 'Techniques de référence' pour une caractérisation complète. A minima, la PCR *tox*, l'identification par MALDI-TOF et l'antibiogramme peuvent être réalisées par les laboratoires