

Rapport annuel d'activité

2019

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



Année d'exercice

2018

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	4
RESUME ANALYTIQUE	5
ANALYTICAL SUMMARY	6
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	7
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES EN 2018	7
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES	8
2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	8
2.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE	8
2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE	8
2.5.1 NOMBRE D'ÉCHANTILLONS REÇUS ET ANALYSES EN 2018	8
2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE	9
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	10
3.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES	10
3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	11
3.2.1 ISOLATS PORTEURS DU GENE <i>TOX</i> (<i>TOX+</i>)	11
3.2.2 ISOLATS NON PORTEURS DU GENE <i>TOX</i> (<i>TOX-</i>)	12
3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	14
3.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.	16
3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	16
4. ALERTE	17
5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	17
5.1 CONSEILS ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE	17
5.2 CONSEILS ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	18
5.3 CONSEILS ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC...)	18
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	19
6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS	19
6.2 LES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES OU PREVUES EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR	21
6.2.1 PUBLICATIONS NATIONALES	21
6.2.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES REALISEES :	21

6.2.3	COMMUNICATIONS NATIONALES (INVITEES)	21
6.2.4	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (INVITEES)	21
6.2.5	CONFERENCES SUR INVITATIONS	22

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX **22**

7.1	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE ET D'HYGIENE ALIMENTAIRE DONT LES LNR	22
7.2	ÉCHANGES TECHNIQUES ENTRE LE CNR ET LE LNR ? (PRECISER ECHANGES DE SOUCHES, ECHANGES METHODOLOGIQUES...)	22
7.3	PROJETS PARTAGES (ETUDES, COMITE SCIENTIFIQUE, GROUPE DE TRAVAIL OU D'EXPERTS .. ?) OU LE CNR ET LE LNR APPORTENT ET ECHANGENT LEUR EXPERTISE	22
7.4	SI LES COLLABORATIONS ENTRE LE CNR ET LE LNR NE SONT PAS EFFECTIVES, PRECISER LES PERSPECTIVES ET/OU CONDITIONS DE RENFORCEMENT DES LIENS	22

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES **22**

ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR **24**

1.1	MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR	24
1.2	ORGANISATION DU CNR	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
1.3	LOCAUX ET EQUIPEMENT	24
1.4	COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
1.5	DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE	24
1.5.1	DEMARCHE QUALITE DES CNR DE L'INSTITUT PASTEUR	24

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR **27**

ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS **28**

ANNEXE 4 : CARACTERISTIQUES DES ISOLATS TOX+ COLLECTES EN 2018 **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

Liste des abréviations et acronymes

Acronyme Dénomination

ADN	Acide désoxyribonucléique
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
cgMLST	Core Genome Multilocus Sequence Typing
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CQE	Control de Qualité Externe
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EIL	Essaie Inter Laboratoire
HCSP	Haut Comité de Santé Publique
SPF	Sante Publique France
LREMS	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site de l'Institut Pasteur
MALDI-TOF	Spectrométrie de masse à temps de vol (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation -Time of Flight)
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
qPCR	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 2018, 4 cas d'infections humaines, dus à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*), ont été détectés.

C. diphtheriae tox- a été détecté 54 fois. De plus, six *C. ulcerans tox+* ont été identifiés dans 5 cas cliniques, et *C. ulcerans tox-* a été isolé 5 fois.

L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que 35% des isolats *C. diphtheriae tox-* analysés en 2018 sont résistants à la pénicilline, 25% au triméthoprim, 18% à l'oxacilline, 16 % au sulfamide et à la tétracycline et 13% au cotrimoxazole. En ce qui concerne les isolats *C. diphtheriae tox+*, 50% (2 sur 4) sont multi-résistants (résistants à 6 antibiotiques : moxifloxacine, sulfamide, ciprofloxacine, kanamycine, tétracycline et triméthoprim). Parmi ces deux isolats l'un est, en plus, résistant à la rifampicine. Les 2 autres isolats sont seulement résistants à la pénicilline. L'analyse temporelle de la résistance à ces antibiotiques indique que le niveau de résistance à la pénicilline a augmenté en 2018 par rapport aux années précédentes.

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 2018, 4 cases of human infection, due to *C. diphtheriae* carrying the *tox* gene (*tox+*), were reported. *C. diphtheriae tox-* was detected 54 times. Six *C. ulcerans tox+* were identified in 5 clinical cases. Finally, *C. ulcerans tox-* was isolated 5 times.

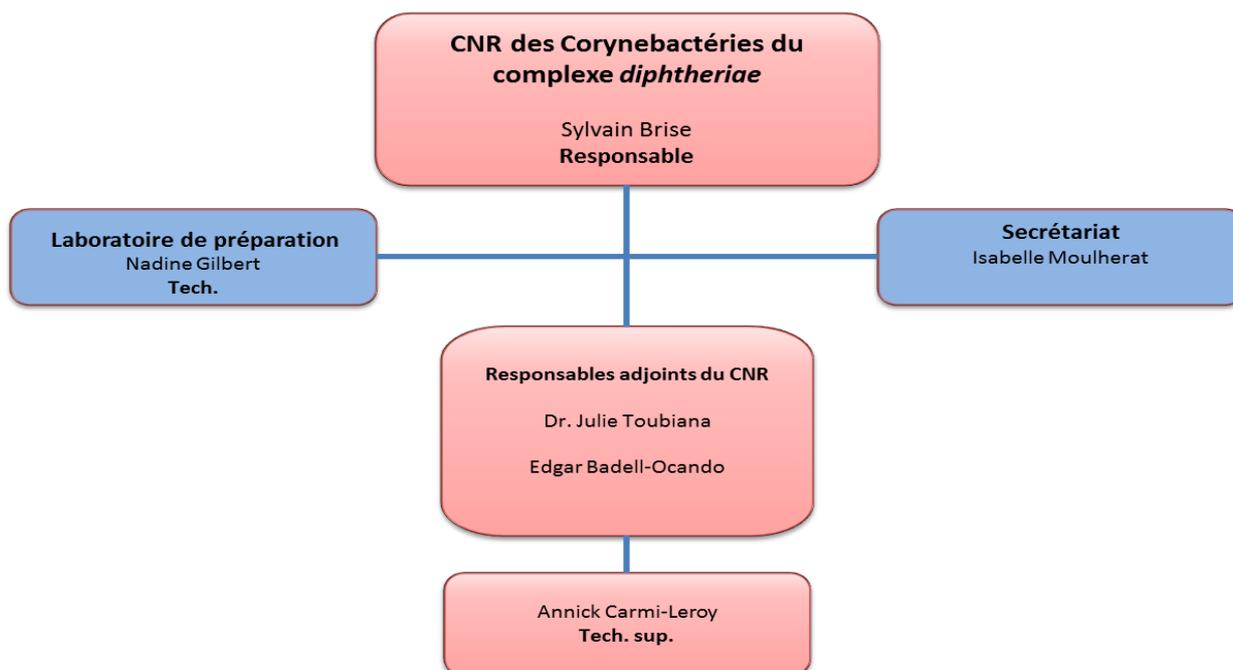
The antimicrobial resistance analysis shows that 35% of the *tox-* isolates analyzed in 2018 are resistant to penicillin, 25% to trimethoprim, 18% to oxacillin, 16% to sulfonamide and tetracyclin and 13% to cotrimoxazole. Regarding the *tox+* isolates, 50% (2 out of 4) are multi-resistant (resistant to 6 antibiotics: moxifloxacin, sulfonamide, ciprofloxacin, kanamycine, tetracyclin and trimethoprim); one of these isolates is also resistant to rifampicin. The remaining two isolates are only resistant to penicillin. The temporal analysis of resistance to these antibiotics indicates an increase of the resistance to penicillin in 2018.

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**.

Il n'y a pas eu de changement organisationnel en 2018. Le CNR CCd est hébergé au sein de l'unité de recherche « Biodiversité & Epidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, dirigée par Sylvain Brisse. L'organisation du CNR est schématisée dans la figure ci-dessous.

Figure : Organisation du CNR



2. Activités d'expertise

Chiffres clés de l'année 2018 :

En 2018, 4 cas d'infections humaines, dus à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*), ont été détectés. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 54 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 5 cas cliniques et *C. ulcerans tox-* a aussi été isolé 5 fois.

2.1 Évolutions des techniques en 2018

qPCR : En 2018 nous avons évalué et validé notre amélioration de la méthode de PCR multiplex en temps réel pour l'identification des corynebactéries du complexe *diphtheriae* et la détection du gène *tox*. Une version antérieure de cette méthode a été publiée en 2016 par une équipe de Public Health England (De Zoysa et al. J. Med. Microbiol. 2016). Nous avons ajouté dans cette multiplex, une cible (16S rRNA universel) servant de contrôle interne d'amplification et de présence d'ADN bactérien. Nous avons défini la limite de détection, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude de cette qPCR. La méthode a été validée sur isolats et sur échantillons cliniques (écouvillons et tissus), et sur deux thermocycleurs différents (RotorGene-Q, Qiagen ; et LC480, Roche) et dans deux laboratoires.

La technique permet un gain de temps (d'à peu près 3h) par rapport à la PCR en point final actuellement utilisée et accréditée. Un dossier de validation de la méthode, qui sera soumis au COFRAC pour accréditation avant son utilisation

en routine au CNR, est en cours de préparation. Un manuscrit a été soumis pour publication (Badell *et al.*, Optimization and validation of a quadruplex real-time PCR assay for the diagnosis of diphtheria).

Génomique : En 2018, nous avons réalisé le séquençage génomique (technologie Illumina) de tous les isolats reçus ou isolés au CNR. Cela permet de déterminer le génotype à haute résolution, et de déterminer la présence (et le variant) des gènes d'intérêt médical (toxine, autres gènes de virulence, gènes de résistance). Cette approche améliore la surveillance des souches. Elle doit être réalisée au plus tôt après isolement des souches ; les délais actuels sont de 1 mois environ.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Il n'existe aucune trousse de diagnostic diphtérie sur le marché.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2018, nous n'avons pas reçu de demande de transfert de techniques vers d'autres laboratoires. Un transfert de notre qPCR vers la Guyane est en cours.

2.4 Collections de matériel biologique

Notre collection s'est enrichie de 70 nouveaux isolats, provenant essentiellement des laboratoires hospitaliers de France métropolitaine, ou de Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Guyane.

2.5 Activités d'expertise

2.5.1 Nombre d'échantillons reçus et analysés en 2018

Pendant l'année 2018, nous avons reçu 117 échantillons à analyser (Figure ci-dessous). Ces échantillons incluaient :

- Des souches pour lesquelles nous avons recherché le gène *tox*, identifié l'espèce, vérifié la pureté, et que nous avons purifiées si les cultures reçues étaient poly-microbiennes. Six de ces souches correspondaient à un échange inter-laboratoire dans le cadre de l'accréditation à la norme ISO 15189.
- Des prélèvements (tissus ou écouvillons) que nous avons mis en culture et/ou sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée.

Figure : Nombre d'échantillons analysés par le CNR en 2018

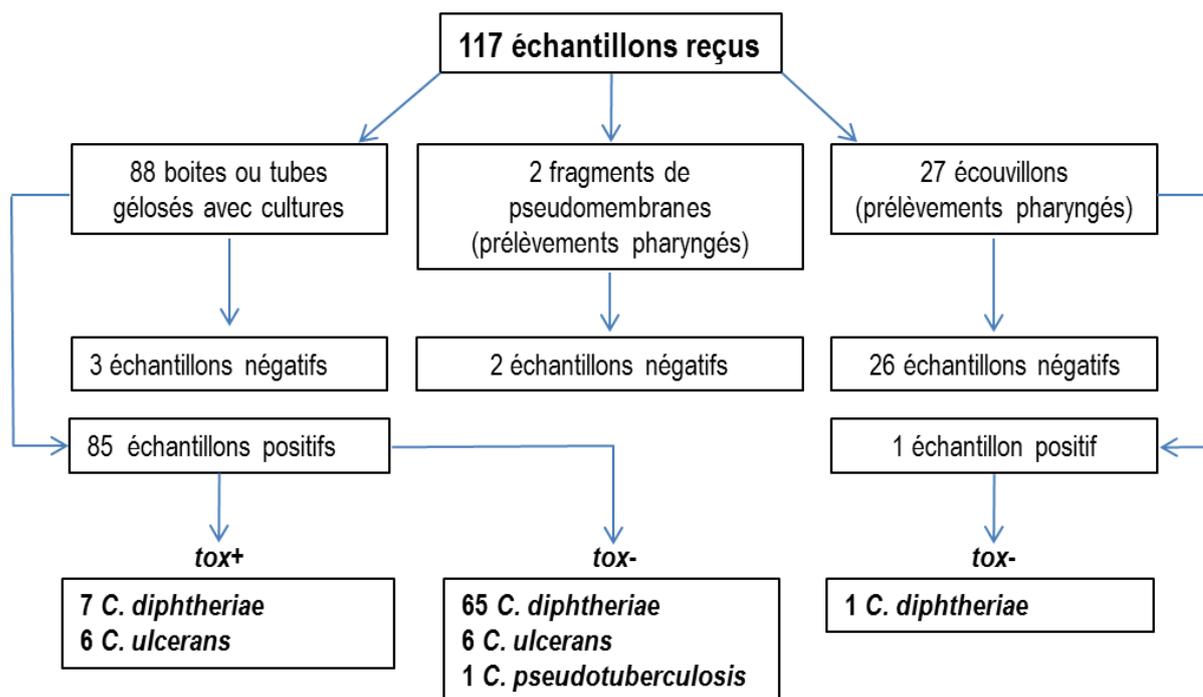


Tableau : Analyses réalisées au CNR

Type d'échantillon	Type d'analyse	Nombre d'analyses	délai de rendu des résultats
Prélèvements	Réception et mise en culture	29	Non applicable
Prélèvements	Détection de la toxine par PCR	29	< 1 jour ouvré
Prélèvements	Détection d'ADN de <i>C. diphtheriae</i> ou <i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i>	29	< 2 jours ouvrés
Isolats bactériens	Réception et mise en culture	88	Non applicable
Isolats bactériens	Analyse du gène <i>tox</i>	88	< 1 jour ouvré
Isolats bactériens	Détection d'ADN de <i>C. diphtheriae</i> ou <i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i>	88	< 2 jours ouvrés
Isolats bactériens	Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF	88	Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Test d'Elek (production de la toxine <i>in-vitro</i>)	13	< 10 jours ouvrés Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Biotypage	73	Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Antibiogrammes	81	Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Séquençage génomique	81	Pas rendu systématiquement

Envoi de souches. Six isolats de notre collection ont été envoyés à Public Health England, Londres, au laboratoire «Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit (RVPBRU)» ; au National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control à Varsovie et au Laboratorium Microbiologie à Bruxelles, dans le cadre d'un essai inter-laboratoire (EIL) que nous avons organisé en Novembre 2018.

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).

La technologie Illumina (NextSeq-500) est utilisée ; les banques sont préparées avec le kit Nextera XT.

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

Le CNR bénéficie de l'expertise de bio-informaticiens du Hub Bioinformatique et Biostatistique 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.

En 2018, nous avons consolidé notre pipeline d'analyse en automatisant plusieurs étapes (détection du gène *tox*, MLST et gènes de résistance).

- *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 BioNumerics, la plateforme BIGSdb (pour le génotypage MLST et cgMLST).

- *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 : définition de cas groupés éventuels, gènes de résistance aux antibiotiques.

- *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). Cela a été utile par exemple pour investiguer des cas d'infections en Guyane française.

- *Surveillance :*

Le génotypage de toutes les 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, sérotype/sérogroupe prédiction, résistome prédiction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles).

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.

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

- Tous les isolats (n = 70) ont été séquencés en 2018. Il n'y a aucune sélection : nous séquençons tous les isolats qui ont pu être cultivés.

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

Nous déposons toutes les séquences assemblées dans notre plateforme BIGSdb privée. A l'occasion de publications, les séquences brutes sont déposées au format *fastq* dans SRA ou ENA, et les assemblages sont déposés dans GenBank ou ENA et également rendus publics sur notre plateforme BIGSdb.

3. Activités de surveillance

En 2018, 4 cas d'infection chez 4 personnes, dus à des *C. diphtheriae tox+*, ont été rapportés. Pour 2 des 4 cas leur importation a pu être vérifiée. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 62 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 5 cas cliniques. Enfin, *C. ulcerans tox-* a été isolé 5 fois.

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 2018, 61 correspondants nous ont envoyé des échantillons à analyser ; 55 correspondants sont en France Métropolitaine et 6 en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants a légèrement augmenté par rapport à 2017.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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

En 2018, nous avons reçu ou isolé 12 isolats porteurs du gène *tox* : 6 *C. diphtheriae* et 6 *C. ulcerans*. En ce qui concerne les isolats de *C. diphtheriae*, 5 appartiennent au biovar *mitis* et 1 au biovar *gravis*.

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

Caractéristiques démographiques et cliniques :

Isolats *C. diphtheriae tox+* : Les 6 *C. diphtheriae tox+* reçus en 2018 provenaient de 4 cas diagnostiqués en France métropolitaine : 1 à Montargis, 1 à Saint-Lô, 1 à Rouen et 1 à Paris (2 isolats : 1 au niveau cutané et 1 au niveau respiratoire). Pour 2 patients deux isolats ont été obtenus à partir de deux sites différents.

Parmi les 6 isolats, 3 ont été obtenus à partir de prélèvements cutanés (plaies), 2 à partir d'un prélèvement respiratoire et 1 à partir d'une hémoculture. Les 4 patients étaient des hommes, âgés de 5, 28, 33 et 60 ans. Les 6 isolats sont tous producteurs de la toxine diphtérique (test Elek positif).

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 : 3 cutanés (plaies), 1 hémoculture et 1 osseux. Les 5 patients étaient 4 hommes et 1 femme ; âgés de 19, 47, 58, 82 et 93 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.

Typage épidémiologique :

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

- Les isolats FRC0614 et FRC0633 (appartenant à un même patient) et l'isolat FRC0649 appartiennent au ST 377. Ce ST a été récemment décrit en Espagne et en Inde. Le patient du cas FRC0649 avait été en contact proche avec des gens qui rentraient de Guinée. Pour l'autre patient aucune information sur d'éventuels déplacements à l'étranger ou de contact avec des personnes revenants de l'étranger n'est disponible.
- L'isolat FRC0655, isolé chez un patient qui avait voyagé récemment au Soudan, appartient au ST183. Ce ST a déjà été trouvé en Algérie.
- Les isolats FRC0674 et FRC0681 (venant d'un même patient), appartiennent au ST484. Ce ST a été précédemment décrit en 2017 chez un patient en Espagne. Nous n'avons pas eu d'information sur des déplacements à l'étranger ou des contacts avec des personnes revenants de l'étranger.

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

- Le ST de l'isolat FRC0618 est ST331, déjà décrit pour des isolats *tox+* circulants en France, Belgique et Allemagne ;
- Le ST des isolats FRC0582 et FRC0638 est ST328. Ces isolats ont été isolés à Colmar. Auparavant, ce ST a été trouvé dans différentes régions de France métropolitaine et sur des isolats *tox+* circulant récemment en Allemagne, Norvège et Belgique.

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

En 2018, le CNR a reçu ou isolé 59 isolats *tox*- : 54 *C. diphtheriae* et 5 *C. ulcerans*.

Les caractéristiques des isolats *tox*- sont résumées ci-dessous.

Caractéristiques démographiques et cliniques :

C. diphtheriae tox- : Parmi les 54 isolats reçus, 29 ont été isolés chez des individus vivant en France métropolitaine (54%) et 25 en France d'Outre-Mer (46%). Le pourcentage de patients de sexe masculin est de 57% et celui de sexe féminin est de 43%. L'âge des patients de métropole variait de 8 à 96 ans, et de 5 à 78 ans pour les patients de France d'Outre-Mer. Les isolats de *C. diphtheriae tox*- ont été collectés majoritairement à partir de prélèvements cutanés (67%), ainsi que de prélèvements réalisés au niveau du tractus respiratoire supérieur (22%), 3 prélèvements ont été collectés à partir d'une hémoculture et deux à partir des prélèvements osseux.

C. ulcerans tox- : 5 *C. ulcerans tox*- ont été détectés en 2018. Parmi ces 5 isolats, 1 a été obtenu à partir d'un prélèvement vétérinaire, chez un chien, et 4 ont été obtenus à partir de prélèvements humains. Trois des patients vivaient en France métropolitaine et 1 en Guyane. Deux des patients étaient des hommes et deux des femmes. L'âge des patients variait entre 53 et 94 ans. Les 5 isolats *C. ulcerans tox*- ont été tous collectés à partir de prélèvements cutanés. Le contact avec des animaux a été documenté pour un seul des patients (contact avec des chats).

Typage épidémiologique :

C. diphtheriae tox- : Le typage épidémiologique a pu être réalisé pour 52 des 54 isolats *tox*- analysés (les deux derniers sont en cours). Nous avons trouvé 37 ST différents dont 14 qui n'avaient pas été décrits auparavant. Ce résultat confirme la grande diversité des isolats *tox*-.

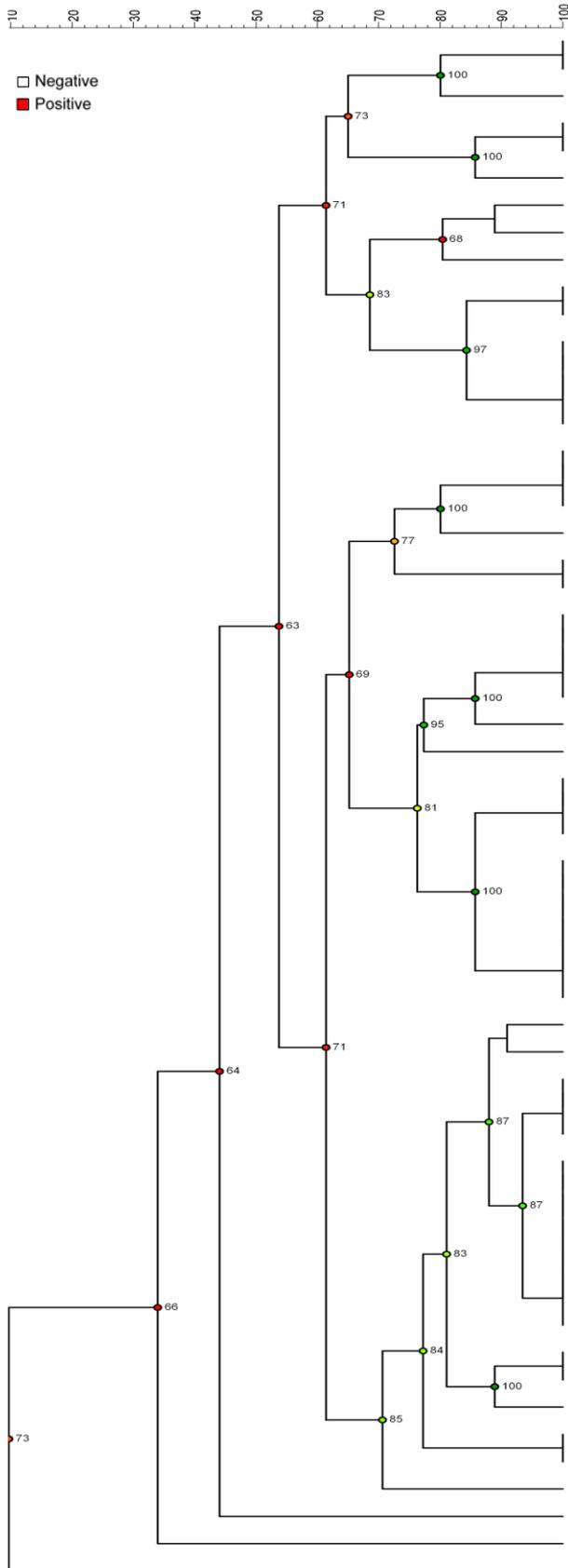
C. ulcerans tox- : Le typage épidémiologique de 4 isolats parmi les 5 isolats de *C. ulcerans tox*- isolés en France a été réalisé. Chaque isolat a un ST différent. Les ST 327, 339 et 349 ont été trouvés récemment dans différentes régions de France métropolitaine, en Allemagne et en Belgique. Le ST 613 de l'isolat FRC0637 isolé à Châteaulin est un nouveau ST.

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

Parmi les 54 isolats *C. diphtheriae tox*- reçus au CNR en 2018, vingt-deux appartiennent au biovar *gravis* (41%), 12 au biovar *belfanti* (22%) et 20 au biovar *mitis* (37%).

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.

MLST (<All Characters>)



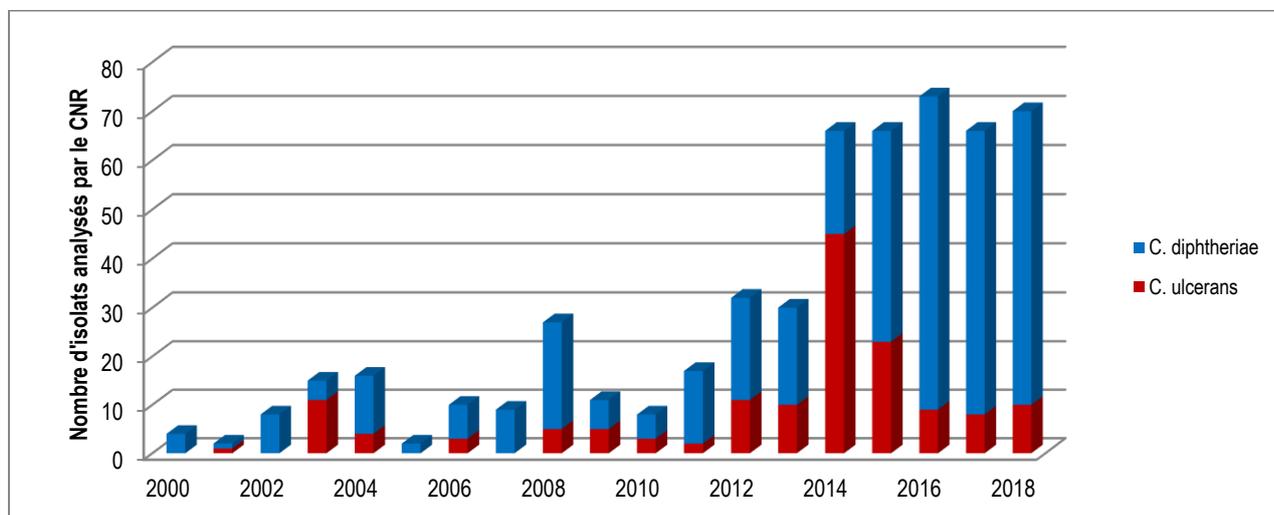
Key	MLST ST	Biotype	Region
FRC0657	536	Gravis	French Guiana
FRC0639	536	Gravis	French Guiana
FRC0579	605	Mitis	New Caledonia
FRC0681	484	Mitis	Mainland France
FRC0674	484	Mitis	Mainland France
FRC0635	607	Belfanti	Mainland France
FRC0653	448	Mitis	Mainland France
FRC0652	601	Mitis	Mainland France
FRC0668	229	Mitis	French Guiana
FRC0646	208	Belfanti	Mainland France
FRC0644	511	Mitis	Mainland France
FRC0672	604	Mitis	Mainland France
FRC0673	604	Mitis	Mainland France
FRC0655	183	Gravis	Mainland France
FRC0627	600	Belfanti	Mainland France
FRC0658	297	Gravis	Mainland France
FRC0630	606	Gravis	La Reunion
FRC0648	297	Gravis	Mainland France
FRC0689	611	Gravis	Mainland France
FRC0624	237	Mitis	La Reunion
FRC0605	580	Mitis	French Guiana
FRC0662	128	Gravis	French Guiana
FRC0632	128	Gravis	French Guiana
FRC0613	579	Mitis	French Guiana
FRC0575	128	Mitis	French Guiana
FRC0671	32	Gravis	Mainland France
FRC0663	608	Mitis	Mainland France
FRC0633	377	Mitis	Mainland France
FRC0649	377	Mitis	Mainland France
FRC0614	377	Mitis	Mainland France
FRC0598	228	Gravis	New Caledonia
FRC0597	228	Gravis	New Caledonia
FRC0601	228	Gravis	New Caledonia
FRC0603	228	Gravis	New Caledonia
FRC0577	228	Gravis	New Caledonia
FRC0602	228	Gravis	New Caledonia
FRC0623	226	Belfanti	Mainland France
FRC0581	524	Mitis	New Caledonia
FRC0650	517	Gravis	Mainland France
FRC0661	517	Gravis	Mainland France
FRC0629	517	Mitis	Mainland France
FRC0576	42	Belfanti	Mainland France
FRC0690	612	Belfanti	Mainland France
FRC0691	610	Belfanti	Mainland France
FRC0669	603	Belfanti	Mainland France
FRC0659	42	Belfanti	Mainland France
FRC0660	106	Belfanti	Mainland France
FRC0606	169	Belfanti	Mainland France
FRC0580	416	Gravis	New Caledonia
FRC0600	416	Gravis	New Caledonia
FRC0599	533	Gravis	New Caledonia
FRC0620	33	Gravis	Guadeloupe
FRC0594	425	Gravis	Mayotte
FRC0578	232	Mitis	New Caledonia
FRC0665	602	Mitis	Mainland France
FRC0619	609	Mitis	Mainland France
FRC0640	388	Mitis	Mainland France

Figure : Dendrogramme UPGMA basé sur les distances entre profils alléliques MLST (7 gènes) pour les isolats de *C. diphtheriae*. Les isolats porteurs du gène *tox* sont indiqués en rouge.

Tendance temporelle :

La Figure ci-dessous montre que le nombre d'isolats analysés en 2018 reste stable par rapport à ceux des 4 années précédentes.

Figure : Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2000 et 2018



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 2018 par le CA-SFM. Ces seuils sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau : Seuils critiques de sensibilité pour les corynebactéries

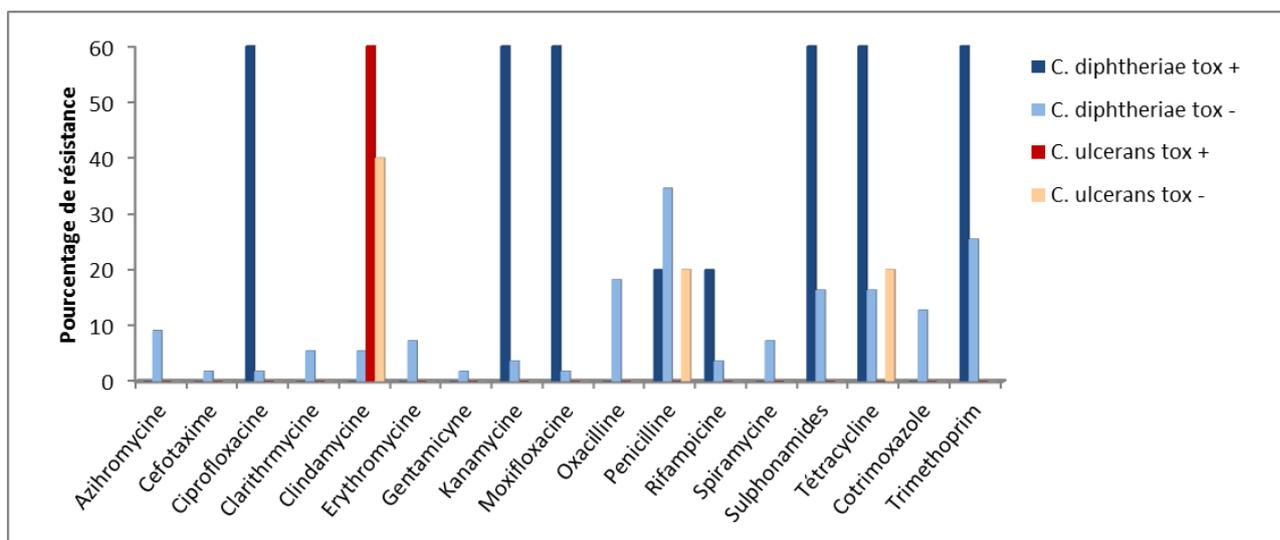
Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)	
	S ≤	R ≥		S ≥	R <
Pénicilline G	0.12	0.12	1 unité	29	29
Ciprofloxacine	1	1	5	25	25
Moxifloxacine	0.5	0.5	5	25	25
Gentamicine	1	1	10	23	23
Clindamycine	0.5	0.5	2	20	20
Tétracycline	2	2	30	24	24
Rifampicine	0.06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

¹ Triméthoprime-sulfaméthoxazole avec le ratio 1 :19. Les seuils critiques sont exprimés en concentration du triméthoprime.

Source : CA-SFM 2018

Les pourcentages d'isolats résistants à chaque antibiotique sont donnés par catégorie d'isolat sur la Figure ci-dessous. A noter pour l'interprétation des pourcentages, que le nombre d'isolats tox+ est relativement faible (4 pour *C. diphtheriae*, car 2 de 6 isolats étaient des doublons et 5 pour *C. ulcerans* car 1 de 6 isolats était un doublon).

Figure : Résistance aux anti-infectieux des isolats analysés au CNR en 2018



Isolats porteurs du gène *tox* :

C. diphtheriae tox+ (N=4) : En ce qui concerne les isolats *tox+*, 50% (2 sur 4) sont multi-résistants, étant résistants à 6 antibiotiques : moxifloxacine, sulfamide, ciprofloxacine, kanamycine, tétracycline et triméthoprim. Parmi ces 2 isolats l'un est, en plus, résistants à la rifampicine. Les 2 autres isolats sont seulement résistants à la pénicilline

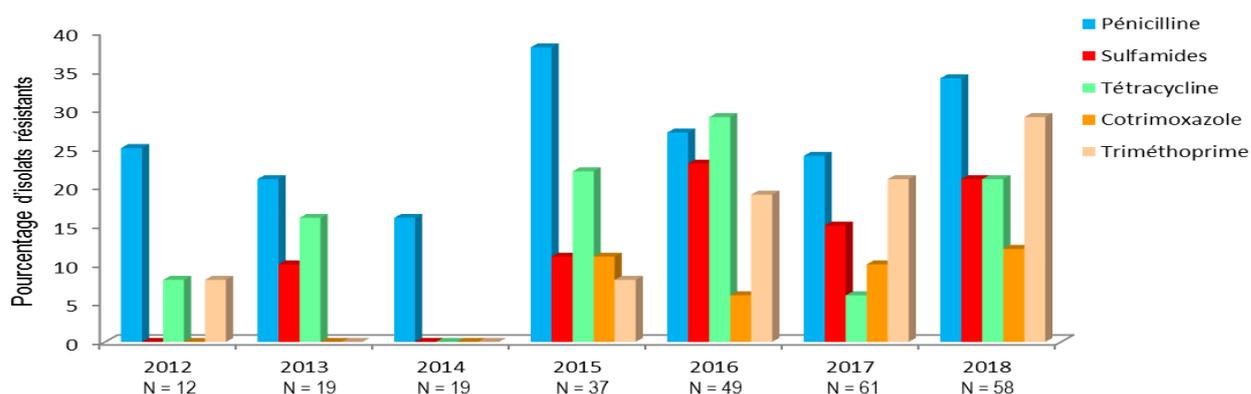
C. ulcerans tox+ (N=5) : Parmi les 5 isolats, 3 sont résistants à la clindamycine.

Isolats non porteurs du gène *tox* :

C. diphtheriae tox- (N=54) : 35% des isolats sont résistants à la pénicilline, 25% au triméthoprim, 18% à l'oxacilline, 16% au sulfamide et à la tétracycline, 13% au cotrimoxazole, 9% à l'azithromycine, 7% à l'érythromycine, 5% à la clarithromycine et à la clindamycine, 4% à la kanamycine, 2% au cefotaxime, 2% à la ciprofloxacine, 2% à la gentamicine et 2% à la moxifloxacine. 5 isolats sont multi-résistants. Parmi ceux-là, 2 sont résistants à 10 antibiotiques.

C. ulcerans tox- (N=5) : Deux isolats sont résistants à la clindamycine, un à la pénicilline et un autre à la tétracycline.

Figure : Analyse temporelle de la résistance aux anti-infectieux pour la période 2012-2018



La Figure ci-dessus présente la tendance temporelle. Le taux important de résistance à la pénicilline observé depuis 2015 se maintient en 2018. On observe également une tendance à l'augmentation de la résistance au triméthoprième, aux sulfamides et à la tétracycline, aussi bien chez les isolats *tox+* que chez les *tox-*, depuis 2012.

En ce qui concerne la résistance aux macrolides, recommandés en cas d'allergie aux pénicillines, le taux reste faible en 2018 (données non montrées).

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.

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. En 2018 cette collaboration a été élargie à deux autres laboratoires, un en Belgique et un autre en Pologne (voir ci-dessous ainsi que le point 1.5.2 de l'annexe 1).

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 le recensement de la biodiversité des souches du complexe *diphtheriae*.

Contrôles externes de qualité

Nous fournissons des contrôles externes de qualité à différents laboratoires Européens. En novembre 2018, nous avons organisé et envoyé 6 échantillons à PHE (Londres, UK), LMB (Bruxelles, Belgique) et également au National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control à Varsovie (Pologne). Pour chaque échantillon les laboratoires testés avaient pour but de rechercher, identifier et caractériser les isolats présents dans ces échantillons. Nous avons analysé les résultats et rendu notre évaluation à ces laboratoires (voir le point 1.5.2 de l'annexe 1).

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2018, 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).

4. Alerte

Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP :

Site : 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 et dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr), au même moment que le laboratoire expéditeur.

En 2018, 9 alertes pour des isolats obtenus à partir de prélèvements humains ont été données.

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 d'enseignement ni de formation aux professionnels de santé en ce qui concerne la diphtérie en 2018

Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques ;

- Pas de transfert des techniques en 2018

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) est envoyé par courrier postal 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 (dernières mises à jour le 05/11/2018 et le 19/03/2019) :

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

Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2017) 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 2018, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. Nous avons reçu 28 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 2018	
Hôpitaux	17
Pédiatres libéraux, Médecins généralistes, biologiste LABM	9
Collectivités	2
TOTAL	28

5.2 Conseils et expertise aux autorités sanitaires

En 2018, 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 sur 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 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. Lorsqu'il est nécessaire de comparer finement les isolats, nous réalisons une analyse basée sur les SNPs à l'échelle du génome (Pivot et al., 2019).

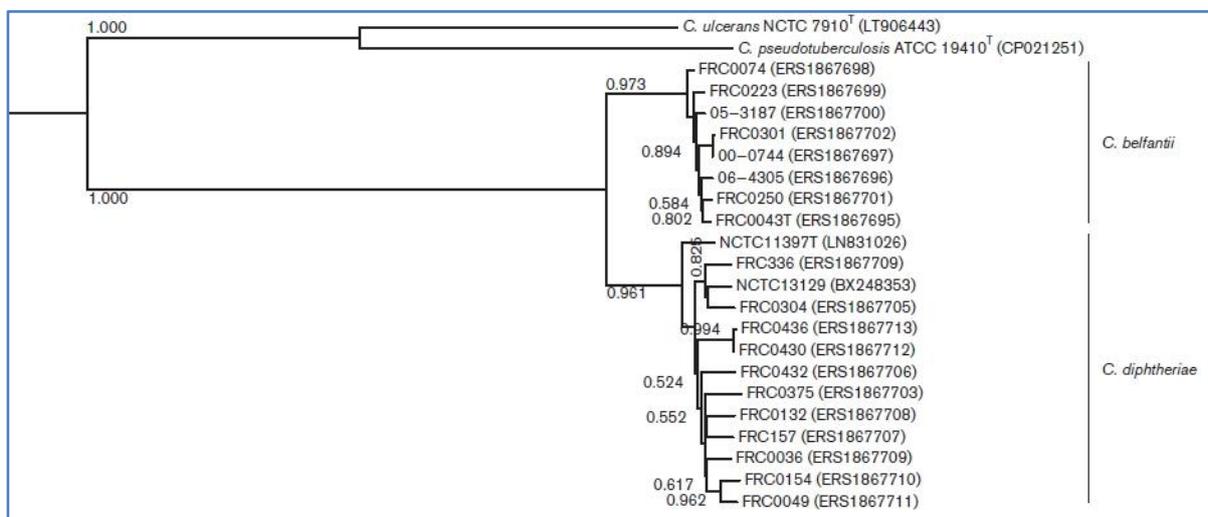
Caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons les profils de multirésistance. Nous réalisons un profilage génomique des gènes de résistance putatifs des isolats à partir de leur séquence génomique. Enfin, nous caractérisons les éléments génétiques mobiles qui portent les gènes de résistance.

Etude taxonomique du complexe *diphtheriae*

La taxonomie du complexe d'espèces proches de *C. diphtheriae* date de la publication par Riegel *et al.* (1988) de l'espèce *C. ulcerans*. Le séquençage génomique des souches de notre collection, en cours, montre l'existence de lignées phylogénétiques distinctes qui sont actuellement toute identifiées à *C. diphtheriae*. L'une d'elle correspondait à une identité génomique moyenne (ANI) à la souche type de *C. diphtheriae* de 95% à peu près (Figure). Elle correspond à la majorité des souches de biotype Belfanti de notre collection, et est différenciée par l'absence de fermentation du glycogène et de réduction du nitrate. Nous avons proposé le nom *C. belfantii* pour ce groupe, le démarquant ainsi de *C. diphtheriae* dans la taxonomie bactérienne. Aucune souche de cette nouvelle espèce n'est toxigène, ce qui souligne l'intérêt de la distinguer de *C. diphtheriae*. Ces résultats ont été publiés (Dazas *et al.*, IJSEM 2018).

Figure : Liens phylogénétiques dans le complexe *diphtheriae* déterminés par comparaison des séquences génomiques,

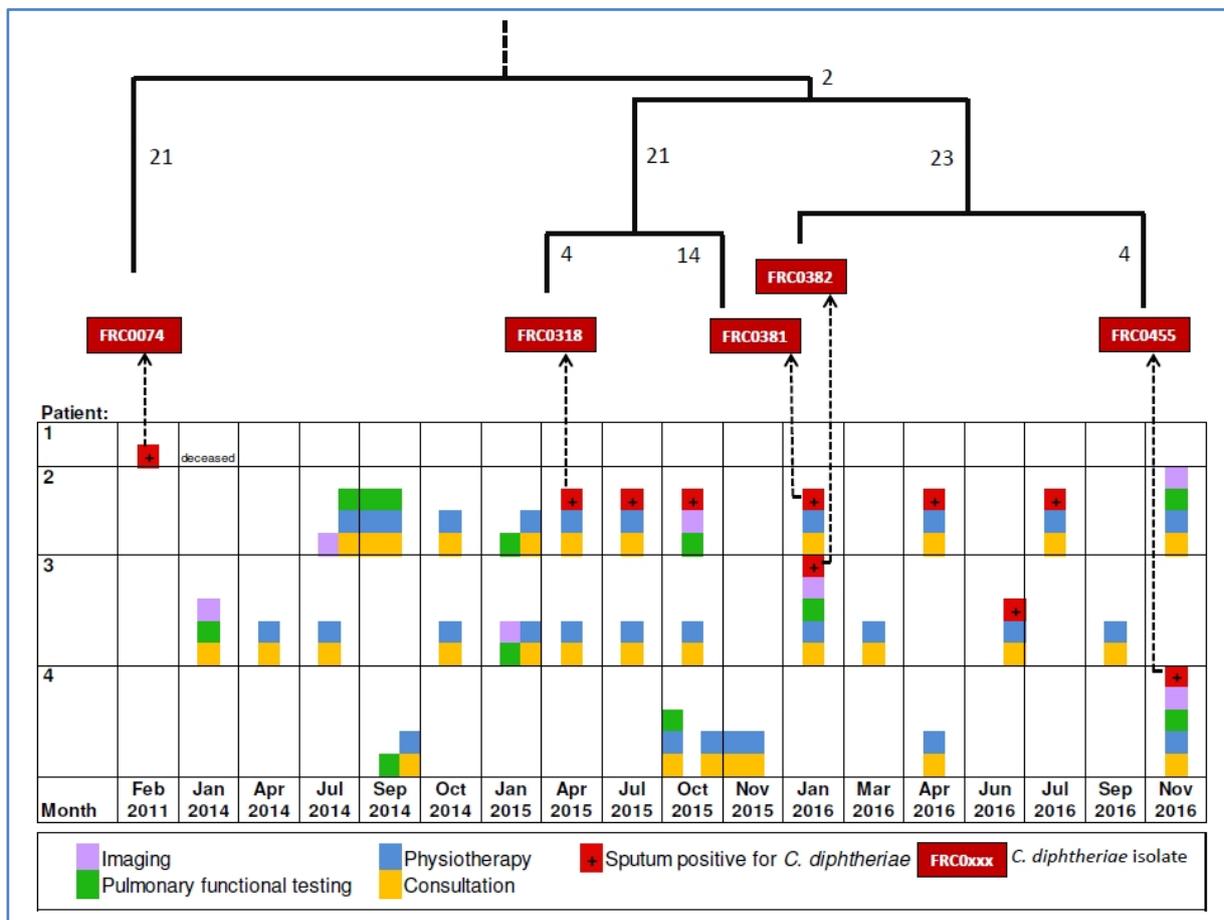


montrant la distinction de la nouvelle espèce *C. belfantii* de l'espèce *C. diphtheriae*.

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

Lors d'une collaboration avec le CHU de Dijon et le Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), Hôpital d'Enfants, Dijon, nous avons suspecté 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. Le séquençage du génome complet des isolats a confirmé qu'il s'agit d'une seule souche. De plus, certains des patients ont visité le centre de soins le même jour. Une étude de portage chez le personnel soignant du CHU de Dijon, proche des patients, n'a pas révélé de porteur sain. Les antibiogrammes et la génomique ont montré une évolution de la résistance à la ciprofloxacine chez une patiente. Les résultats suggèrent une transmission directe entre patients, et la persistance d'une même souche pendant au moins 6 ans dans cette population. Ces travaux ont été publiés en collaboration avec les collègues de Dijon (Pivot *et al.*, JCM 2019).

Figure : Suivi temporel des patients et liens phylogénétiques entre les souches de *C. diphtheriae*. Le nombre de SNPs entre les isolats est indiqué le long des branches de l'arbre phylogénétique.



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 :

- Pivot D, Fanton A, **Badell-Ocando E**, Benouachkou M, Astruc K, Huet F, Amoureux L, Neuwirth C, Criscuolo A, Aho S, **Toubiana J**, **Brisse S**. Carriage of a single strain of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti (*Corynebacterium belfantii*) in four patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2019 Feb 27. pii: JCM.00042-19. doi: 10.1128/JCM.00042-19.
- Scheifer C, Rolland-Debord C, **Badell E**, Reibel F, Aubry A, Perignon A, Patey O, **Brisse S**, Caumes E. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. Med Mal Infect. 2018 Dec 21. pii: S0399-077X(17)30962-9. doi: 10.1016/j.medmal.2018.12.001.
- Dazas M, **Badell E**, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, **Brisse S**. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018 Dec;68(12):3826-3831. doi: 10.1099/ijsem.0.003069. Epub 2018 Oct 24.

6.2.3 Communications nationales (invitées)

Aucune

6.2.4 Communications internationales (invitées)

Aucune. Nous prévoyons d'organiser une session dédiée à la diphtérie à l'ECCMID Paris 2020 et au Congrès SFM également (octobre 2020)

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

Cette nouvelle méthode décrite plus haut fera l'objet d'une demande d'accréditation et d'une publication dans l'année 2019.

Analyse du portage de Corynébactéries par les animaux de compagnie

En collaboration avec Santé publique France et des écoles vétérinaires, nous cherchons à évaluer le taux de portage des chats et chiens à *C. ulcerans*. Le criblage d'échantillons par le CNR devrait démarrer en 2019.

Développement d'une bandelette de diagnostic rapide pour la détection de la toxine

Nous avons le projet de contribuer au développement d'un test de diagnostic rapide de la diphtérie. Un financement a été obtenu récemment par l'unité qui héberge le CNR.

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 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. 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 certains isolats, tels ceux du biotype belfanti (*C. belfantii*), 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 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR

- **Poursuivre le développement de la collection d'isolats existants ;**
- **Poursuivre l'analyse de la résistance aux antibiotiques de tous les isolats** reçus au CNR ;
- **Participer à la surveillance épidémiologique** en confirmant ou infirmant l'identification de tous les isolats cliniques du complexe *diphtheriae*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*, reçus des laboratoires français ;
- **Assurer le maintien d'une compétence bactériologique** concernant les bactéries du complexe *diphtheriae* ;
- **Apporter un soutien technique** (conseils, informations bibliographiques ou épidémiologiques, vérification de souches) aux laboratoires de biologie médicale, hospitaliers ou privés ;
- **Contribuer au réseau de surveillance européen ;**
- **Participer aux contrôles de qualité européens.**
-

DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE

Démarche qualité des CNR de l'Institut Pasteur

Le CNR des Corynebactéries du complexe *diphtheriae* fait partie des 14 Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur. Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction des Affaires médicales et de Santé Publique ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

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

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

L'ensemble des CNR participe annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter-laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

L'année qualité 2018 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	16 au 20 janvier 2018
Revue qualité	19/03/2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audits internes qualité et technique	Audit technique : 19/09/2018 Audit qualité : 27/09/2018
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	En cours

Perspectives 2019 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	janvier-avril 2019
Audite COFRAC S6	15 au 19 Avril 2019
Audits internes qualité et technique	Audit technique : 29/05/2019 Audit qualité : à prévoir
Revue de direction LRE-MS	Mai 2019
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

La technique accréditée du CNR des Corynebactéries du complexe diphtheriae est la PCR en point final, utilisée pour la détection moléculaire du gène *tox*.

Le dossier de validation de la méthode qPCR est en cours de constitution ; elle est destinée à remplacer la PCR en point final.

1.5.2 Contrôle externe de qualité (CQE) du CNR

Pour les corynébactéries du complexe *diphtheriae* il n'existe pas de CQE commercial. De ce fait, en 2016 nous avons établi un accord pour faire un essai inter-laboratoire (EIL) avec Public Health England (PHE), Londres, et plus récemment avec le Laboratoire de Microbiologie à Bruxelles (LMB).

LMB nous a envoyé 6 échantillons en novembre 2018, et PHE 6 échantillons en décembre 2018. Pour l'année 2018 nous avons analysés seulement les échantillons en provenance du LMB.

La première étape a consisté à cultiver les échantillons et extraire leur ADN. Nous avons ensuite fait la PCR qui cible le gène *tox*, et la PCR multiplex qui cible les gènes *rpoB*, *ARNr16S* et *dtxR* pour l'identification. Ces deux PCRs sont des PCR en point final. Nous avons obtenu 100% de résultats corrects.

Dans un deuxième temps nous avons fait le test d'Elek qui détecte la production de la toxine diphtérique pour les 2 isolats porteurs du gène *tox* présents dans les échantillons reçus. Nous avons obtenu 100% de résultats corrects.

Enfin, nous avons réalisé les tests biochimiques pour déterminer le biovar pour les 2 isolats appartenant à l'espèce *diphtheriae*. Nous avons obtenu des résultats corrects pour les 2 isolats analysés.

En conclusion, tous les résultats des échantillons du CQE que nous avons analysés pour l'année 2018 sont conformes aux résultats attendus. En parallèle, les trois laboratoires auxquels nous avons envoyé des échantillons à analyser ont obtenu 100% des résultats conformes aux résultats que nous attendions. Ceci constitue aussi une confirmation, indirecte, de l'exactitude et de la qualité de nos analyses.

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

2.1. Liste des techniques de référence : diagnostique/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux antiinfectieux

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 permet 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 complémenté 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 2018 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

ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS

Ce document est confidentiel et son tirage a été fait à part.

ANNEXE 4:

Ce document est confidentiel et a été retiré du rapport public.