

Rapport annuel d'activité

2013

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

Année d'exercice

2012



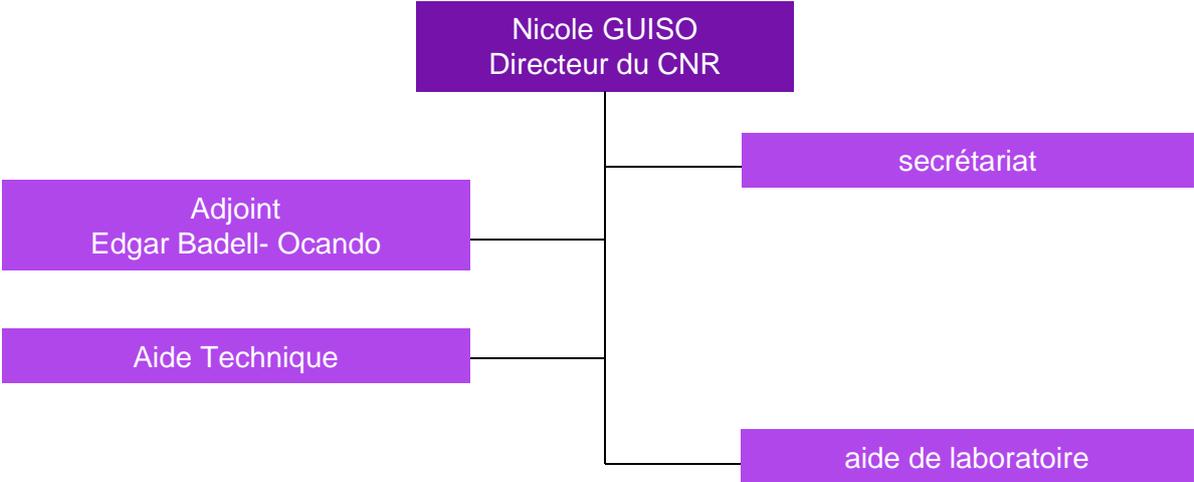
Table des matières

RESUME ANALYTIQUE.....	3
1. INTRODUCTION.....	4
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR-CCD	7
2.1.1 <i>Identification et caractérisation des bactéries du genre Corynebacterium, espèce diphtheriae, ulcerans et pseudotuberculosis</i>	<i>7</i>
2.1.2 <i>Constitution d'une collection</i>	<i>7</i>
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISES DE L'ANNEE 2012	7
2.2.1 <i>Introduction.....</i>	<i>7</i>
2.2.2 <i>Caractéristiques des isolats porteurs du gène tox.....</i>	<i>8</i>
2.2.3 <i>Caractéristiques des isolats non porteurs du gène tox.....</i>	<i>10</i>
2.2.4 <i>Isolats ne faisant pas partie du complexe diphtheriae.....</i>	<i>11</i>
2.2.5 <i>Autres identifications</i>	<i>11</i>
3. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE.....	12
3.1 INTRODUCTION	12
3.2 CAS DE DIPHTERIE EN FRANCE	12
4. ALERTE DURANT L'ANNEE 2012	13
5. ACTIVITES D'INFORMATION ET DE CONSEILS	13
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	14
6.1 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CNR-CCD	14
6.1.1 <i>Constitution d'une collection</i>	<i>14</i>
6.1.2 <i>Contrôles qualité.....</i>	<i>14</i>
6.1.3 <i>Propriétés des C. diphtheriae, ulcerans et pseudotuberculosis collectés en 2012.....</i>	<i>14</i>
6.1.4 <i>Amélioration de la technique de PCR en point final pour la détection du gène tox et détermination de sa robustesse</i>	<i>15</i>
6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE	16
6.2.1 <i>Analyse des résistances aux antibiotiques des isolats de la collection de l'Institut Pasteur et du CNR.....</i>	<i>16</i>
7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-CT.....	19
7.1 PUBLICATIONS INTERNATIONALES.....	19
7.2 PUBLICATIONS NATIONALES.....	19
7.3 COMMUNICATIONS NATIONALES.....	19
7.4 ENSEIGNEMENT.....	20
7.5 EXPERTISES	20
8. PROJETS DE RECHERCHE POUR 2013	20
8.1 PROJETS DE RECHERCHE DU CNR	20
8.1.1 <i>Constitution d'une collection</i>	<i>20</i>
8.1.2 <i>PCR en temps réel.....</i>	<i>20</i>
8.2 PROJETS DE L'UNITE DE RECHERCHE EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	21

RESUME ANALYTIQUE

- neuf cas d'infections dues à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique dont cinq, de biovar mitis, produisaient la toxine diphtérique ;
- douze cas d'infections à *C. diphtheriae* non porteur du gène *tox* ;
- deux cas d'infections à *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* dont un producteur de la toxine diphtérique ;
- Amélioration de la PCR permettant de détecter le gène *tox*.

Figure 1



1. INTRODUCTION

Le CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae* est hébergé au sein de l'unité de Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines (PTMMH) de l'Institut Pasteur. Cette unité poursuit des recherches sur les conséquences de la vaccination généralisée sur les microorganismes et la population humaine et sur le développement d'outils thérapeutiques et diagnostiques.

Le CNR collabore avec O. Patey et S. Dellion (Hôpital de Villeneuve Saint-Georges) pour les aspects cliniques.

Les missions du CNR-CCD en 2012 ont été de :

- **Poursuivre le développement de la collection d'isolats existants :** Toutes les corynebactéries du complexe *diphtheriae* collectées en 2012 ont été caractérisées et mises en collection
- **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.**

Equipe :

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur la **Figure 1**. Ce CNR fait partie de l'unité PTMMH qui comprend aussi un directeur de recherche CNRS, trois autres ingénieurs, trois techniciens supérieurs, trois étudiants en thèse et un étudiant en Master.

Démarche qualité des Laboratoires de Référence et d'Expertise (LRE) : synthèse 2012

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 des LRE de l'Institut Pasteur :

➤ **Bilan des actions réalisées en 2012 :**

Paris :

- Mise en place du Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode
- Formations : ISO 15189 (2 collaborateurs par LRE), WebCampus et Kalilab
- Direction déléguée aux Ressources Techniques et à l'Environnement et Direction Médicale : Lettre d'engagement de moyens pour le projet ISO 15189
- Audits internes ISO 15189 pour 3 CNR, la CIBU et 5 services supports
- Recrutement ingénieur qualité
- Politique et manuel qualité LRE-Multi-Site (LRE-MS) avec inclusion de la CIBU dans le périmètre d'accréditation
- Dépôt du dossier COFRAC (Novembre 2012)
- Installation de Kalilab (module Fiche Qualité) sur 15 sites (CNR et CIBU)

Lyon / RIIP :

- Démarrage de l'accompagnement QE-DD/PREISO sur les CNR de Lyon et de la Guyane

➤ **Perspectives 2013-2014 :**

- Audit interne qualité et technique ISO 15189 : Avril 2013
- Revue de direction LRE-MS : 26 Avril 2013

Figure 2 : Politique qualité de l'Unité de Recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » du CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*

La politique qualité de l'Unité PTMMH est de répondre toujours mieux :

- ▶ à ses missions de Centres nationaux de Référence et d'Unité de recherche
- ▶ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Cliniciens et Médecins, Industriels, Partenaires scientifiques.

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

Dans cette dynamique, voici les objectifs de l'unité pour 2013 :

- Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité sera donc particulièrement vigilante :
 - à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
 - au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.
- Nous porterons également nos efforts sur l'optimisation des performances (en terme de sensibilité et de spécificité) de nos techniques de PCR et sur la mise au point d'une technique de PCR temps réel.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun cherchera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification plus efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.
- Enfin, les chercheurs et techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la planification des expériences et au pilotage des projets via l'élaboration de protocoles d'expériences décrivant les objectifs du projet, les moyens et les techniques à mettre en oeuvre pour les atteindre, les résultats attendus et les risques de ne pas aboutir comme prévu (identification et prise en compte des freins probables)
- Dans le cadre de la politique qualité du CNR l'unité s'engage dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189, pour la technique de détection du gène *tox* qui code la toxine diphtérique chez les corynebactéries du complexe *diphtheriae* par PCR en point final de la diphtérie.

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

- à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants,
- à poursuivre la mise en place d'un système de gestion de la qualité qui réponde aux prescriptions de la norme ISO/CEI 15189.

Et j'invite l'ensemble du personnel à veiller au respect des politiques et des procédures dans la réalisation de ses travaux.

Nicole Guiso, Responsable de l'Unité
Actualisation le 4 février 2013

- Audit initial COFRAC : Juin 2013 (*indicatif*)
- GT technique LRE 1ere et 2ème vague : Juin et octobre 2013
- Finalisation dossiers de validation de méthode (1ère et 2ème vagues) : Décembre 2013
- Revues qualité LRE : Janvier 2014
- Audit interne : Février 2014

Revue de direction LRE-MS : Mars 2014

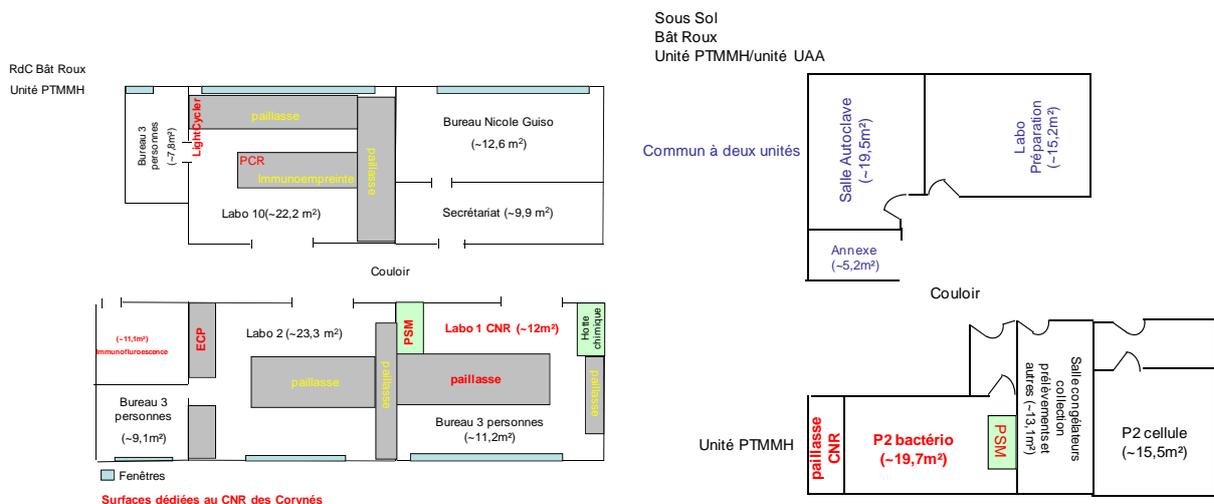
Politique qualité du CNR des *Corynebactéries* du complexe *diphtheriae*

La politique qualité de l'unité est résumée **Figure 2**. Chacune des techniques utilisées au CNR a un mode opératoire qui est géré par le **logiciel web campus** accessible à tous les membres du CNR et de l'unité. Ces modes opératoires peuvent être distribués aux laboratoires français ou étrangers qui en font la demande. L'ensemble des produits utilisés est colligé dans le **logiciel Lab collector**. Enfin, la métrologie de nos équipements est gérée par le **logiciel Oceasoft**. L'Assurance Qualité est gérée par l'unité de Recherche.

Locaux et équipements :

L'ensemble des missions du CNR est réalisé à l'Institut Pasteur dans les locaux qui sont représentés sur la **Figure 3**.

Figure 3 : plan des locaux



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR-CCD

2.1.1 Identification et caractérisation des bactéries du genre *Corynebacterium*, espèce *diphtheriae*, *ulcerans* et *pseudotuberculosis*

L'ensemble des données concernant les isolats cliniques reçus au laboratoire est informatisé.

La recherche du gène *tox* se fait par PCR après extraction du matériel génétique de la bactérie. La production de la toxine est recherchée par le test Elek. L'identification des bactéries se fait dans un premier temps par PCR suivie par les techniques d'identification des bactéries classiques : Gram, API Coryne, tests Rosco, Hiss sérum.

La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* est réalisée à l'aide de disques. Les diamètres critiques retenus sont ceux définis dans les recommandations 2012 de la Société Française de Microbiologie. Si une résistance est observée la détermination de la CMI est réalisée par E-test.

Tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* reçus au laboratoire et ceux de la collection sont conservés en double dans deux congélateurs à -80°C différents, chacun branché sur une alimentation électrique indépendante.

2.1.2 Constitution d'une collection

Notre collection regroupe 189 isolats reçus au CNR entre 2000 et 2012 et 125 souches de référence conservées à la Collection de l'Institut Pasteur (CIP). L'ensemble de ces isolats a été re-caractérisé avec les techniques nouvellement développées, en ce qui concerne le biotype, la présence du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique. L'ensemble des nouvelles caractéristiques des souches de référence a été ajouté dans le catalogue de la CIP. La sensibilité de tous ces isolats et souches de référence aux antibiotiques est en cours ainsi que leur typage par la technique du MLST.

2.2 ACTIVITES D'EXPERTISES DE L'ANNEE 2012

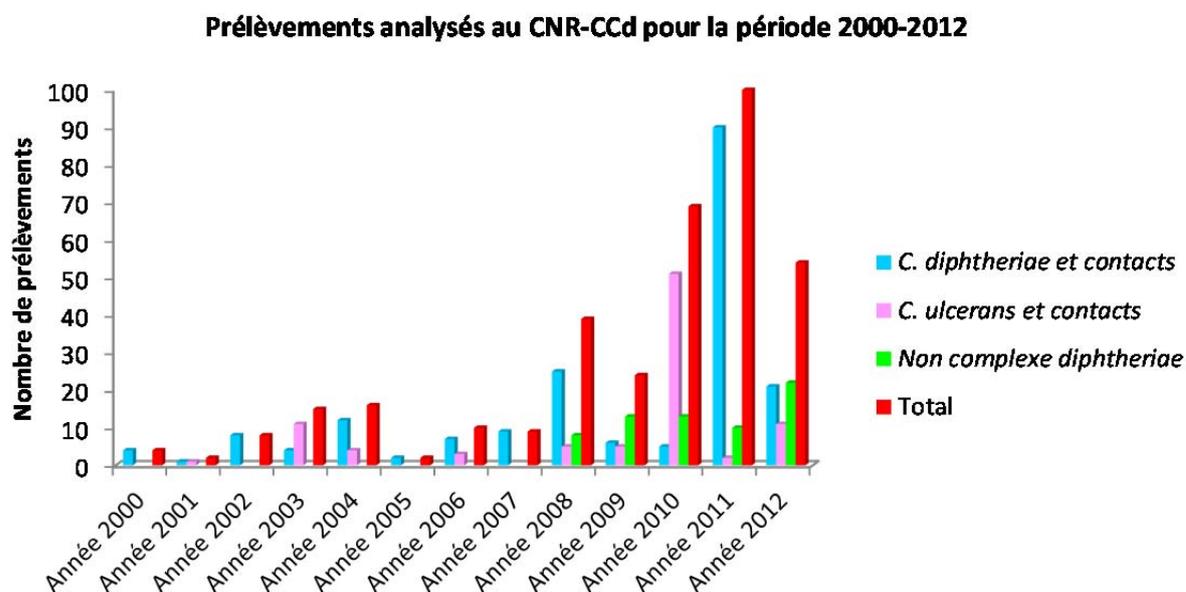
2.2.1 Introduction

L'activité du CNR a augmenté depuis 2008 (date à laquelle il a été placé sous la responsabilité de l'unité Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines) comme indiqué sur la **Figure 4**.

Tableau 1 : Caractéristiques des isolats porteurs du gène tox

N° CNR	Patient/Sexe vaccin	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène tox	Production de toxine	ST
FRC0137	58 ans/M Inconnu	Plaie	France, Creil (Pakistan)	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, Kanamycine, Triméthoprime-sulfaméthoxazole, Tétracycline, Rifampicine, Ciprofloxacine, Sulfaméthoxazole, Triméthoprime	+	+	136
FRC0139	92 ans/M Inconnu	Plaie	France, Creil	<i>C. ulcerans</i>	Fosfomycine	+	+	ND
FRC0147	79 ans/F Mise à jour le 04/12/2012	Plaie	France, Vierzon	<i>C. ulcerans</i>	Fosfomycine	+	-	ND
FRC0154	46 ans/M Inconnu	Plaie	France, Colmar (Madagascar)	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, Sulfaméthoxazole, Triméthoprime	+	+	91
FRC0101	35 ans/M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, Triméthoprime, Sulfamides/ Triméthoprime-sulfaméthoxazole (3mg/L)	+	-	238
FRC0114	33 ans/M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, au Triméthoprime Sulfamides/ Triméthoprime-sulfaméthoxazole (3mg/L)	+	-	238
FRC0119	8 ans/M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	+	-	241
FRC0140	38 ans/M Revaxis, dernière dose 31/07/2012	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine Tétracycline	+	+	241
FRC0141	13 ans/M DCTP dernière dose le 18/07/2008	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, Sulfaméthoxazole	+	+	241
FRC0150	6 ans/F Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine Sulfaméthoxazole Triméthoprime	+	-	238
FRC0151	4 ans/F dernière dose en 2010	Gorge	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	+	+	252

Figure 4. Nombre de prélèvements et isolats analysés entre 2000 et 2012



En 2012, nous avons reçu 54 prélèvements et/ou isolats provenant de France métropolitaine, de Mayotte, de Tahiti et de Wallis et Futuna

2.2.2 Caractéristiques des isolats porteurs du gène *tox*

Les caractéristiques de ces isolats, qui provenaient soit de France métropolitaine, soit de Mayotte, se trouvent dans le tableau 1.

France Métropolitaine :

- Deux isolats de *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* ont été reçus au CNR. Les deux provenaient de prélèvements cutanés, sont producteurs de toxine diphtérique et ont un biotype mitis. L'isolat FRC0137 provenait d'un patient d'origine pakistanaise ayant séjourné récemment au Pakistan, dont le statut vaccinal était inconnu. Il est multi-résistant : Fosfomycine, Kanamycine, Tétracycline, Rifampicine, Ciprofloxacine, Sulfaméthoxazol et Triméthoprime. L'isolat FRC0154 provenait du prélèvement d'un patient ayant séjourné récemment à Madagascar, dont le statut vaccinal était aussi inconnu. Il est résistant à la Fosfomycine, au Sulfaméthoxazole et au Triméthoprime
- Deux isolats de *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* ont aussi été reçus. Les deux provenaient de prélèvements cutanés. Les deux patients avaient 92 et 79 ans et soit

n'était pas à jour de leurs vaccinations soit avait un statut vaccinal inconnu. Un des patients (FRC0139) ne possédait pas d'animal de compagnie mais était souvent en contact avec des amis ou des membres de sa famille qui possédaient des chats et des chiens. Sept prélèvements vétérinaires réalisés dans l'entourage de ce cas ont été analysés au CNR et tous se sont avérés négatifs puisqu'il n'a pas été possible de mettre en évidence ni la présence du gène *tox* ni celle de bactéries appartenant au complexe *diphtheriae*. L'autre patient (FRC0147) avait un lapin sur lequel deux prélèvements ont été réalisés et qui ont été analysés au CNR. Les deux se sont avérés négatifs. Les deux isolats de *C. ulcerans* sont résistants à la Fosfomycine et un seul est producteur de toxine.

Mayotte :

Tous les isolats reçus de Mayotte, porteurs du gène *tox*, provenaient de plaies chez des sujets âgés de 6 à 38 ans, excepté l'isolat FRC0151, obtenu à partir d'un prélèvement de gorge chez un enfant asymptomatique de 4 ans, qui avait été prélevé suite à une enquête épidémiologique dans l'entourage du cas FRC0141. Aucun des patients n'avait de signe toxinique. Il est à noter que certains des isolats, exprimant la toxine ont été prélevés sur des sujets correctement vaccinés. Un isolat résistant à la Tétracycline et surtout 4 isolats sur 7 sont résistants au Sulfaméthoxazole ou au Sulfaméthoxazole/Triméthoprim.

2.2.3 Caractéristiques des isolats non porteurs du gène tox

Les caractéristiques des isolats reçus de France métropolitaine et des DOM-TOM sont indiquées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des isolats non porteurs du gène tox

N° CNR	Patient/Sexe vaccinn	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène tox	ST
FRC0126	50 ans/M Inconnu	Plaie	France, Paris (SDF Polonais)	<i>C. diphtheriae</i> var gravis	Fosfomycine	-	8
FRC0132	9 ans/M A jour	Plaie	France, Le Chesnay, (retour du Mali)	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine, Tétracycline/ Triméthoprime (6 mg/L).	-	251
FRC0133	7 ans/F Inconnu	Plaie	France, Nantes,	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	-	En cours
FRC0138	66 ans/M Inconnu	Oreille	France, Boe	<i>C. diphtheriae</i> var belfanti	Fosfomycine	-	En cours
FRC0103	29 ans/M A jour	Plaie	Wallis et Futuna	<i>C. diphtheriae</i> var gravis	Fosfomycine	-	239
FRC0104	48 ans/M Inconnu	Plaie jambe	Wallis et Futuna	<i>C. diphtheriae</i> var gravis	Fosfomycine	-	240
FRC0105	63 ans/F Pas à jour	Plaie jambe	Wallis et Futuna	<i>C. diphtheriae</i> var non déterminé	Non réalisé car très contaminée, non isolé	-	ND
FRC0118	3 ans/M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	-	250
FRC0129	70 ans/M Inconnu	Pied, infection sous aponévrotique	Tahiti, Papeete,	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	-	119
FRC0134	23 ans/M Inconnu	Cutané, plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var gravis	Fosfomycine	-	101
FRC0135	17 ans/F Inconnu	Cutané, plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> var mitis	Fosfomycine	-	En cours

France métropolitaine :

Trois des isolats provenaient de prélèvements cutanés, deux chez des enfants de 7 et 9 ans et un chez un adulte de 50 ans. Le statut vaccinal était inconnu pour deux d'entre eux. Un seul isolat provenait d'un prélèvement fait dans l'oreille d'un homme de 66 ans. Ces isolats ont des biotypes différents, sont tous résistants à la Fosfomycine et un seul est en plus résistant à la Tétracycline et a une susceptibilité intermédiaire au Triméthoprime (CMI = 6 mg/L).

Mayotte, Tahiti et Wallis et Fotuna :

Comme observé pour les isolats porteurs du gène *tox*, les isolats *tox*- provenaient aussi toujours de prélèvements cutanés. L'âge des sujets variait entre 3 et 63 ans. Leur statut vaccinal était inconnu, excepté pour un sujet de 29 ans, à jour de ses vaccinations.

2.2.4 Isolats ne faisant pas partie du complexe diphtheriae

Nous avons aussi eu à traiter 5 isolats initialement identifiés comme des *C. diphtheriae* ou *C. pseudotuberculosis* par les laboratoires de biologie médicale et hospitaliers mais qui se sont avérés après identification ne pas faire partie du complexe *diphtheriae*. Ceci souligne l'importance de la confirmation de l'identification.

2.2.5 Autres identifications

Depuis que nous avons repris le CNR en 2008, plusieurs identifications erronées nous sont parvenues.

En particulier, nous avons observé que les identifications par API coryne posent des problèmes surtout au niveau de *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* et les identifications par Vitek peuvent être fausses, au niveau des trois espèces. Seules les identifications par spectrométrie de masse, n'ont jamais posé de problème.

Pendant l'année 2012, nous avons reçu 12 échantillons qui nous ont été adressés pour recherche du gène *tox* et du matériel génétique de bactéries appartenant au complexe *diphtheriae* en raison de symptômes cliniques suggestifs d'une angine diphtérique. Ces échantillons se sont tous avérés négatifs : un isolat mal identifié par la galerie API Coryne, 3 par Vitek et 1 pour lequel la méthode d'identification n'a pas été renseignée.

3. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE

3.1 INTRODUCTION

En 1994, l'OMS proposait que la diphtérie soit la prochaine maladie éliminée en Europe, cependant dans les années 1990 l'incidence de la diphtérie augmenta de nouveau dans certains états de l'Europe de l'Est en raison de la diminution de la couverture vaccinale! Cette couverture a augmenté depuis mais il y a toujours des cas mortels dus à des *C. diphtheriae* producteurs de toxine diphtérique dans des régions telle la Lettonie. En 2009, la Lettonie est la seule région avec une incidence de plus de 1/million (2,67). La maladie due à *C. diphtheriae* est très contagieuse et il est donc important de rechercher tous les contacts et de les traiter pour arrêter la transmission. Les cas de diphtérie, dans les zones où la maladie est endémique sont des cas dus dans 99% des cas à des bactéries ayant le biotype gravis. Les groupes à risque sont les nouveau-nés non vaccinés et les plus de 40 ans dont l'immunité a diminué sans rappel vaccinal. La vaccination montre un effet protecteur très significatif mais des progrès sont à faire pour rappeler à la population vieillissante que les rappels vaccinaux ne sont pas que pour les enfants !

L'autre phénomène nouveau est l'apparition dans les régions à haute couverture vaccinale, comme l'Allemagne, les Etats Unis d'Amérique, la France ou le Royaume-Uni, de cas de diphtérie à *C. ulcerans*. Parmi tous les cas rapportés en Europe, 94% sont des patients ayant eu un contact avec un animal de compagnie. Dans deux cas l'isolat a été collecté chez l'homme et son chien et les deux isolats étaient semblables. Récemment, des *C. ulcerans* ont été isolés chez des chats domestiques.

Pour ces deux raisons majeures, il est important de continuer à surveiller les cas d'infections aux bactéries du complexe *diphtheriae*.

3.2 CAS DE DIPHTERIE EN FRANCE

En France, depuis la généralisation de la vaccination en 1945, la diphtérie est contrôlée et entre 1990 et 2001 aucun cas n'a été déclaré. Depuis 2002, 111 isolats ont été reçus au CNR. Parmi ces cas, 31 étaient dus à des Corynebactéries porteurs du gène *tox* (9 *C. diphtheriae* et 22 *C. ulcerans*). Les cas dus à des *C. diphtheriae* étaient des cas importés. En 2012, les deux cas de diphtérie étaient des diphtéries cutanées, importées du Pakistan (FRC0137) et de Madagascar (FRC0154) (voir le point 6.1.3). Les cas dus à des *C. ulcerans* étaient dans la majorité des personnes possédant des animaux de compagnie ou en contact assez souvent avec des personnes ayant des animaux de compagnie. Les infections concernent le plus souvent des adultes qui

n'avaient pas eu de rappel vaccinal récent. En 2012 tous les cas étaient aussi des diphtéries cutanées.

En ce qui concerne les 65 isolats non porteurs du gène *tox*, on s'aperçoit que leur nombre varie selon les espèces. Les 61 *C. diphtheriae tox-* représentent 82,4% des *C. diphtheriae* reçus au CNR. Ils ont été collectés sur des sujets de 2 à 94 ans.

En ce qui concerne les isolats de *C. ulcerans* non porteurs du gène *tox*, ils ne représentent que 17% des isolats reçus au CNR et sont collectés sur des sujets de 52 à 74 ans et vaccinés ou pas.

Ces observations suggèrent :

- Que les *C. diphtheriae tox+* ne circulent plus en France mais que les *C. diphtheriae tox-* circulent toujours ;
- Que les *C. ulcerans tox+* circulent et affectent surtout les personnes âgées en contact avec des animaux de compagnie.

4. ALERTE DURANT L'ANNEE 2012

Les alertes sont réalisées selon les nouvelles recommandations (site http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304_conduitediphterie.pdf). Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis* porteurs du gène *tox*, 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 l'InVS par téléphone et par courriel (diphtherie-invs@invs.sante.fr) ainsi que le laboratoire expéditeur. Onze alertes ont été faites pendant l'année 2012.

5. ACTIVITES D'INFORMATION ET DE CONSEILS

Site internet du CNR : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/coryndipht-index.html>

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

6.1 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CNR-CCD

6.1.1 Constitution d'une collection

Nous avons, en 2012, poursuivi la constitution d'une collection avec le maximum de renseignements au niveau des caractéristiques de chaque isolat.

6.1.2 Contrôles qualité

6.1.2.1 Détection du gène *tox* et identification.

Nous avons participé au contrôle qualité organisé par le Centre OMS pour la détection du gène *tox* et l'identification des isolats appartenant au complexe *diphtheriae*. Six échantillons lyophilisés nous ont été envoyés pour recherche du gène *tox* et identification. Nous avons réussi, comme en 2010, le contrôle à 100%.

6.1.2.2 Sérologie

Nous avons participé au contrôle qualité organisé par l'ECDC : Evaluation and Assessment of Serological Immunity Methods and EQA Scheme of Diphtheria. Cent cinquante échantillons ont été testés deux fois. Nous avons utilisé le kit commercialisé par Virotech. Ce kit détecte les IgG anti toxine diphtérique et est utilisé par les laboratoires de biologie médicale français. Les résultats que nous avons obtenus ont été comparés avec ceux obtenus par le laboratoire utilisant le test de référence de séro-neutralisation de la toxine en présence de cellules Véro. La corrélation obtenue entre le kit commercial et le test de référence est faible ($\rho=0.44$). Des résultats semblables ont été obtenus par l'autre laboratoire qui avait utilisé aussi le même kit. Cependant, tous les sérums considérés négatifs par le test de référence ont été trouvés négatifs avec le kit Virotech. La très faible corrélation concerne les sérums positifs et intermédiaires qui est due à la plus grande sensibilité du test de référence par rapport à celle du test Virotech.

6.1.3 Propriétés des *C. diphtheriae*, *ulcerans* et *pseudotuberculosis* collectés en 2012

Outre l'identification, la recherche du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique par le test Elek (*nous rappelons à ce propos que nous pouvons réaliser ce test grâce à notre collaboration avec l'Institut Pasteur de St. Petersbourg. Ce test ne pourra être réalisé si le*

CNR quitte l'Institut Pasteur) nous avons mis en place en routine le typage des isolats reçus au CNR par la technique du MLST suivant la technique que nous avons publiée (**Bolt et al., J Clin Microbiol, 2010 : 4177-4185**). Cette technique nous a permis de confirmer, pour certains cas de diphtérie dus aux isolats *tox+*, qu'il s'agissait bien de cas importés. En effet, le ST de l'isolat FRC018, obtenu chez une patiente revenant d'un voyage en Russie, est ST8. Le ST8 est retrouvé dans un grand nombre d'isolats circulant en Russie et Europe de l'est. Le ST de l'isolat FRC0137, ST136, obtenu chez un sujet Pakistanais voyageant régulièrement au Pakistan, correspond au même ST que celui d'un cas d'importation décrit au Canada chez un sujet revenant d'un voyage en Inde (**Mina NV et al, J Clin Microbiol. 2011 : 4003-5**). De même pour l'isolat FRC0154 qui a été isolé chez un individu revenant de Madagascar. Le ST de l'isolat FRC0154 est ST91 et ce ST a été trouvé aussi chez deux isolats obtenus à Mayotte et Madagascar.

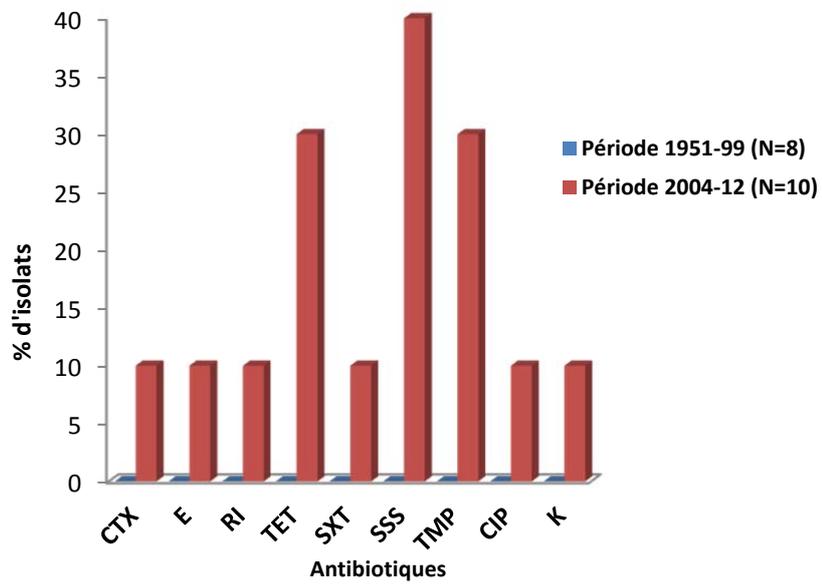
Concernant le ST des isolats *tox-*, nous avons pu montrer (i) qu'un ST prédominant pouvait être responsable d'infections épidémiques (ii) qu'un ST pouvait se retrouver dans plusieurs zones géographiques indiquant sa capacité à se propager et, (iii) qu'un ST comprend des isolats pouvant causer des bactériémies mais aussi des infections non invasives telle une diphtérie.

6.1.4 Amélioration de la technique de PCR en point final pour la détection du gène *tox* et détermination de sa robustesse

La technique de détection du gène *tox* par PCR en point final que nous utilisons au CNR a été adaptée à partir de celle publiée par Hauser *et al* en 1993 (**Hauser et al, J Clin Microbiol. 1993 ; 31:2720-2723**). Cependant, dans les conditions décrites par Hauser *et al*, si le résultat était négatif, il n'était pas possible de distinguer entre l'absence d'ADN bactérien ou la présence d'inhibiteurs dans les tubes correspondants aux ADN des isolats. Nous avons donc décidé d'ajouter un contrôle : l'amplification d'un gène porté par le chromosome des bactéries qui atteste de la présence d'ADN bactérien dans l'échantillon, le gène codant l'ARN 16S. Pour cela nous avons ajouté une paire d'amorces, U5 et U4a, qui permet d'amplifier un fragment des 480 paires de bases du gène *ARNr 16S* présent dans la majorité des bactéries connues. Cette modification est très importante car la présence de la bande de 480 pb sur le gel permet de confirmer d'une part, qu'il n'y a pas eu d'inhibition de la PCR et permet de valider, d'autre part, le résultat négatif quand l'ADN des isolats analysés ne porte pas le gène *tox*.

L'introduction de la paire d'amorces U5 et U4a pour amplifier le fragment du gène *ARNr 16S*, nous a conduit aussi à modifier la température d'hybridation de 62°C à 68°C pour pouvoir

Figure 5



amplifier le fragment du 480 paires de bases en même temps que le fragment de 910 pb du gène *tox*. En conclusion, les modifications apportées rendent la PCR beaucoup plus fiable.

En parallèle, dans le cadre de l'accréditation de cette technique à la norme iso 15189 nous avons été amenés à déterminer sa robustesse. Pour cela, nous avons réalisé des tests qui ont consisté à faire varier les lots, les volumes de réactifs de 20% (en moins ou en plus) et l'opérateur, et nous n'avons pas observé de différences au niveau des résultats obtenus par rapport aux conditions standards.

Nous avons aussi testé l'influence de la variation de température du thermocycleur sur le résultat obtenu. Un écart de température pour les 4 étapes de la PCR (dénaturation, hybridation, amplification et refroidissement) de 2°C de moins ou un écart de température supérieur de 3°C de plus, conduisent à l'inhibition de l'amplification du gène *tox*. La variation de température qui aboutit à l'inhibition de la PCR est supérieure à l'Erreur Maximum Tolérée (EMT) qui est de +/- 1°C. Pour maîtriser ce paramètre un contrôle métrologique du thermocycleur est effectué annuellement afin de vérifier l'écart de température acceptable. De plus l'utilisation systématique d'un témoin positif confirme le bon déroulement de l'expérience.

En conclusion, nous avons trouvé que le niveau de robustesse de la technique de détection du gène *tox* par PCR en point final est en accord avec les besoins du CNR.

6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE

6.2.1 Analyse des résistances aux antibiotiques des isolats de la collection de l'Institut Pasteur et du CNR

6.2.1.1 Isolats *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox*

France métropolitaine :

Figure 5 : Analyse temporelle de la résistance aux antibiotiques des isolats *C. diphtheriae tox+*

La période analysée va de 1951 à 1999 puis de 2004 à 2012. La plupart des isolats porteurs du gène *tox* collectés en France Métropolitaine depuis 1951 sont sensibles à l'amoxicilline, la pénicilline et aux macrolides. Cependant, comme indiqué dans la **Figure 5**, on observe une tendance à l'augmentation de la résistance à 9 antibiotiques pour les isolats porteurs du gène *tox* collectés récemment. Il y a très peu d'isolats résistants à plus d'un antibiotique sauf un en 2012 (FRC0137).

Mayotte :

Figure 6

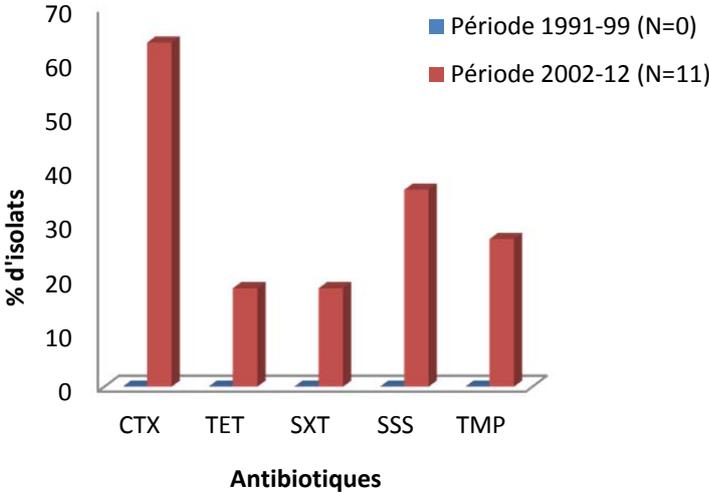


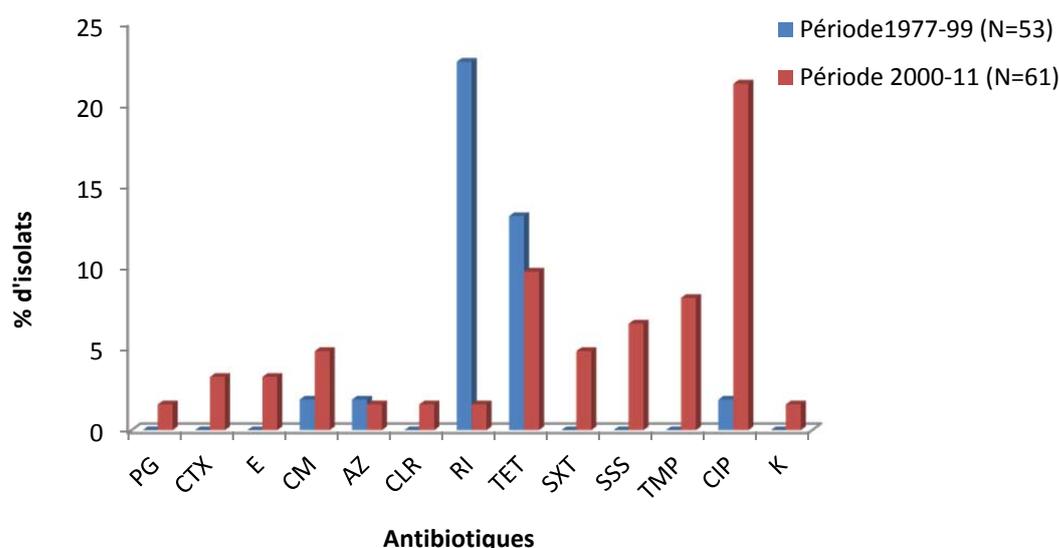
Figure 6 : Analyse temporelle de la résistance aux antibiotiques des isolats *C. diphtheriae* *tox+*

Comme indiqué **Figure 6**, il n'y pas eu d'isolats porteurs du gène *tox* reçus à l'Institut Pasteur en provenance des DOM-TOM pendant la période 1991-1999. Similairement aux isolats porteurs du gène *tox* collectés en France métropolitaine, tous les isolats *tox+* collectés à partir de 2002 à Mayotte sont sensibles à l'Amoxicilline, la Pénicilline et aux Macrolides. Cependant, on observe (**Figure 6**) une résistance très élevée au Céfotaxime ainsi qu'une augmentation de la résistance, ou une diminution de la sensibilité, pour le Sulfaméthoxazole, le Triméthoprime, le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole et à la Tétracycline.

6.2.1.2 Isolats *C. diphtheriae* non porteurs du gène *tox*

France métropolitaine :

Figure 7 : Analyse temporelle de la résistance aux antibiotiques des isolats *C. diphtheriae* *tox-*

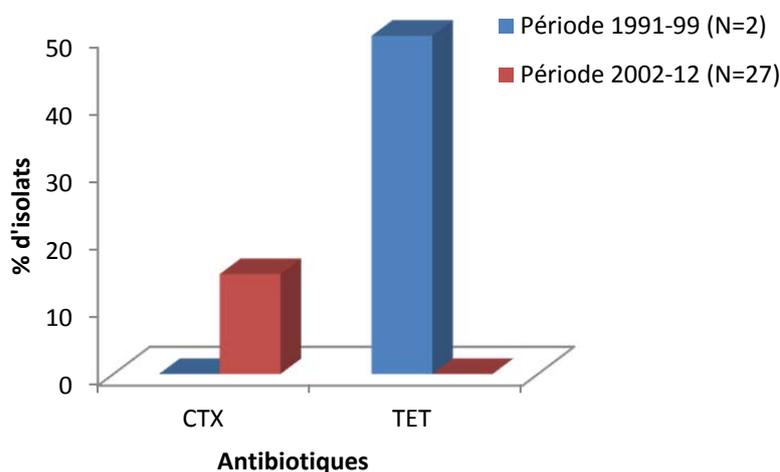


L'analyse des isolats non porteurs du gène *tox* collectés en France Métropolitaine montre qu'ils sont tous sensibles à l'Amoxicilline, à la Pénicilline et aux Macrolides. Cependant, une diminution temporelle de la sensibilité ou une résistance a été observée pour 8 des antibiotiques testés (**Figure 7**) en particulier, depuis 2000 des résistances à la Tétracycline et la Ciprofloxacine.

DOM-TOM :

Figure 8: Analyse temporelle de la résistance aux antibiotiques des isolats *C. diphtheriae*

tox-



Tous les isolats porteurs du gène *tox* collectés dans les DOM-TOM sont aussi sensibles à l'Amoxicilline, la Pénicilline et aux Macrolides. Comme indiqué sur la Figure 8, les isolats *tox*-collectés à partir de 2002 ont aussi une tendance à être résistants au Céfotaxime, comme en France métropolitaine.

Les résultats obtenus aussi bien pour les isolats circulant actuellement en France Métropolitaine que pour ceux circulant dans les DOM-TOM, sont rassurants. **En effet, ces isolats sont tous sensibles aux antibiotiques utilisés en première intention devant la suspicion d'un cas de diphtérie.** Cependant, il est important de continuer la surveillance en raison de la tendance observée concernant l'augmentation de la résistance, ou la diminution de la sensibilité, mise en évidence vis-à-vis de certains antibiotiques.

7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-CT

7.1 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2012

1. **Farfour F, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, Guiso N.** Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland (2012) **J. Clin Microbiol.** 50(1): 173-175
2. **Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern A-S, Lefleche A, Badell E, Guiso N, Leclercq A, Le Monier A, Lecuit M, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Raymond J, Vimont S, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, Lécuyer H, Beretti J-L, Vay C, Berche P, Ferroni A, Nassif X, Join-Lambert O.** Evaluation of the Andromas Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Aerobically growing Gram-Positive Bacilli. (2012) **J. Clin. Microbiol.** 50(8)2702:2707

7.2 PUBLICATIONS NATIONALES

3. **Guiso N.** Le nouveau visage de la diphtérie. **Revue francophone des Laboratoire** (2012) 439Bis:34-35

7.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

2012

1. **Guiso N.** "Le nouveau visage de la diphtérie". Journée de Biologie clinique Paris 16 janvier 2012.
2. **Farfour E., Badell E, Dinu S, Guillot S, Guiso N.** "Pourquoi certaines corynebactéries du complexe *diphtheriae* possédant le gène codant la toxine diphtérique ne l'expriment pas ?" RICAI Paris, 23 novembre 2012

7.4 ENSEIGNEMENT

2012

Nicole Guiso :

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses, exemple de la coqueluche et de la diphtérie" - Institut Pasteur – le 8 février 2012 (3 heures)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of Pertussis and Diphtheria" Institut Pasteur - le 28 mars 2012 (1h30)

Dans le cadre du cours DIU de vaccinologie et prévention des Maladies Infectieuses: "vaccination diphtérique" Faculté Trousseau - 13 décembre 2012

7.5 EXPERTISES

En 2012 **Nicole Guiso** a participé au groupe de travail sur la modification des recommandations concernant la déclaration obligatoire des infections par les bactéries du complexe *diphtheriae*.

8. PROJETS DE RECHERCHE POUR 2013

8.1 PROJETS DE RECHERCHE DU CNR

8.1.1 Constitution d'une collection

La poursuite de cette collection ne sera possible que si les microbiologistes hospitaliers envoient leurs isolats cliniques au CNR. La collection des isolats est très importante afin de surveiller leur nature et leur évolution, et de poursuivre la constitution d'une banque de données unique, comme il a pu être constaté les années précédentes.

8.1.2 PCR en temps réel

Nous envisageons de développer une PCR en temps réel pour la détection du gène *tox* afin d'augmenter la sensibilité de détection de ce gène directement dans les prélèvements respiratoires ou cutanés des cas index mais aussi des cas contacts. *Ce développement n'a pu être réalisé l'an dernier en raison de la démarche d'accréditation mais aussi du temps passé à la formation de personnel.*

Des projets à plus long terme ne peuvent être détaillés en raison du départ de Nicole Guiso de la direction du CNR.

8.2 PROJETS DE L'UNITE DE RECHERCHE EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Ces recherches porteront sur :

- la raison pour laquelle certains isolats porteurs du gène *tox* n'expriment pas la toxine
- le développement de la technique du MLST pour les deux autres espèces du complexe, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*

Des projets à plus long terme ne peuvent être détaillés en raison du départ de Nicole Guiso de la direction du CNR.