



Rapport annuel d'activité

2021

Centre National de Référence des Corynébactéries du complexe diphtheriae

Années d'exercice 2019 - 2020

 ${\bf Responsable:}$ 

Responsable adjoint :

Responsable adjointe : Technicienne :

Assistante :

Sylvain Brisse Edgar Badell

Julie Toubiana (MCU-PH)
Annick Carmi-Leroy
Isabelle Moulherat

Le CNR remercie les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale qui ont envoyé des prélèvements ou échantillons à analyser, ainsi que leurs informations associées, rendant possible la surveillance de la diphtérie en France métropolitaine et d'Outre-Mer.

Le CNR remercie également Mélanie Hennart, Virginie Passet, Annie Landier et Nathalie Armatys (Unité BEBP, Institut Pasteur) pour leur contribution à l'analyse des séquences génomiques et des antibiogrammes.

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence à ce présent rapport (E. Badell, J. Toubiana & S. Brisse. 2021. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Corynébactéries du complexe diphtheriae – Années 2019-2020. Institut Pasteur, Paris, France). Les données issues des tableaux et figures présentées dans ce rapport ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

# Résumé analytique

Le CNR analyse en urgence les souches de *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* et autres espèces proches, potentiellement porteuses du gène de la toxine diphtérique. Cette activité diagnostique est réalisée sous accréditation (norme ISO 15189). Les souches de Mayotte et de Nouvelle-Calédonie sont envoyées au CNR pour confirmation. Le CNR alerte systématiquement SpF et les ARS concernées en cas de détection du gène de la toxine diphtérique, dans un prélèvement clinique humain ou animal. En 2019-2020, 65 alertes ont été réalisées.

La compilation des échantillons reçus au CNR constitue le socle de la surveillance de la diphtérie en France. En 2019/2020, l'augmentation temporelle rapide du volume d'analyses se poursuit et s'amplifie : le CNR a reçu ou isolé 122 souches en 2019 et 182 souches en 2020, contre seulement 23 en 2012. Trente cas d'infections humaines, dus à des souches de *C. diphtheriae* porteuses du gène *tox* (*tox*+), ont été détectés, et *C. diphtheriae tox*- a été détecté 134 fois. De plus, 35 *C. ulcerans tox*+ ont été identifiés, tandis que *C. ulcerans tox*- a été isolé 33 fois. Les *C. ulcerans* proviennent de prélèvements sur des patients (N=30), chiens (N=19), chats (N=17) et autres mammifères. Alors que *C. ulcerans* est presque exclusivement isolé en Métropole (à l'exception de 3 isolats *tox*-), *C. diphtheriae tox*+ est isolé en majorité en Outre-Mer (18 souches) ; il n'y a pas eu de décès. En combinant les données épidémiologiques et l'étude génomique des isolats, tous les cas étudiés sont sporadiques à l'exception d'une paire de *C. diphtheriae* tox- chez deux patients en Guyane. L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que les souches restent sensibles à l'amoxicilline (100%) et à l'érythromycine (99,5%). Un faible niveau de résistance à la pénicilline est noté (8%).

Le CNR développe de nouvelles méthodes d'analyse. En 2019/2020, le CNR a développé, validé, accrédité et implémenté une méthode de PCR multiplex en temps réel pour la détection du gène *tox* et l'identification des espèces (Badell *et al.*, J Med Microbiol, 2019). La méthode est utilisable directement sur les échantillons cliniques, en plus des isolats. Elle est plus sensible et permet un gain de temps de plusieurs heures par rapport à la PCR en point final utilisée auparavant.

Le CNR a participé à une étude européenne dans le cadre du consortium EUPert-Labnet (soutenu financièrement par l'ECDC), qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphtérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne et l'Espace économique européen, chez les personnes de 40 à 59 ans (18 pays participants). La proportion de sérums n'ayant pas le niveau de protection (<0,1 UI/mL) variait considérablement selon les pays entre 22,8 et 82%, atteignant 35% en France, démontrant une situation préoccupante (Berbers et al., Nature Communications, 2021).

En lien avec l'unité Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes, à laquelle il est affilié, le CNR développe des projets de recherche sur la taxonomie, la biologie des populations et l'épidémiologie de *C. diphtheriae*. En 2020, le CNR a décrit une nouvelle espèce du complexe *diphtheriae*, « *C. rouxii* », toujours *tox*-négative et de biovar Belfanti (Badell *et al.*, Res Microbiol, 2020). Nous avons aussi réalisé une vaste étude de diversité populationnelle de *C. diphtheriae*, dans laquelle nous avons défini les déterminants génomiques de la résistance aux antibiotiques, de l'absence de production de la toxine, et de la variation de biovar. Un nouveau gène de résistance à la pénicilline chez *C. diphtheriae* a été découvert (Hennart *et al.*, Genome Med, 2020). Nous avons également coordonné une étude de l'épidémie de diphtérie actuellement en cours au Yémen (Badell *et al.*, Lancet Microbe, 2021).

# **Analytical summary**

The CNR analyzes in emergency the strains of *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* and other related species, potentially carrying the gene for diphtheria toxin. This diagnostic activity is carried out under accreditation (ISO 15189 standard). Strains from Mayotte and New Caledonia are sent to the CNR for confirmation. The CNR systematically alerts SpF and the relevant ARS in the event of detection of the diphtheria toxin gene in a human or animal clinical sample. In 2019-2020, 65 alerts were issued.

The compilation of samples received at the CNR constitutes the basis of diphtheria surveillance in France. In 2019/2020, the rapid temporal increase in the volume of analyzes continues to be observed: the CNR received or isolated 122 strains in 2019 and 182 strains in 2020, against only 23 in 2012. Thirty cases of human infections, due to strains of *C. diphtheriae* carrying the tox (tox +) gene, were detected, and *C. diphtheriae* tox- was detected 134 times. In addition, 35 C. ulcerans tox+ were identified, while *C. ulcerans* tox- was isolated 33 times. *C. ulcerans* originated from patients (N = 30), dogs (N = 19), cats (N = 17) and other mammals. While C. ulcerans is almost exclusively isolated in Metropolitan France (with the exception of 3 tox- isolates), *C. diphtheriae* tox+ is mostly isolated Overseas (18 strains); there were no deaths. By combining epidemiological data and the genomic study of the isolates, all cases are sporadic except for one pair of *C. diphtheriae* tox- in two patients in French Guyana. Analysis of antimicrobial resistance shows that the strains remain susceptible to amoxicillin (100%) and erythromycin (99.5%). A low level of resistance to penicillin is noted (8%).

The CNR is developing new analytical methods. In 2019/2020, the CNR developed, validated, accredited and implemented a real-time multiplex PCR method for the detection of the *tox* gene and the identification of species (Badell et al., J Med Microbiol, 2019). The method can be used directly on clinical samples, in addition to isolates. It is more sensitive and faster by several hours compared to the end point PCR that was used previously.

The CNR participated in a European study within the framework of the EUPert-Labnet consortium (financially supported by ECDC), which aimed to determine the seroprevalence of anti-Diphtheria / Tetanus / Pertussis antibodies in the European Union and European Economic Area, among people aged 40 to 59 (18 participating countries). The proportion of sera not having the level of protection (<0.1 IU / mL) varied from 22.8 and 82% among countries, being 35% in France, demonstrating a worrying situation (Berbers et al., Nature Communications, 2021).

In conjunction with the Biodiversity and Epidemiology of Pathogenic Bacteria unit, to which it is affiliated, the CNR is developing research projects on the taxonomy, population biology and epidemiology of *C. diphtheriae*. In 2020, the CNR described a novel species of the diphtheriae complex, "*C. rouxii*", always tox-negative and of Belfanti biovar (Badell et al., Res Microbiol, 2020). We also performed a large population diversity study of *C. diphtheriae*, in which we defined the genomic determinants of antibiotic resistance, lack of toxin production, and biovar variation. A new penicillin resistance gene in C. diphtheriae was discovered (Hennart et al., Genome Med, 2020). We also coordinated a study of the ongoing diphtheria outbreak in Yemen (Badell et al., Lancet Microbe, 2021).

# Table des matières

Rėsi	ımê analytique	3
	ytical summary	
Liste	des abréviations et acronymes	6
Intro	duction	
1.	Missions et organisation du CNR	8
2.	Activités d'expertise	
2.1	Évolutions des techniques pour la période 2019-2020	č
2.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses	Ç
2.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	
2.4	Collections de matériel biologique	
2.5	Activités d'expertise	
2.6	Activités de séquençage	
3.	Activités de surveillance	
3.1	Description du réseau de partenaires	
3.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	18
3.4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	22
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	23
4.	Alerte	24
5.	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	
5.1	Conseils et expertise aux professionnels de santé	24
5.2	Conseils et expertise aux autorités sanitaires	
5.3	Conseils et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public)	27
6.	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	28
6.1	Activités de recherche en cours	28
6.2	Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR	31
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	33
7.2	Échanges techniques entre le CNR et le LNR ? (Préciser échanges de souches, échanges méthodologiques)	34
7.3	Projets partagés (études, comité scientifique, groupe de travail ou d'experts) où le CNR et le LNR	
appo	ortent et échangent leur expertise	34
7.4	Si les collaborations entre le CNR et le LNR ne sont pas effectives, préciser les perspectives et/ou	
cond	litions de renforcement des liens	
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	35
Ann	exe 1 : Missions et organisation du CNR	
1.1	Missions et objectifs majeurs du CNR	
1.2	Organisation du CNR	
1.3	Locaux et équipement	
1.4	Collections de matériel biologique	
1.5	Description de la démarche qualité du laboratoire	
Ann	exe 2 : Capacités techniques du CNR	41

# LISTE DES ABREVIATIONS 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** Contrôle de Qualité Externe

**ECDC** European Center for Disease Prevention and Control

**EIL** Essais Inter Laboratoires

**HCSP** Haut Conseil de Santé Publique

**SpF** Santé 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)

NTTB Non-toxigenic toxin-gene-bearing

**PCR** Réaction de polymérisation en chaine

**qPCR** Réaction de polymérisation en chaine en temps réel (ou quantitative)

**SPA** Société Protectrice des Animaux

# Introduction

La diphtérie est une maladie infectieuse contagieuse, potentiellement mortelle, causée par les souches toxinogènes (produisant la toxine diphtérique) des espèces bactériennes *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) et *C. ulcerans*. Cette dernière est un pathogène zoonotique généralement transmis à l'homme par certains animaux domestiques, le plus souvent les chats et les chiens, alors que *C. diphtheriae* est à transmission exclusivement interhumaine. Certaines souches d'une troisième espèce, *C. pseudotuberculosis*, peuvent également produire la toxine et causer des symptômes diphtériques ; cette espèce est transmise à l'homme via les petits ruminants. On regroupe ces trois espèces phylogénétiquement proches dans le « complexe *diphtheriae* », qui forme une lignée unique au sein du genre *Corynebacterium*. Deux espèces nouvellement décrites par le CNR en font aussi partie : *C. rouxii* et *C. belfantii*. Les souches de ces deux espèces étaient auparavant identifiées comme *C. diphtheriae* biovar Belfanti et sont jusqu'à présent non-toxinogènes.

La forme classique de la diphtérie est respiratoire, caractérisée par la présence de pseudomembranes adhérentes dans le pharynx et larynx. La diphtérie cutanée, est caractérisée par une ou des lésion(s) cutanée(s) pustuleuse(s), ulcérative(s) ou nécrotique(s) et douloureuse(s) d'apparition ou d'aggravation récente. Actuellement, les corynébactéries du complexe *diphtheriae* sont surtout identifiées à partir d'ulcères chroniques. La toxine diphtérique est responsable des symptômes graves de la diphtérie, avec atteintes cardiaques ou polyneuropathies périphériques. Cette toxine est produite seulement par certaines souches de corynébactéries du complexe *diphtheriae*, lorsqu'elles portent le gène *tox* codant pour la toxine diphtérique. Ce gène est apporté par un phage qui peut s'intégrer dans leur chromosome, rendant les souches lysogénisées capables de produire la toxine. Des infections systémiques (bactériémies, endocardites ou autres) peuvent être causées par des souches non toxinogènes du complexe *diphtheriae*.

La diphtérie fait partie des maladies à déclaration obligatoire. Le vaccin à base de toxine diphtérique inactivée protège très efficacement contre la maladie. La couverture vaccinale élevée, surtout chez les enfants, a permis une élimination guasi-totale de la maladie en France.

Cependant, il est crucial de maintenir une surveillance active de la diphtérie car : (1) Des isolats continuent à circuler dans les Départements et Régions d'Outre-Mer et en Nouvelle Calédonie ; (2) Des cas d'infection à *C. diphtheriae* continuent à être observés en métropole, importés de zones endémiques ; (3) Des cas autochtones sont causés par *C. ulcerans*, souvent liés aux animaux de compagnie ; et (4) Des souches résistantes aux anti-infectieux, y compris à la pénicilline et aux macrolides, peuvent émerger.

# 1. Missions et organisation du CNR

La diphtérie est une maladie à déclaration obligatoire. Les laboratoires privés ou publics, y compris en clinique vétérinaire, qui identifient des corynébactéries du complexe *diphtheriae*, ou qui soupçonnent une diphtérie sur des bases cliniques et réalisent un prélèvement à visée diagnostique, les envoient au CNR pour la détermination de la présence du gène de la toxine diphtérique. Cette détection fait alors l'objet d'une alerte auprès de SpF et des ARS concernées, en charge de la mise en place des mesures de suivi des cas et de leurs contacts.

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

Le CNR CCd est hébergé au sein de l'unité de recherche « Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, dirigée par Sylvain Brisse. L'organisation du CNR est schématisée dans la figure ci-dessous.

Responsable du CNR
Sylvain BRISSE

Isabelle MOULHERAT
Assistante

Responsables-adjointes du CNR
Edgar BADELL (microbiologie)
Dr. Julie TOUBIANA (clinique)

Annick CARMI-LEROY
Technicienne

Figure: Organisation du CNR

# Note sur les capacités insuffisantes du CNR :

Face à l'augmentation régulière et très significative depuis 10 ans du nombre d'analyses effectuées par le CNR (voir section surveillance), le personnel du CNR est en effectif insuffisant pour assurer pleinement toutes ses missions. Depuis 2019, un appui est fourni par une partie des personnels de l'unité qui héberge le CNR, en particulier, pour le séquençage génomique, les analyses de bio-informatique, et la gestion et l'analyse des données liées aux antibiogrammes.

# 2. Expertise

#### Chiffres clés pour la période 2019-2020 :

Entre 2019 et 2020, 30 cas d'infections humaines, dus à des *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox*+), ont été détectés. *C. diphtheriae tox*- a été détecté 134 fois. *C. ulcerans tox*+ a été identifié dans 16 cas cliniques et 19 cas d'infections animales. *C. ulcerans tox*- a été isolé 33 fois.

# 2.1 Évolutions des techniques pour la période 2019-2020

Une nouvelle technique PCR en temps réel (qPCR), utilisée pour la détection du gène *tox* et l'identification des espèces *diphtheriae* ou *ulcerans* (au sens large), a été publiée et mise en place au CNR en 2019. Cette nouvelle méthode a fait l'objet d'une demande validation de méthode et a été accréditée ISO 15189 par le COFRAC en 2020. Elle est maintenant utilisée en première ligne au CNR. La méthode de PCR en point final, plus lente et moins sensible, qui était utilisée depuis 2008, a été abandonnée.

**Génomique**: Entre 2019 et 2020, nous avons réalisé le séquençage génomique (technologie Illumina) de la majorité des 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 compréhension de l'épidémiologie. Son évaluation est en cours pour définir son intérêt pour la surveillance en temps réel. Dans ce cas elle devrait être réalisée au plus tôt après isolement des souches ; les délais actuels varient selon l'urgence entre 4 jours et 1 mois.

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

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

#### 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2019, nous avons transféré la technique qPCR vers les CH de Guyane et de La Réunion. En 2020, la qPCR a aussi été transférée au Laboratoire de Santé Animale à l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort dans le cadre d'une collaboration pour la recherche de *C. ulcerans* chez les animaux sauvages.

#### 2.4 Collections de matériel biologique

Notre collection s'est enrichie de 271 nouveaux isolats, provenant essentiellement des laboratoires hospitaliers de France métropolitaine, Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Guyane et des laboratoires de biologie médicale vétérinaire.

# 2.5 Activités d'expertise

#### 2.5.1 Nombre d'échantillons reçus et analysés pour la période 2019-2020

Sur la période 2019-2020, nous avons reçu 369 échantillons ou souches à analyser (Figures 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.
  - Douze souches correspondaient à un échange inter-laboratoire dans le cadre de l'accréditation 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 entre 2019 et 2020

Un échantillon est considéré positif en cas de détection d'ADN de Corynébactéries appartenant au complexe diphtheriae

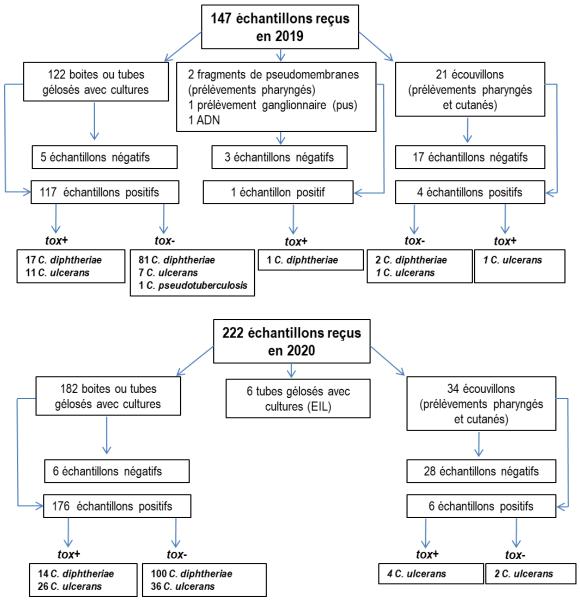


Tableau: Analyses réalisées au CNR

Type d'échantillon	Type d'analyse	Nombre d'analyses	Délai de rendu des résultats
Prélèvements	Réception et mise en culture	55	Non applicable
Prélèvements	Analyse du gène tox et détection d'ADN de C. diphtheriae/C. belfantii/C. rouxii ou C. ulcerans/C. pseudotuberculosis par qPCR	55	< 2 jours ouvrés
Isolats bactériens	Réception et mise en culture	304	Non applicable
Isolats bactériens	Analyse du gène tox et détection d'ADN de C. diphtheriae/C. belfantii/C. rouxii ou C. ulcerans/C. pseudotuberculosis par qPCR	304	< 2 jours ouvrés
Isolats bactériens	Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF	240	Pas rendu systématiquement Pas rendu
Isolats bactériens	Test d'Elek (production de la toxine in-vitro)	72	systématiquement
Isolats bactériens	Biotypage	214	Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Antibiogrammes	227	Pas rendu systématiquement
Isolats bactériens	Séquençage génomique	277	Pas rendu systématiquement

#### 2.5.2 Envoi de souches

En mars 2019, dans le cadre d'un essai inter-laboratoire (EIL) que nous avons organisé, six isolats de notre collection ont été envoyés au National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control à Varsovie. Également, six isolats ont été envoyés au Laboratoire de Microbiologie à l'Université Libre de Bruxelles en décembre 2019 et décembre 2020.

# 2.6 Activités de séquençage

- Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ? 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. L'unité BEBP hébergeant le CNR a développé un pipeline d'analyse qui réalise plusieurs étapes en aval (détection du gène tox et ses éventuelles mutations, autres gènes de virulence, MLST et core genome MLST, 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, des scripts développés dans l'unité BEBP et 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 ? Si OUI, pour quelles activités : Nous analysons les génotypes des souches après le séquençage génomique à des fins de santé publique : définition de cas groupés, gènes de résistance aux antibiotiques. Ces analyses ont lieu essentiellement rétrospectivement, permettant de comprendre les liens entre cas, mais jusqu'à présent ne sont pas utilisées pour des actions spécifiques de contrôle des infections, qui ont lieu de toute façon selon les recommandations en vigueur dès qu'un cas est détecté (screening des contacts, antibioprophylaxie).
- 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 ou en métropole.
- **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, sérogroupe/sérotype prédiction, résistome prédiction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles). Les séquences sont assemblées (logiciel SPAdes) puis les allèles des 7 gènes de ménage utilisés pour faire le génotypage MLST sont déterminés en utilisant la base de données internationale d'allèles dont notre CNR est le curateur, sur le site pubmlst ; également, une méthode cgMLST a été développée par l'unité hébergeant le CNR pour le typage fin des souches. Nous déterminons également la présence des gènes tox et pld (gène impliqué dans la virulence des isolats appartenant aux espèces ulcerans et pseudotuberculosis). 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 : La majorité des isolats appartenant au complexe diphtheriae reçus entre 2019 et 2020 ont été séquencés. 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 2019 et 2020, 30 cas d'infection à *C. diphtheriae tox*+ ont été rapportés (28 cas cliniques humains et 2 prélèvements vétérinaires). Pour 8 des 10 cas détectés en métropole leur importation a pu être vérifiée. *C. diphtheriae tox*- a été détecté 134 fois. *C. ulcerans tox*+ a été identifié dans 16 cas cliniques humains et dans 19 prélèvements vétérinaires. *C. ulcerans tox*- a été isolé 33 fois et *C. pseudotuberculosis tox*- 6 fois. Les 2 nouvelles espèces : *C. belfantii* et *C. rouxii* ont été détectées 25 et 6 fois respectivement. Aucun des isolats appartenant à ces 2 espèces ne porte le gène *tox*.

# 3.1 Description du réseau de partenaires

Il n'y a pas de réseau de partenaires structuré 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 d'isoler, d'identifier (le plus souvent par MALDI-TOF) et de nous envoyer des isolats. Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans ou C pseudotuberculosis*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignements afin de collecter les informations cliniques pertinentes (y compris présence d'animaux, voyages...). Ces fiches constituent une base importante pour la surveillance de la diphtérie en France.

En 2019 et 2020, 67 correspondants distincts nous ont envoyé des échantillons à analyser ; 59 correspondants sont en France Métropolitaine et 8 en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants a augmenté par rapport aux années précédentes.

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

#### Tendance temporelle:

La figure ci-dessous montre que le nombre d'isolats analysés en 2019 et 2020 a très fortement augmenté par rapport aux années précédentes ; on observe une augmentation d'un facteur 10 en 8 ans. Cette tendance à la hausse prolonge en l'amplifiant, celle observée les années précédentes, qui est continue et concerne toutes les catégories (tox positifs ou négatifs, *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*). Toutefois, les isolats tox-positifs restent minoritaires (pour 2020 : 30 *C. ulcerans tox+*, 14 *C. diphtheriae tox+*).

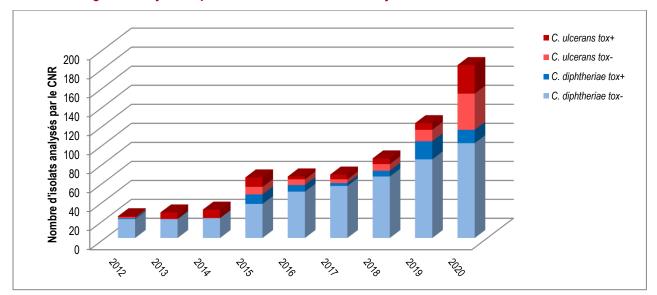


Figure : Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2012 et 2020

# Origines géographiques :

Le tableau suivant résume les origines des cas et les espèces impliquées. On note que les cas de *C. diphtheriae* proviennent en majorité d'Outre-mer, mais que au contraire, la quasi-totalité des *C. ulcerans* proviennent de France métropolitaine. De même, la totalité des *C. pseudotuberculosis*, *C. belfantii* et *C. rouxii* proviennent de France métropolitaine.

Tableau : Nombre d'isolats par espèce et origine géographique

	Métropole (humain)	Métropole (animal)	Guyane (humain)	La Réunion (humain)	Mayotte (humain)	Nouvelle Calédonie (humain)	Polynésie (humain)	Total
A. isolats tox positifs								
C. diphtheriae	10	2	1	4	8	5	0	30
C. ulcerans	16	19	0	0	0	0	0	35
C. belfantii	0	0	0	0	0	0	0	0
C. rouxii	0	0	0	0	0	0	0	0
C. pseudotuberculosis	0	0	0	0	0	0	0	0
total	26	21	1	4	8	5	0	65
B. isolats tox négatifs								
C. diphtheriae	34	1	21	11	6	58	3	134
C. ulcerans	11	19	1	2	0	0	0	33
C. belfantii	25	0	0	0	0	2	0	27
C. rouxii	0	6	0	0	0	0	0	6
C. pseudotuberculosis	2	4	0	0	0	0	0	6
total	72	30	22	13	6	60	3	206
TOTAL (A+B)	98	51	23	17	14	65	3	271

Le tableau suivant résume les caractéristiques cliniques des 162 cas de *C. diphtheriae* et 30 cas *C. ulcerans* humains pour lesquels les données étaient accessibles. A noter, l'âge médian des patients infectés par *C. ulcerans* est très nettement supérieur à celui des cas de *C. diphtheriae*. En revanche, il n'y a pas ou peu de différence d'âge entre les cas *tox*-positifs et *tox*-négatifs, dans chaque espèce. Les hommes sont plus fréquemment infectés par *C. diphtheriae* que les femmes.

Concernant la notion de voyage précédant l'infection détectée en métropole, les cas *tox*-positifs sont fortement associés au voyage, par rapport aux *tox*-négatifs. Pour les cas humains infectés par *C. ulcerans*, le contact avec des animaux est plus fréquent pour les cas *tox*-positifs.

Les origines des prélèvements cliniques sont peu différentes entre les deux espèces, avec une large majorité d'origines cutanées. Les infections de type non-respiratoires, non-cutanées sont plus fréquentes chez les *tox*-négatifs des deux espèces.

Tableau : Caractéristiques cliniques des cas humains, 2019-2020

Caractéristiques#	C. diphtheriae		C. ulcerans	
	tox-positifs (N=28)	tox-négatifs (N=134)	tox-positifs (N=16)	tox-négatifs (N=14)
Données démographiques				
Age en années médiane (IQR)	29 (12 - 55)	36 (17 - 55)	78 (64 - 85)	76 (54 - 84)
Sexe (% homme)	59	65	47	50
Voyage ## (%) (pour souches Métropole)	80 (8/10)	38 (13/34)	NR	NR
Contact avec animaux (%)	NR	NR	50 (8/16)	14 (2/14)
Origine du prélèvement				
Cutané (%)	86	78	77	64
Respiratoire (%)	10	6	18	7
Autres* (%)	4	16	5	29

<sup>\*</sup> Oreille, sang, etc.

# 3.2.1 *C. diphtheriae* porteurs du gène tox (tox+)

Sur la période couverte, le CNR a reçu ou isolé 30 *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox*. Un isolat parmi les 30 isolats *tox*+ n'a pas pu être cultivé.

<sup>#</sup> Les C. rouxii, C. belfantii et C. pseudotuberculosis sont décrits dans le texte

<sup>##</sup> Voyage hors Métropole (Outre-Mer ou Étranger)

NR = Non Renseigné

#### Caractéristiques géographiques, démographiques et cliniques

Douze isolats ont été obtenus à partir de prélèvements réalisés en France métropolitaine, dans différentes régions (10 humains et 2 vétérinaires). Au moins 80% (8/10) des cas humains étaient des cas d'importation (pour 2 des cas l'information sur un voyage en dehors de la France métropolitaine avant l'infection n'est pas disponible). Les 18 autres isolats *C. diphtheriae tox*+ provenaient de : Guyane (N=1), la Réunion (N=4), Mayotte (N=8) et Nouvelle-Calédonie (N=5).

L'âge médian est de 29 ans. L'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox*+ est majoritairement cutanée (86%).

#### Caractéristiques microbiologiques

Vingt-quatre des 29 isolats (83%) sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif). Cinq isolats sont NTTB (non-toxigenic toxin-gene-bearing). Neuf isolats sont *C. diphtheriae* biovar Gravis et 20 biovar Mitis. Toutes les souches sont distinctes d'un point de vue génomique et peuvent donc être considérées sporadiques.

# 3.2.2 *C. diphtheriae* non porteurs du gène *tox* (*tox*-)

#### Caractéristiques géographiques, démographiques et cliniques

Les 134 isolats *C. diphtheriae tox*- proviennent en majorité de France métropolitaine (N=34 ; dans différentes régions), de Nouvelle-Calédonie (N=58) et de Guyane (N=21).

L'âge médian est de 36 ans avec à peu près deux tiers d'hommes. Comme pour les isolats *tox*+, l'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox*- est majoritairement cutanée (78%).

#### Caractéristiques microbiologiques

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. Le biovar Mitis est le biovar prédominant aussi bien en France métropolitaine qu'en France d'Outre-Mer.

Toutes les souches, sauf une paire (voir plus loin), sont distinctes d'un point de vue génomique et peuvent donc être considérées comme sporadiques.

# 3.2.3 C. ulcerans porteurs du gène tox (tox+)

Sur la période couverte, le CNR a reçu ou isolé 35 C. ulcerans porteurs du gène tox.

#### Caractéristiques géographiques, démographiques et cliniques

Tous les isolats proviennent de France métropolitaine. Seize isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 19 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=10), des chiens (N=8) et un rat (N=1).

L'âge médian des patients est de 78 ans ; avec 47% d'hommes. Au moins 50% (8/16) des cas ont été en contact proche avec des animaux (pour 8 cas l'information n'est pas disponible).

L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox*+ en provenance des isolats humains est majoritairement cutanée (77%. Pour les *C. ulcerans tox*+ d'origine animale, ils ont été majoritairement retrouvés sur des prélèvements respiratoires (42%) et cutanés (37%).

#### Caractéristiques microbiologiques

Tous les isolats vétérinaires porteurs du gène *tox* sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif), cependant 30% d'isolats obtenus à partir de prélèvements humains sont NTTB (portent le gène *tox* mais ne produisent pas la toxine).

Au niveau génotypique, on observe une hétérogénéité des profils MLST. En effet, parmi les 35 isolats *C. ulcerans tox*+ il y a 11 ST différents. Cependant, 2 ST sont majoritaires : ST331 (43%) et ST325 (17%).

# 3.2.4 *C. ulcerans* non porteurs du gène tox (tox-)

# Caractéristiques géographiques, démographiques et cliniques

Tous les isolats sauf trois proviennent de France métropolitaine. Treize isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 19 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=7), des chiens (N=11) et un cheval (N=1). L'âge médian des patients est de 76 ans ; avec 50% d'hommes. Pour seulement 14% (2/14) des cas, un contact proche avec des animaux domestiques a été rapporté (pour les 12 autres cas l'information n'est pas disponible).

L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox*- isolés aussi bien chez l'homme que chez les animaux est majoritairement cutanée (64% chez l'homme ; 58% chez les animaux).

# Caractéristiques microbiologiques

De manière similaire aux isolats *C. ulcerans tox*+, les isolats *tox*- sont hétérogènes au niveau des profils ST. En effet, parmi les 33 isolats *C. ulcerans tox*- il y a 12 ST différents. Cependant, 2 ST sont majoritaires : ST 339 (33%) et ST325 (18%).

#### 3.2.5 Diversité des souches

Nous génotypons depuis 2020 les souches par séquençage génomique et cgMLST, sur la base de 1305 gènes présents dans toutes les souches et représentant au total à peu près 50% de la longueur du génome moyen de *C. diphtheriae*. Un génotype (cgST) est défini comme un profil cgMLST identique sur les 1305 gènes (hormis d'éventuels allèles manquants sur l'un ou l'autre profils ; ces allèles manquants ne sont pas pris en compte car résultent d'artefacts d'assemblages et sont très rares). On estime le taux de substitution à environ 10-6 substitutions par site et par an, ce qui correspond à 2 substitutions par an par génome, ou 1 allèle cgMLST par an et par génome.

Par ailleurs un regroupement des profils cgMLST montrant moins de 25 différences alléliques est réalisé : on parle de clusters génétiques, tolérant de l'ordre de 25 ans de distance temporelle entre membres du groupe.

L'analyse génomique des souches a été réalisée pour les C. diphtheriae, hormis Nouvelle-Calédonie.

Sur 49 souches analysées, il y a 46 génotypes (cgST) distincts. Deux paires de souches viennent du même patient, l'un prélevé à 6 jours d'intervalle et l'autre à 2 mois d'intervalle. La seule paire d'isolats identiques mais issus de patients distincts provient de Guyane (à 2 mois d'intervalle). L'observation de la transmission directe de *C. diphtheriae* est donc un phénomène rare en l'état de notre système de surveillance et la densité d'échantillonnage réalisé.

Concernant les clusters génétiques, 15 clusters ont été trouvés sur la période, représentant 42 souches. Quatre d'entre eux comprennent des souches *tox*-positives. Ces 15 clusters génétiques sont presque exclusivement locaux, c'est-à-dire soit observés en métropole (souvent au sein d'une même région), soit dans un seul DROM/collectivité. D'autres isolats de la collection du CNR isolées plus anciennement (jusqu'à 11 ans antérieures à la plus récente) appartiennent à certains clusters, le plus souvent issus dans la même localité. Ces observations montrent une persistance locale de souches de *C. diphtheriae* dont les déterminants mériteraient d'être mieux compris, car ils pourraient apporter des éléments précieux pour un meilleur contrôle de *C. diphtheriae*.

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

#### 3.3.1 Méthodes

Le CNR surveille en particulier la sensibilité des souches à la pénicilline et l'ampicilline (utilisées en routine) et à l'érythromycine (utilisée en cas d'allergie à la pénicilline). D'autres antibiotiques qui peuvent être pertinents dans certains contextes cliniques, sont également testés.

Toutes les corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae* reçues ou isolées au CNR sont testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité au-delà du diamètre critique est mise en évidence, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode des bandelettes à gradient (E-test).

Pour l'interprétation, nous nous basons actuellement sur les seuils de sensibilité des corynébactéries publiés en 2013 et 2019 par le CA-SFM, modifiés par nous suite à l'observation de la distribution naturelle des diamètres (méthode des ECOFFs) (Hennart et al., 2020 ; https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/) ; le lien est donné ci-dessous :

# Données supplémentaires : Seuils de sensibilité CA-SFM des corynébactéries

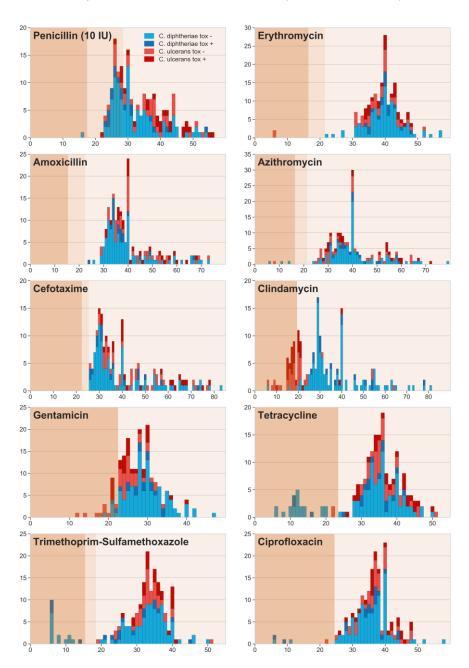
Source des cut-offs utilisés : Table S2, Hennart et al. Genome Medicine 2020 :

https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00805-7#Sec22

La figure ci-dessous montre la distribution des diamètres pour les antibiotiques les plus pertinents.

Figure : Distribution des diamètres par rapport aux seuils critiques

En fond d'image, de clair à foncé, les trois zones correspondent à S, I et R, respectivement.



# 3.3.2 Taux de résistance et tendances temporelles

Dans l'ensemble, les souches restent sensibles aux antibiotiques de première intention. Pour l'amoxicilline, les deux espèces *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* sont entièrement sensibles. Pour l'érythromycine, seules une souche de *C. diphtheriae* est résistante.

Pour la pénicilline, nous observons peu de sensibilité diminuée chez *C. ulcerans*, mais chez *C. diphtheriae* le taux important de sensibilité de niveau intermédiaire observé depuis 2015 se maintient. Bien qu'il semble chuter en 2020, il est à noter que le diamètre critique (S/I) coupe le mode de la distribution (voir figure), ce qui rend la méthode très sensible aux petites variations expérimentales ou de dynamique des populations. Un effort de redéfinition des diamètres critiques est en cours en collaboration avec l'EUCAST (voir section « Programme d'activité pour les années suivantes »).

Quelques souches résistantes à la gentamycine, à la tétracycline (depuis plusieurs années), à la ciprofloxacine et au cotrimoxazole, sont notées. Le cefotaxime est entièrement actif.

Pour la clindamycine, on note une sensibilité nettement inférieure de *C. ulcerans* par rapport à *C. diphtheriae*.

En ce qui concerne la concentration minimale inhibitrice (CMI), les isolats qui résistent à la pénicilline ont des valeurs de CMI entre 0,19 et 0,25 mg/L, ce qui est de bas niveau. Pour la gentamycine les isolats résistants ont de valeurs de CMI entre 1,5 et 4 mg/L. L'isolat résistant à l'érythromycine a une CMI élevée (256 mg/L) et les isolats résistants à la clindamycine ont de valeurs de CMI entre 1 et 4 mg/L à l'exception de 3 isolats qui ont des CMI très élevées : pour 1 isolat la CMI est de 96 mg/L et pour 2 isolats la CMI est > 256 mg/L.

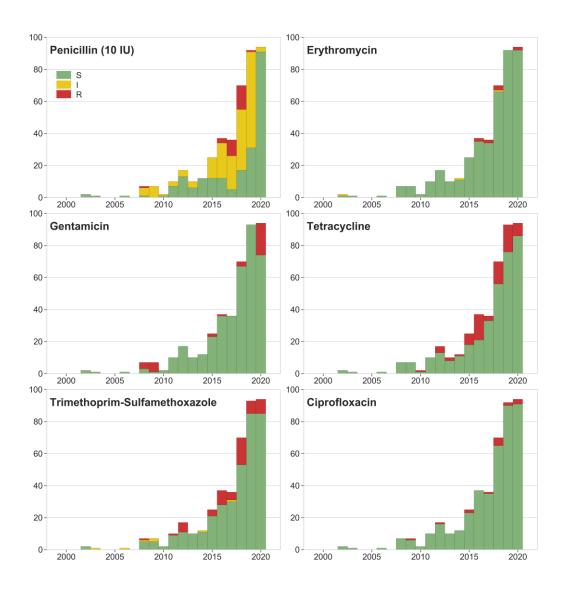
#### Isolats multi-résistants

21 isolats ont une sensibilité réduite à au moins 3 antibiotiques, 11 à 4 antibiotiques, 4 à 5 antibiotiques, 2 à au moins 6 antibiotiques et 1 isolat est résistant à 7 antibiotiques. Les antibiotiques concernés sont : pénicilline, azithromycine, ciprofloxacine, clarithromycine, cotrimoxazole, rifampicine, tétracycline, triméthoprime, kanamycine, sulfaméthoxazole, moxifloxacine et oxacilline

L'évolution temporelle des proportions de souches résistantes, intermédiaires (dits « sensibles à haute posologie ») ou sensibles à chaque antibiotique est donnée dans la Figure ci-dessous.

Figure : Analyse temporelle de la résistance aux anti-infectieux pour la période 2002-2020

(C. diphtheriae et C. ulcerans, tox-positifs ou tox-négatifs, combinés)



On n'observe pas de tendance temporelle d'intérêt médical. Pour la pénicilline, entièrement « sensible » en 2020 contrairement aux années précédentes, voir le commentaire sur le seuil ci-dessus. De même pour la gentamycine, pour laquelle des souches résistantes semblent émerger en 2020 : il est nécessaire d'être prudent au vu du positionnement du seuil critique par rapport à la distribution.

# (3.3bis). Autres espèces : C. pseudotuberculosis, C. rouxii, C. belfantii

Les 6 isolats de *C. pseudotuberculosis* proviennent tous de France métropolitaine : 2 ont été isolés chez l'homme et 4 chez des caprins. Ils ont tous été isolés à partir d'abcès.

Les isolats *C. belfantii* proviennent en majorité de France métropolitaine à l'exception de 2 isolats originaires de la Nouvelle-Calédonie. Les isolats proviennent de prélèvements respiratoires dans 76% (19/25) des cas (36% d'origine ORL et 40% de prélèvements respiratoires profonds) et 8% (2/25) de prélèvements cutanés. Pour 16% des cas l'information de l'origine clinique n'était pas disponible.

Les six isolats appartenant à l'espèce *C. rouxii* ont tous été identifiés en France métropolitaine et chez des animaux (chiens et chats) ; 4 ont été isolés sur un prélèvement d'oreilles et 2 sur prélèvement cutané.

Aucun isolat parmi ces 3 espèces ne porte le gène tox.

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

#### 3.4.1 National

Il n'y a pas de réseau national de surveillance de la diphtérie. Le CNR est placé en position centrale pour la surveillance de la diphtérie car il reçoit la majorité des souches isolées. Le CNR informe Santé publique France en temps réel pour chaque détection d'un isolat porteur du gène *tox*. Des analyses épidémiologiques autour de cas sont faites au cas par cas avec Santé publique France et les ARS et/ou CIRE. Des analyses microbiologiques populationnelles des souches des localités d'Outre-Mer sont réalisées avec les collègues locaux.

#### 3.4.2 International

Il n'existe pas de réseau actif actuellement autour de la diphtérie à l'international. Depuis 2013, le réseau Européen Diphtheria Surveillance Network (DIPNET) été interrompu par manque de financement. Dernière action en date, en 2017, le CNR a participé à un « gap analysis » (identification des besoins) réalisé par l'ECDC sur les capacités des laboratoires de diagnostic et la disponibilité de l'antitoxine (<a href="https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gap-analysis-securing-diphtheria-diagnostic-capacity-and-diphtheria-antitoxin">https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gap-analysis-securing-diphtheria-diagnostic-capacity-and-diphtheria-antitoxin</a>).

Depuis 2017, le CNR a initié plusieurs collaborations internationales avec : le laboratoire de Norman Fry (Public Health England, Microbiology Reference Services, Colindale, Londres) ; le laboratoire du « Department of Microbiology, National Reference Centre for Toxigenic Corynebacteria, Universitair Ziekenhuis Brussel, Vrije Universiteit Brussel », Bruxelles (Belgique) ; le laboratoire « German Consiliary Laboratory on Diphtheria », Oberschleisheim, Allemagne ; le laboratoire « National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control » à Varsovie (Pologne) ; et le NCPHL (National Centre of the Public Health Laboratories), Sana'a, Yemen. Les collaborations incluent l'échange d'expertise et la mise en place de projet collaboratifs (qPCR, seuils critiques), et l'envoi de souches dans le cadre de contrôles externes de qualité ou de projets de recherche.

Des contacts existent également avec le Centre Collaborateur OMS de la diphtérie (Androulla Efstratiou, Public

Health England). Nous échangeons avec ce centre sur les méthodes diagnostiques et capacités de laboratoires, les besoins de formation internationaux et le typage génomique des souches.

Nous avons également collaboré en 2019-2020 avec l'OMS et MSF (Genève) pour définir un Target Product Profile pour un test rapide de la diphtérie.

Les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données des génotypes MLST de *C. diphtheriae* (<a href="http://pubmlst.org">http://pubmlst.org</a>), standard international qui permet la comparaison des souches et le recensement de la biodiversité du complexe diphtheriae.

En 2019-2020, une collaboration avec des collègues Yéménites a été coordonnée par le CNR. Face à une épidémie de diphtérie parmi les plus grandes depuis 20 ans (>5000 cas probables recensés), le CNR a été contacté pour expertise et aider à la caractérisation microbiologique des souches. Nous avons analysé 100 cultures envoyées depuis le Yemen, et caractérisé 43 souches de cette épidémie. Nous avons également analysé les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de cette épidémie, en collaboration avec l'équipe de Henrik Salje et Noémie Lefrancq (Institut Pasteur et Cambridge University) ; voir partie recherche.

# Contrôles externes de qualité

Le CNR fournit un service de contrôles externes de qualité à différents laboratoires Européens. En mars 2019 et décembre 2019 nous avons organisé et envoyé 6 échantillons au National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control à Varsovie (Pologne). En décembre 2019 et 2020, nous avons envoyé 6 échantillons à LMB (Bruxelles, Belgique). Pour chaque échantillon les laboratoires 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

Le CNR a finalisé un projet en collaboration avec Santé publique France et des collègues de deux écoles vétérinaires et de la SPA, visant à définir la prévalence et les facteurs de risque de portage de *C. ulcerans* chez les chiens et les chats (voir le point 7.1.1). La rédaction des résultats de ce projet est en cours de finalisation (coordination par L. Fonteneau, SpF).

# 4. Alerte

Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox*, il alerte directement Santé publique France par courriel (<u>alerte@santepubliquefrance.fr</u> et <u>dmi-diphterie@santepubliquefrance.fr</u>), en même temps que le rendu du résultat *tox* au laboratoire expéditeur. Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304 conduitediphterie.pdf).

Entre 2019 et 2020, soixante-cinq alertes ont été données : 44 correspondaient à des isolats *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* isolés à partir de prélèvements humains et 21 à partir de prélèvements vétérinaires.

En amont de ces alertes, selon le contexte, le CNR recommande aux biologistes de contacter les ARS pour se préparer à tracer les contacts des cas.

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

Le CNR met à jour et diffuse les connaissances sur la diphtérie, tant dans le secteur humain qu'animal, et sur les aspects microbiologiques et épidémiologiques.

#### 5.1 Conseils et expertise aux professionnels de santé

# 5.1.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé

Les membres du CNR participent chaque année à des enseignements, formations et encadrements pour des étudiants ou professionnels en médecine ou microbiologie.

#### Cours ou encadrements donnés spécifiquement sur la diphtérie en 2019 et 2020 :

Sylvain Brisse a encadré des étudiants ou réalisé les enseignements suivants :

- 8 septembre 2020 : Biologie des populations de C. diphtheriae (entre autres) et applications en santé publique. Donné aux étudiants du Cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur (U Paris / Sorbonne U).
- 23 février 2021 : Biologie des populations de C. diphtheriae (entre autres) et applications en santé publique. Donné aux étudiants du Cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur (U Paris / Sorbonne U).
- Direction de thèse (M. Hennart) sur la résistance et la génomique de C. diphtheriae
- Encadrement de membres de l'unité BEBP hors CNR, sur la microbiologie de la diphtérie

# Edgar Badell et Sylvain Brisse ont encadré les étudiants suivants :

- Étude de la sensibilité aux antibiotiques chez les bactéries du complexe diphtheriae et essai de transfert de matériel génétique par conjugaison bactérienne entre souches de Corynebacterium diphtheriae. Stage de 2ème année de BTS Biotechnologies réalisé du 7 Janvier au 1 Mars 2019.
- Étude de la sensibilité aux antibiotiques chez des bactéries du complexe *diphtheriae* et détection du gène *tox*. Stage de 2ème année de BTS Biotechnologies réalisé du 13 Janvier au 13 Mars 2020.

# 5.1.2 Accueil de stagiaires et transfert de techniques

- En 2019 et 2020, le CNR a été en contact avec les microbiologistes de Guyane pour la mise en place de la qPCR. L'épidémie de COVID-19 a retardé cette mise en place qui n'est pas effective à ce jour.

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

Le Haut Conseil de la santé publique (HCSP) a été sollicité par la Direction générale de la santé (DGS) pour revoir les indications d'utilisation et de bon usage des antitoxines diphtériques dans un contexte de difficultés d'approvisionnement. Pour répondre à cette nouvelle saisine, la Commission spécialisée Maladies infectieuses et maladies émergentes (CS MIME) du HCSP a mis en place un groupe de travail (GT).

**Julie Toubiana** représente le CNR dans ce GT, dont les conclusions sur les indications thérapeutiques sont en cours de rédaction.

Un premier avis relatif aux recommandations d'utilisation des antitoxines diphtériques en situation de pénurie a été émis (avis du 6 décembre 2019 : <a href="https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756">https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756</a>)

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

- Le CNR envoi au laboratoire expéditeur un compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche analysée. En cas d'aspects atypiques sur la souche ou l'observation clinique, un contact peut avoir lieu avec le laboratoire expéditeur.
- Le CNR collabore à la publication de cas d'intérêt (voir liste des publications).
- Les informations concernant les activités du CNR sont disponibles pour les professionnels de santé et le grand public via notre site web (dernières mises à jour le 22/02/2021 et le 23/03/2021) : <a href="https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/corynebacteries-du-complexe-diphteriae">https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/corynebacteries-du-complexe-diphteriae</a>
- Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2018) est en ligne sur le site web du CNR.

 La fiche maladie « diphtérie » du site grand public de l'Institut Pasteur est régulièrement mise à jour en fonction de l'avancée des connaissances microbiologiques et épidémiologiques : <a href="https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/diphterie">https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/diphterie</a>

# 5.1.5 Activités de conseil aux professionnels de santé

Le CNR est joignable aux heures ouvrées par téléphone, aux 4 postes du responsable, des adjoints et du secrétariat, et sur le portable du responsable en cas d'urgence.

Le CNR peut également être joint par courriel (coryne@pasteur.fr).

Ces informations de contact et la liste des jours fériés annuels sont disponibles et mises à jour sur le site web du CNR.

Entre 2019 et 2020, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. Nous avons reçu 53 appels de la part des médecins biologistes, infectiologues, dermatologues qui voulaient des renseignements divers sur la diphtérie et/ou pour des renseignements sur l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié à cette activité.

Sollicitations par téléphone entre 2019 et 2020		
Hôpitaux	35	
Pédiatres libéraux, Médecins généralistes, biologiste LABM	15	
Collectivités (ARS-CIRE)	3	
TOTAL	53	

# 5.2 Conseils et expertise aux autorités sanitaires

Nous sommes en contact quasi-quotidien avec SpF dans le cadre de nos alertes en cas de détection du gène *tox*. En 2019-2020, 65 alertes ont été réalisées. De plus, nous avons été sollicités plusieurs fois par les ARS ou CIRE pour demande des conseils sur la conduite à tenir sur des isolats de *C. ulcerans* d'origine vétérinaire.

En 2019-2020, S. Brisse a échangé avec le CC-OMS de la diphtérie (Public Health England) sur la mise en place de diagnostic rapide de la diphtérie (outil critique actuellement inexistant). Plusieurs rencontres physiques ou téléphoniques ont eu lieu.

Julie Toubiana représente le CNR dans le groupe de travail mis en place par la Commission spécialisée Maladies infectieuses et maladies émergentes (CS MIME) du HCSP, sollicité par la Direction générale de la santé (DGS)

pour revoir les indications d'utilisation et de bon usage des antitoxines diphtériques dans un contexte de difficultés d'approvisionnement. Un premier avis relatif aux recommandations d'utilisation des antitoxines diphtériques en situation de pénurie a été émis (avis du 6 décembre 2019 : <a href="https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756">https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756</a>).

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

- 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.
- Une page maladie « diphtérie » destinée au grand public a été mise à jour en mars 2021 : <a href="https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/diphterie">https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/diphterie</a>
- Les membres du CNR examinent régulièrement des manuscrits soumis pour des publications scientifiques, sur demande des éditeurs des journaux.
- Deux communications 'grand public' ont eu lieu à l'occasion de la publication de notre étude sur la résistance aux antibiotiques (Hennart et al., 2020) et celle de l'épidémie au Yémen (Badell et al., 2021). Ces communications ont lieu via les canaux de diffusion de l'Institut Pasteur (Lettre de l'Institut Pasteur, destinée aux donateurs en particulier).
- Sylvain Brisse communique régulièrement sur le réseau social Twitter sur l'actualité de la diphtérie (<a href="https://twitter.com/sylvainbrisse">https://twitter.com/sylvainbrisse</a>).

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

#### 6.1 Activités de recherche en cours

Le CNR développe ses travaux de recherche en lien avec l'Unité Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes qui l'héberge à l'Institut Pasteur. Ces projets de recherche bénéficient de la complémentarité entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche en biologie des populations, évolution et épidémiologie de l'Unité.

Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre au CNR en complément de celui octroyé par SPF pour le CNR. Outre son utilisation pour le financement de personnels, d'équipements et de frais de fonctionnement, ce budget permet de développer certains de ces projets de recherche. D'autres projets sont financés sur crédits externes.

# 6.1.1 Travaux publiés sur la période mais déjà décrits dans le précédent rapport d'activité du CNR

Nous avons décrit dans notre précédent rapport, des études qui ont été publiées sur cette période : analyse de souches chez des patients atteints de mucoviscidose (Pivot *et al.*, 2019); case report (Scheifer *et al.*, 2019). Nous ne les décrivons donc pas ici.

# 6.1.2 Développement de méthodes de diagnostic et de caractérisation des souches

#### Développement de la PCR en temps réel pour la détection de la toxine et l'identification des espèces

Nous avons développé, évalué et validé une méthode de PCR multiplex en temps réel pour l'identification des corynébactéries 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 échantillons cliniques (écouvillons et tissus), et sur deux thermocycleurs différents (RotorGene-Q, Qiagen ; et LC480, Roche) et dans deux laboratoires (Institut Pasteur et PHE).

La technique permet un gain de temps (d'à peu près 3h) par rapport à la PCR en point final utilisée jusqu'en 2019. Un dossier de validation de la méthode a été réalisé et l'accréditation obtenue auprès du COFRAC. Une publication a été réalisée (Badell *et al.*, J. Med Microbiol., 2019 ; <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31478826/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31478826/</a>). La méthode est utilisée en première intention au CNR depuis juillet 2019.

# Études taxonomiques et description de Corynebacterium rouxii

Jusqu'à récemment, la taxonomie du complexe *C. diphtheriae* était ancienne, la dernière description d'espèce (*C. ulcerans*, par Philippe Riegel et collègues) datant de 1995. Notre analyse de la diversité génétique des souches du CNR a révélé l'existence de lignées phylogénétiques distinctes jusqu'à présent 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. 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 (Dazas *et al.*, IJSEM 2018 ; <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355399/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355399/</a>), le démarquant ainsi de *C. diphtheriae* dans la taxonomie bactérienne. Aucune souche de cette nouvelle espèce n'est toxinogène, ce qui souligne l'intérêt de la distinguer de *C. diphtheriae*.

Une seconde lignée distincte a été découverte et décrite en 2020 par le CNR : *C. rouxii*. Cette espèce est rare, comprenant actuellement moins de 10 souches répertoriées ; et aucune ne porte le gène *tox*. Elles sont également de biovar Belfanti et *tox*-négatives (Badell *et al.*, Res Microbiol., 2020 ; <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119905/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119905/</a>).

Ces deux espèces nouvelles ne sont pas distinguées de *C. diphtheriae* par la qPCR multiplex utilisée au CNR, et sont identifiées comme *C. diphtheriae*. Le MALDI-ToF permet de distinguer *C. rouxii* au CNR, mais les bases de données commerciales ne sont pas encore en mesure de faire cette distinction car aucun spectre de référence n'y a été inclus.

# 6.1.3 Études de biologie des populations et de génomique des souches

Structure des populations de C. diphtheriae et caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques : découverte d'un gène de résistance à la pénicilline

Depuis 2008, le CNR caractérise systématiquement les isolats pour définir la présence du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique, pour définir le biovar, et pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques. Nous réalisons aussi un séquençage génomique.

Sur la base de 247 souches collectées en France métropolitaine et d'Outre-mer entre 2008 et 2017, le CNR a réalisé une étude publiée en 2020 (Hennart et al. Genome Medicine, 2020 ; <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/</a>). Dans cette étude, les souches ont été caractérisées pour leur sensibilité à 19 antibiotiques, dont la pénicilline. La résistance à la pénicilline a été détectée dans 17 % des souches, et des résistances multiples (c'est-à-dire une même bactérie résistant à plusieurs antibiotiques) ont été observées. Par une étude de type « genome wide association study (GWAS) », un gène associé à une faible affinité pour la pénicilline a été découvert. Cela explique la résistance des bactéries, porteuses de ce variant, à l'effet de l'antibiotique. Ce gène, nommé pbp2m, a été trouvé dans des lignées génétiques variées de la bactérie, il est donc transmissible horizontalement à de nouvelles lignées. Il est parfois porté par un plasmide et d'autres éléments génétiques porteurs de multiples gènes de résistance. Ce plasmide est nouvellement décrit par cette étude. Enfin, nous avons montré que ce gène confère une résistance non seulement à la pénicilline, mais aussi à divers antibiotiques de la même famille. Par ailleurs, nous avons analysé les liens entre diversité phylogénétique des souches, toxinogénicité et biovar, apportant un éclairage nouveau sur la dynamique évolutive des souches de C. diphtheriae et leurs caractéristiques microbiologiques importantes en clinique.

Cette étude nous a amené à contacter le CA-SFM et l'EUCAST pour redéfinir les seuils critiques (voir plus bas).

# 6.1.4 Analyse de cas et descriptions cliniques ponctuelles

Nous collaborons occasionnellement avec des collègues biologistes hospitaliers/universitaires sur la description de cas cliniques de diphtérie, en France ou à l'étranger. Nous apportons notre expertise et les données microbiologiques sur les isolats. Cette période a vu trois publications de ce type (Scheifer et al. 2019 ; Rakotomalala et al., 2020 ; Alberto et al., 2021).

# 6.1.5 Analyse du portage de corynébactéries par les animaux de compagnie

Nous avons finalisé un projet en collaboration avec Santé publique France et des collègues vétérinaires de deux écoles vétérinaires et de la SPA, visant à définir la prévalence et les facteurs de risque de portage de *C. ulcerans* chez les chiens et les chats. La rédaction des résultats de ce projet est en cours de finalisation (coordination par L. Fonteneau, SpF). La contribution expérimentale du CNR a consisté en l'analyse par qPCR de 740 échantillons (écouvillons) de chats et chiens. Cette étude est décrite plus en détails dans la section « Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux » ci-dessous.

# 6.1.6 Participation à une étude européenne de séro-épidémiologie

Le CNR a participé à une étude européenne dans le cadre du consortium ECDC/EUPert-Labnet de séroépidémiologie, qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphtérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne (UE) et dans l'Espace économique européen (EEE) dans les tranches d'âge de 40 à 49 ans et de 50 à 59 ans. Les 18 pays participants ont chacun collecté environ 500 sérums entre 2015 et 2018 qui ont été analysés pour les anticorps spécifiques aux IgG-DTC. Pour la diphtérie, la proportion de sérums en dessous du niveau de protection (<0.1 IU/mL) varie entre 22.8–82.0% selon les pays, et de 26 à 42% en France, selon la tranche d'âge. En conclusion de cette étude, le manque de protection vaccinale contre la diphtérie est préoccupant (Berbers *et al.*, Nature Communications 2021).

# 6.1.7 Étude de l'épidémie de diphtérie au Yémen, période 2017-2020

Au Yémen, où la guerre civile fait rage depuis 2015, une importante épidémie de diphtérie est en cours depuis octobre 2017. Nous avons cherché à étudier les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de cette épidémie. Notre étude repose sur un ensemble de sources de données collectées au niveau national et sur une collaboration internationale impliquant le CNR et des épidémiologistes et des microbiologistes du Yémen (Laboratoire Central de Santé Publique de Sana'a, NCPHL). Nous avons pu définir la dynamique de l'épidémie de diphtérie et distinguer trois périodes épidémiques au Yémen L'épidémie a touché presque tous les gouvernorats (provinces) du Yémen, avec 5701 cas probables et 330 décès sur la période d'octobre 2017 à avril 2020. Nous avons observé que la proportion d'enfants de 0 à 4 ans a été réduite au cours de la deuxième période (juin 2018-mai 2019), après une campagne de vaccination réalisée pour contrôler l'épidémie, suggérant que même si la campagne de vaccination n'a pas permis d'enrayer la transmission de la maladie, elle a contribué à protéger les jeunes enfants lors des périodes épidémiques suivantes. Des souches de Corynebacterium diphtheriae ont été caractérisés microbiologiquement au CNR et ont apporté des données précieuses sur la nature des souches infectieuses. Pratiquement tous les isolats d'épidémie (40 sur 43

testés) produisaient la toxine diphtérique. Nous avons montré l'existence de six lignées phylogénétiques distinctes de *C. diphtheriae*, dont quatre ont été génétiquement associées à des isolats d'Arabie Saoudite, d'Érythrée et de Somalie, suggérant une dynamique de transmission régionale. Des variations génomiques inter-lignées dans les gènes associés à la résistance aux antimicrobiens, à l'acquisition du fer et à l'adhésion aux cellules de l'hôte ont été observées. La lignée prédominante (70% des isolats) est résistante au triméthoprime et associée à des caractéristiques génomiques uniques. Son ancêtre commun le plus récent a été placé en 2015, ce qui indique une circulation silencieuse de *C. diphtheriae* au Yémen bien avant la détection officielle de l'épidémie. L'hétérogénéité phénotypique des souches circulantes durant l'épidémie souligne l'importance de développer une capacité d'analyse de laboratoire et une surveillance microbiologique en temps réel durant les épidémies de diphtérie. Cette étude a été publiée dans Lancet Microbe (Badell *et al.*, Lancet Microbe juin-juillet 2021; https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanmic/PIIS2666-5247(21)00094-X.pdf).

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

# **6.2.1** Publications nationales

6 décembre 2019 : Utilisation des antitoxines diphtériques en situation de pénurie : (<a href="https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756">https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756</a> ). Participation du CNR à l'avis du groupe de travail du Haut Conseil de la Santé Publique.

#### **6.2.2** Publications internationales réalisées

#### 2019:

- **Badell E**, Guillot S, Tulliez M, Pascal M, Panunzi LG, Rose S, Litt D, Fry NK, **Brisse S**. Improved quadruplex real-time PCR assay for the diagnosis of diphtheria. J Med Microbiol. 2019 Oct; 68(10): 1455-1465. doi: 10.1099/jmm.0.001070. Epub 2019 Sep 3.
- 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 Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae bv. Belfanti (*Corynebacterium belfantii*) in Four Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol. 2019 Apr 26;57(5):e00042-19. 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. 2019 Sep;49(6):463-466. doi: 10.1016/j.medmal.2018.12.001.

#### 2020:

- Badell E, Hennart M, Rodrigues C, Passet V, Dazas M, Panunzi L, Bouchez V, Carmi-Leroy A, Toubiana J, Brisse S. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the *diphtheriae* species complex. Res Microbiol. 2020 Apr-Jun; 171(3-4):122-127. doi: 10.1016/j.resmic.2020.02.003. Epub 2020 Feb 28.

- Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Q, Baines SL, Barros-Pinkelnig M, **Carmi-Leroy A**, Dazas M, Wehenkel AM, Didelot X, **Toubiana J, Badell E**, **Brisse S**. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. Genome Med. 2020 Nov 27; 12(1):107. doi: 10.1186/s13073-020-00805-7.

#### 2021:

- Rakotomalala RS, Andrianirina ZZ, Ratsima E, Randrianandraina P, Randrianirina F, Edosoa GT, Rabenandrianina T, Badell E, Toubiana J, Andrianarimanana D, Brisse S, Rasamindrakotroka A. Corynebacterium diphtheriae Infection in Mahajanga, Madagascar: First Case Report. J Trop Pediatr. 2021 Jan 29;67(1):fmaa064. doi: 10.1093/tropej/fmaa064.
- Alberto C, Osdoit S, Villani AP, Bellec L, Belmonte O, Schrenzel J, Bagny K, **Badell E**, **Brisse S**, **Toubiana J**. Cutaneous ulcers revealing diphtheria: A re-emerging disease imported from Indian Ocean countries? Ann Dermatol Venereol. 2021 Mar;148(1):34-39. doi: 10.1016/j.annder.2020.04.024. Epub 2020 Jul 3.
- Edgar Badell, Abdulilah Alharazi, Alexis Criscuolo, Khaled Abdullah Ali Almoayed, Noémie Lefrancq, Valerie Bouchez, Julien Guglielmini, Melanie Hennart, Annick Carmi-Leroy, Nora Zidane, Marine Pascal-Perrigault, Manon Lebreton, Helena Martini, Henrik Salje, Julie Toubiana, Fekri Dureab, Ghulam Dhabaan, Sylvain Brisse, NCPHL diphtheria outbreak working group. Ongoing diphtheria outbreak in Yemen: a cross-sectional and genomic epidemiology study. The Lancet Microbe, 2021 (June/July issue).
- Berbers G, van Gageldonk P, Kassteele JV, Wiedermann U, Desombere I, Dalby T, Toubiana J, Tsiodras S, Ferencz IP, Mullan K, Griskevicius A, Kolupajeva T, Vestrheim DF, Palminha P, Popovici O, Wehlin L, Kastrin T, Maďarová L, Campbell H, Ködmön C, Bacci S, Barkoff AM, He Q; Circulation of pertussis and poor protection against diphtheria among middle-aged adults in 18 European countries. Serosurveillance Study Team. Nat Commun. 2021 May 17;12(1):2871. doi: 10.1038/s41467-021-23114-y.

# 6.2.3 Communications nationales (invitées)

S. Brisse, communication orale à la RICAI, décembre 2020 : *C. diphtheriae* : caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques et découverte d'un gène de résistance à la pénicilline

# 6.2.4 Communications internationales (invitées)

Aucune.

# 6.2.5 Conférences sur invitations

Aucune

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

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

# 7.1.1 Étude de prévalence du portage de Corynebacterium ulcerans chez les chiens et chats en France, 2019-2020

Les infections à *Corynebacterium ulcerans* chez l'homme peuvent être responsables de tableaux cliniques sévères et mener jusqu'au décès. Ces infections, à déclaration obligatoire depuis 2003, sont en augmentation en France. Une transmission par contact avec des chiens et des chats est suspectée dans la majorité des cas.

L'objectif de l'étude était de donner une première estimation de la prévalence du portage de *C. ulcerans* chez les chiens et chats en France.

Pour ce faire, un échantillon de chiens et de chats a été prélevé dans des Ecoles Nationales Vétérinaires (ENV) et dans des dispensaires de la Société Protectrice des Animaux (SPA) entre les mois d'avril 2019 et février 2020. Ces prélèvements étaient accompagnés d'un questionnaire complété par le propriétaire de l'animal renseignant sur le lieu de résidence et le mode de vie de l'animal.

Nous avons reçu 740 prélèvements réalisés chez 263 animaux sur les 314 attendus (83,8%). Sur ces 263 animaux 136 ont été prélevés dans une ENV et 127 dans un dispensaire de la SPA. 52,9% étaient des chats. Les animaux étaient âgés en moyenne de 4,8 ans. 27,8% des animaux prélevés étaient symptomatiques. La majorité des animaux sortait tous les jours (77,8%), avait au moins un autre animal dans leur entourage (78,2%) et résidait dans une unité urbaine de plus de 200 000 habitants (68,5%). Le résultat de la recherche de *C. ulcerans*, par PCR multiplexée en temps réel, sur l'ensemble des prélèvements analysés était négatif. Nous n'avons pas trouvé d'animaux infectés par des corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae*, dans aucun prélèvement.

Ce résultat suggère une très faible prévalence du portage de *C. ulcerans* chez les animaux de compagnie en France.

#### 7.1.2 Recherche de corynébactéries appartenant au complexe diphtheriae dans la faune sauvage

Étant donné que dans la plupart des cas d'infection humaines à *C. ulcerans*, la transmission de la bactérie se fait à travers de leurs animaux de compagnie, nous avons voulu savoir comment ces animaux ont pu eux même s'infecter. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si en France, et particulièrement en région parisienne, la faune sauvage est porteuse de corynébactéries. Pour ce faire, nous avons collaboré avec le Laboratoire de Santé Animale de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort. Deux cent soixante prélèvements sur des animaux sauvages ont été réalisés. Ces animaux incluaient des hérissons, colombidés, passereaux, rapaces et corvidés. Parmi ces 260 prélèvements, 236 ont pu être analysés par qPCR et/ou culture + MALDI-TOF.

Aucune corynébactérie du complexe *diphtheriae* n'a été identifiée ni par qPCR ni par MALDI-ToF ou galerie API Coryne, cependant d'autres coynébactéries ont pu être identifiées : *Corynebacterium kroppenstedtii*, *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium macginleyi*, chez des pigeons et *Corynebacterium propinguum* chez une chouette hulotte.

Il semblerait, donc, que de manière similaire aux animaux de compagnie, il y aurait une très faible prévalence du portage de *C. ulcerans* chez les espèces d'animaux analysés. Bien sûr, il sera intéressant d'analyser d'autres espèces d'animaux sauvages.

# 7.1.3 Collaboration avec Cerba Vet

Le CNR reçoit régulièrement des échantillons en provenance du laboratoire Cerba Vet. En 2020, nous avons initié des contacts avec ce laboratoire pour discuter de ces cas dans leur ensemble, et envisager des études collaboratives. Un travail descriptif de la série de cas récente, et la mise en place de formulaires de renseignements détaillés à destination des propriétaires, sont en cours.

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

Non applicable. Il n'y a pas de LNR diphtérie.

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

Outre la poursuite des 4 missions principales du CNR, le programme de travail est le suivant :

# 8.1 Définition des seuils critiques de résistance aux antibiotiques chez les corynébactéries du complexe diphtheriae

En collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter) et le laboratoire de référence allemand (Andreas Sing), nous chercherons à définir les seuils critiques pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* de manière robuste, sur la base de la distribution naturelle des valeurs afin de définir des cut-offs écologiques (ECOFFs).

#### 8.2 Études de C. ulcerans chez l'animal

Voir partie ci-dessus, Cerba Vet.

# 8.3 Développement d'un système de génotypage génomique standardisé pour les isolats de C. diphtheriae

Le typage standardisé des souches de *C. diphtheriae et C. ulcerans* est jusqu'à présent réalisé 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. Notre objectif est de tirer profit du séquençage génomique pour mieux comprendre l'épidémiologie des souches, au niveau national mais aussi international. Un système de typage cgMLST a été développé dans l'unité hébergeant le CNR. Il est déjà disponible sur la plateforme BIGSdb de l'Institut Pasteur (<a href="https://bigsdb.pasteur.fr">https://bigsdb.pasteur.fr</a>) et une librairie génomique attenante a été créée, comprenant >700 génomes de *C. diphtheriae*. Ce système permet aussi de typer à haute résolution les souches des espèces *C. rouxii* et *C. belfantii*. La publication correspondante est en préparation. Notre ambition est de faire utiliser ce système par les laboratoires de référence à l'international.

# 8.4 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Il n'existe pas ou peu de réseaux. Dans le cadre du projet ci-dessus, nous avons pour objectif de créer un réseau international autour de l'épidémiologie, la génomique et l'émergence des souches.

#### 8.5 Épidémiologie de C. diphtheriae en France métropolitaine

Nous chercherons à comprendre les liens génétiques entre les souches collectées en Métropole depuis 2000 (création du CNR), dans le but de comprendre si des chaînes de transmission impliquant plusieurs cas cliniques ayant la même source cryptique (par exemple, portage longue durée) pourraient être identifiées. Cette question est importante pour définir l'intérêt d'un séquençage en en temps réel des souches isolées en France dans une optique de lutte contre la transmission, même cliniquement cryptique.

# 8.6 Épidémiologie génomique des souches de C. diphtheriae en Guyane, La Réunion et Nouvelle Calédonie.

Des études dédiées à ces trois Départements/Territoires d'Outre-Mer/Collectivités sont envisagées afin de comprendre la diversité et l'épidémiologie des souches dans ces localités. Des collaborations ont été établies avec des collègues microbiologistes et les ARS/CIRE locales.

#### 8.7 Analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques

Nous avons décrit l'existence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques, et découvert un nouveau gène de résistance à la pénicilline. Nous poursuivrons l'analyse des mécanismes de résistance ainsi que leurs supports génétiques.

# 8.8 Microbiologie des biovars de C. diphtheriae et C. pseudotuberculosis et liens avec les données cliniques

Le biotypage des souches de *C. diphtheriae* date des années 1930-1950. Trois biovars principaux, Gravis, Mitis et Belfanti ont été décrits à l'époque, ainsi qu'un biovar Intermedius très rarement isolé actuellement. Des associations entre la clinique et les biovars ont été proposées (Gravis : formes graves). Nous souhaitons revisiter la définition des biovars et leurs liens avec la clinique, sur la base des souches du CNR. Les différences génomiques qui sous-tendent la différenciation biochimique entre les biovars restent mal comprises, et seront également analysées. Les biovars de *C. pseudotuberculosis* seront également inclus dans l'étude.

# ANNEXE 1: MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

# 1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

# 1.1.1 Expertise

- Développer la collection d'isolats existants ;
- Identifier et typer les isolats, en détectant le gène de la toxine diphtérique et en recherchant sa production
- Apporter un soutien aux laboratoires de biologie médicale hospitaliers ou privés (isolement, transport, analyse)
- Maintenir une expertise et des collaborations concernant les corynébactéries animales
- Poursuivre l'analyse de la résistance aux antibiotiques de tous les isolats reçus au CNR;
- Assurer le maintien d'une compétence bactériologique concernant les bactéries du complexe diphtheriae

#### 1.1.2 Conseil

Apporter son expertise pour la prise en charge clinique des cas Apporter son expertise dans le domaine de la vaccination antidiphtérique

# 1.1.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

- Suivre la circulation des corynébactéries, porteuses du gène tox
- Suivre la sensibilité aux antibiotiques
- Contribuer aux études épidémiologiques
- Contribuer aux réseaux de surveillance européens

# 1.1.4 Alerte

 Signaler à l'agence nationale de santé publique, les détections du gène tox et les cas groupés liés à des souches tox-négatives, ainsi que toute autre situation inhabituelle (augmentation des cas, cas groupés, souches « mutantes »)

Note sur les capacités insuffisantes du CNR: Face à l'augmentation régulière et très significative depuis 10 ans du nombre d'analyses effectuées par le CNR (voir section surveillance), le personnel du CNR est en effectif insuffisant pour assurer pleinement toutes ses missions. Depuis 2019, un appui est fourni par une partie des personnels de l'unité qui héberge le CNR, en particulier, pour le séquençage génomique, les analyses de bio-informatique, et la gestion et l'analyse des données liées aux antibiogrammes

# --- Des sections intermédiaires ont été éliminées pour cause de confidentialité. ---

# Conditions de mise à disposition des collections

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de corynébactéries du complexe *diphtheriae* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues ou isolées. L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ou de recherche fondamentale ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

#### 1.2 Description de la démarche qualité du laboratoire

# 1.2.1 Démarche qualité des CNR de l'Institut Pasteur du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2020

Le CNR des Corynébactéries 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, 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 de la Recherche Médicale ;
- 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. Ils se font régulièrement auditer dans le cadre de leurs activités en interne et par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux.

L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du <u>COFRAC</u> (<u>https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf</u>)

L'ensemble des CNR/CIBU participent 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/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

# L'année Qualité 2019 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S6	15 au 18 avril 2019
Revue qualité	27/05/2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	03 juin 2019
Audits internes qualité et technique	29/05/2019 AIT
	20/11/2019 AIQ
Finalisation des dossiers de validation de méthode	31/12/2019
pour les extensions et les ajouts	

# L'année Qualité 2020 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de renouvellement	6 au 8 octobre 2020
Revue qualité	13/05/2020
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	02 octobre 2020
Audits internes qualité et technique	02/12/2020 AIT

		08/12/2020 AIQ
Ì	Finalisation des dossiers de validation de méthode	Non applicable
	pour les extensions et les ajouts	

Malgré le contexte sanitaire, Le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en octobre 2020 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour permettre au mieux la continuité de leurs missions.

#### Perspectives 2021

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revues qualité LRE	Janvier-juin 2021
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2021
Revue de direction LRE-MS	Juin 2021
Demande d'ouverture nouvelles lignes de portées	Avant le 1er novembre 2021
Audi de surveillance COFRAC	Mars 2022

# 1.2.2 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).

Le LMB nous a envoyé 6 échantillons à analyser en décembre 2019 et 6 échantillons en décembre 2020.

La première étape a consisté à cultiver les échantillons et extraire leur ADN. Nous avons ensuite fait la qPCR qui cible le gène *tox*, et les gènes *rpoB* pour l'identification. 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 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 isolats appartenant à l'espèce *diphtheriae*. Nous avons obtenu des résultats corrects pour tous les isolats analysés.

En conclusion, tous les résultats des échantillons du CQE que nous avons analysés pour l'année 2019 et 2020 sont conformes aux résultats attendus.

En parallèle, nous avons envoyé 6 échantillons à analyser à 2 laboratoires : Belgique et Pologne en 2019, et 6 échantillons en 2020 au laboratoire en Belgique

Ces laboratoires ont obtenu 100% de résultats conformes. 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 : diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux antiinfectieux

Pour tout prélèvement ou isolat envoyé ou isolé au CNR nous recherchons en priorité la présence du gène tox par qPCR après extraction du matériel génétique de la bactérie ou du prélèvement. En parallèle, la même qPCR multiplex permet l'identification moléculaire des bactéries en ciblant des variants du gène rpoB. Ce test permet de séparer les bactéries appartenant au complexe diphtheriae en deux groupes : diphtheriae (inclut C. diphtheriae, C. rouxii et C. belfantii) et ulcerans (qui inclut C. ulcerans et C. pseudotuberculosis).

Pour l'isolement des bactéries, nous utilisons la **culture sur un milieu sélectif, le milieu de Tinsdale** fabriqué à l'Institut Pasteur.

Nous identifions les colonies isolées par des **techniques de microbiologie** telles que : **coloration de Gram, test Rosco et test « Hiss sérum »** ainsi que par **spectrométrie de masse MALDI-ToF**. Le biovar est déterminé à l'aide des galeries API coryne (BioMérieux).

Nous vérifions **l'expression de la toxine** à partir de colonies isolées à l'aide du test d'Elek, qui est un test d'immuno-précipitation dans un milieu gélosé. Le sérum est fourni par l'Institut Pasteur de Saint-Pétersbourg. 5 à 20% des souches *tox*-positives sont Elek négatives, et donc non toxinogènes.

La sensibilité aux antibiotiques des isolats est réalisée par diffusion 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 2019 v2 (Mai 2019) de la Société Française de Microbiologie.

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

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