

Rapport annuel d'activité

2015

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

Année d'exercice

2014



SOMMAIRE

RESUME ANALYTIQUE	4
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	5
2. ACTIVITES D'EXPERTISES	5
2.1 EVOLUTION DES TECHNIQUES	5
2.1.1 Identification.....	5
2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	5
2.2.ACTIVITES DE L'ANNEE 2014	5
2.2.1 Caractéristiques des isolats porteurs du gène tox.....	6
2.2.2 Caractéristiques des isolats non porteurs du gène tox.....	10
2.2.3 Isolats ne faisant pas partie du complexe diphtheriae.....	13
2.2.4 Autres identifications.....	14
2.2.5 Distribution des souches ou échantillons de matériel biologique.....	14
3. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE	14
3.1 INTRODUCTION	14
3.2 CAS DE DIPHTERIE EN FRANCE	15
4. ALERTE DURANT L'ANNEE 2014.....	15
5. ACTIVITES D'INFORMATION ET DE CONSEILS	16
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	16
6.1 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CNR-CCD	16
6.1.1 Constitution d'une collection.....	16
6.1.2 Propriétés des <i>C. diphtheriae</i> collectés en 2014.....	16
6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE	18
6.2.1 Développement de la technique MLST pour <i>C. ulcerans</i>	18
6.2.2 Collaboration avec le Brésil.....	20
6.2.3 Collaboration avec la Roumanie	20
6.2.4 Collaboration avec la Pologne.....	21
6.3 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-CCD	22
6.3.1 Publications	22
6.3.2 Communications orales.....	23
6.3.3 Affiches.....	23
6.3.4 Enseignement.....	23
7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE	24
Annexe 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR :.....	25
1.1 MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR :	25
1.2 EQUIPE :	25
Annexe 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	29
2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR-CCD	29
2.2 CONSTITUTION D'UNE COLLECTION.....	29
Annexe 3 : AFFICHES	30

RESUME ANALYTIQUE

En 2014,

- Il y a eu un cas d'infection due à *C. diphtheriae* porteur du gène *tox* dans son matériel génétique mais non producteur de la toxine diphtérique, et dix-huit cas d'infections à *C. diphtheriae* non porteurs du gène *tox* ;
- Il y a eu dix cas d'infections dues à *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique. Six ont été obtenus à partir de prélèvements humains dont 4 sont producteurs de la toxine et 4 ont été obtenus à partir de prélèvements vétérinaires et sont tous producteurs de la toxine. Un cas d'infection à *C. ulcerans* non porteur du gène *tox* dans son matériel génétique.

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

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

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

Les missions du CNR-CCD sont listées en Annexe 1

2. ACTIVITES D'EXPERTISES

2.1 EVOLUTION DES TECHNIQUES

2.1.1 Identification

Jusqu'à la fin 2013 l'identification des bactéries appartenant au complexe *diphtheriae* se faisait par des techniques moléculaires et biochimiques. Nous avons arrêté de réaliser l'identification avec la galerie API en raison d'erreurs d'identification. Nous avons conservé l'identification moléculaire pour le genre et l'espèce et le test biochimique, Rosco, pour l'identification du biovar. Nous avons aussi mis en place au CNR la confirmation d'identification par technique de spectrométrie de masse de type Maldi-tof. Cette technique est plus simple et beaucoup plus rapide que l'identification moléculaire et a été montrée spécifique pour les espèces de corynebactéries du complexe *diphtheriae* (Farfour E. et al, J Clin Microbiol. 2012 Aug;50(8):2702-7)

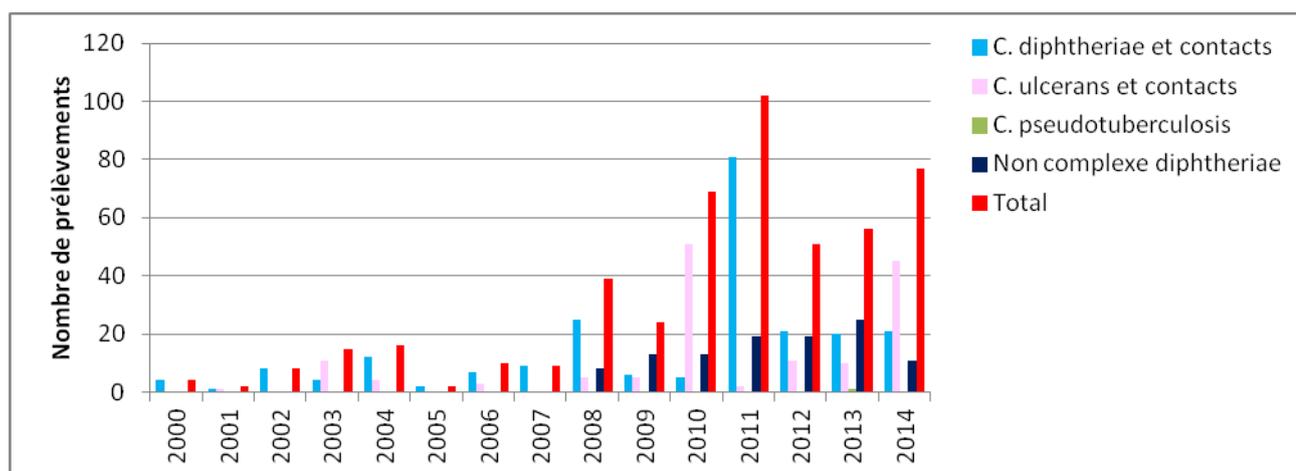
2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Pendant l'année 2014 nous n'avons pas transféré de techniques vers d'autres laboratoires.

2.2. ACTIVITES DE L'ANNEE 2014

L'activité du CNR a augmenté depuis 2008 (date à laquelle il a été placé sous la responsabilité de l'unité Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines) comme indiqué sur la Figure 1.

Figure 1. Nombre de prélèvements et isolats analysés entre 2000 et 2014



En 2014, nous avons reçu 77 prélèvements et/ou isolats provenant de France métropolitaine et de Mayotte

2.2.1 Caractéristiques des isolats porteurs du gène *tox*

Parmi les 11 isolats porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique, 10 appartiennent à l'espèce *ulcerans* et provenaient de France métropolitaine et 1 isolat appartient à l'espèce *diphtheriae* et provenait de Mayotte. Sept isolats provenaient de prélèvements humains et 4 de prélèvements vétérinaires (3 félins et 1 canin). Leurs caractéristiques se trouvent dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des isolats porteurs du gène *tox*

N° CNR	Age/Sexe vaccin	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène <i>tox</i>	Production de toxine	Animaux de compagnie	MLST
FRC0209	3 ans / M Oui	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la Tétracycline (CMI = 16 mg/L)	+	-	Non communiqué	109
FRC0212	88 ans/ F Rappel en 2003	Plaie	Le Chesnay, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+	Plusieurs chats	325
FRC0219	Chat	Pharyngé	Souzy la Briche, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+		325

N° CNR	Age/Sexe vacciné	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène tox	Production de toxine	Animaux de compagnie	MLST
FRC0220	Chat	Conjonctival	Souzy la Briche, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+		325
FRC0227	67 ans /F Inconnu	Plaie	Reims, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+	Chiens et chats	328
FRC0228	59 ans/F Inconnu	Plaie	Vierzon, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+	Chiens et chats	357
FRC0239 (FRC0219)	Chat	Pharyngé	Souzy la Briche, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+		325
FRC0249	77ans /M Inconnu	Plaie	Cahors, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	-	Chien	358
FRC0251 (FRC0227)	67 ans /F Inconnu	Plaie	Reims, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+	Chiens et chats	328
FRC0260	87 ans/ F Inconnu	Plaie	Saint-Gaudens, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la clindamycine (CMI = 1 mg/L)	+	-	Chien	331
FRC0279	Chien	Liquide articulaire	Bourg en Bresse, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	+	+		364

L'isolat *C. diphtheriae* porteur du gène *tox* (FRC0209) a été isolé à Mayotte à partir d'une plaie suite à une brûlure de la main chez un enfant de 3 ans vacciné (dernière dose reçue le 17/01/2012) en provenance de la Grande-Comore. Cet isolat ne produit pas la toxine et l'analyse génotypique par la technique MLST a montré qu'il appartient au ST 109. Ce ST a déjà été trouvé dans un *C. diphtheriae* mitis porteur du gène *tox* isolé en 2004 à Strasbourg chez un patient qui présentait une angine au retour de Madagascar. Ces résultats confirment la dissémination régionale de ces isolats porteurs du gène *tox* et soulignent l'importance de la surveillance épidémiologique au niveau des migrations de populations de cette région d'outre-mer vers la métropole pour éviter de possibles épidémies.

Concernant les 10 isolats de *C. ulcerans*, 8 produisent la toxine diphtérique. Six isolats parmi les 10 *C. ulcerans* ont été obtenus à partir de prélèvements d'origine humaine. Parmi ces 6 isolats 4 produisent la toxine diphtérique. L'âge des patients variait entre 59 et 88 ans. La plupart des patients n'étaient soit pas à jour de leurs vaccinations soit avaient un statut vaccinal inconnu. Il est important de noter que tous les patients étaient en contact avec des animaux de compagnie.

- Nous avons pu mettre en évidence, pour le cas correspondant à l'isolat FRC0212, que la patiente avait été contaminée par un des chats qu'elle nourrissait. En effet, cette patiente, habitant au Chesnay, France, s'est fait griffer au bras par un des chats errants qu'elle nourrissait. La griffure s'est infectée et la patiente a fait une cellulite. Cette complication a entraîné l'hospitalisation de la patiente, qui a été opérée. Des fragments de peau provenant de la plaie ont été mis en culture et un *Corynebacterium ulcerans* porteur du gène *tox* et exprimant la toxine diphtérique a pu être isolé. Cette patiente a dû être admise en réanimation à cause d'une défaillance viscérale multiple qui a conduit à son décès. Des prélèvements oculaires, pharyngés et cutanés réalisés sur 2 chats domestiques et 3 chats errants ont permis de mettre en évidence le portage de *C. ulcerans* chez deux des chats errants : au niveau du pharynx d'un des chats (FRC0219) et des yeux chez l'autre chat (FRC0220). L'analyse génotypique des isolats obtenus chez la patiente et chez les deux chats a montré que les trois isolats ont le même profil MLST (ST325, tableau 1). Ce résultat a pu être obtenu grâce à l'adaptation de la technique MLST à l'espèce *ulcerans* (voir le point 6.2.1). Les deux chats ont été traités par amoxicilline pendant 10 jours et ont été prélevés à nouveau une fois le traitement finalisé. Un des chats (FRC0219) était retrouvé encore porteur de *C. ulcerans* (isolat FRC0239). L'analyse génotypique de l'isolat FRC0239 a montré que cet isolat est identique aux trois autres isolats et possède le ST325. Ce chat a dû être euthanasié à cause de l'échec du traitement antibiotique. Il est important signaler que la réalisation des prélèvements vétérinaires avait été possible grâce à la collaboration de la Direction Départementale de la Protection des Populations des Yvelines (DDPP78, interlocuteurs : Pierre Lecouls, Agnès Giraud et Florence Colmar). Ce cas a été publié dans Eurosurveillance (réf. 5).
- Concernant l'isolat FRC0227, il a été obtenu à Reims à partir d'une plaie sur le pied d'une patiente de 67 ans atteinte de diabète. Cet isolat produit la toxine diphtérique et l'analyse génotypique a mis en évidence un ST328. Ce ST a déjà été observé dans un autre *C. ulcerans* isolé à Reims en 2006 à partir d'un écoulement auriculaire chez une patiente de 72 ans. Ce résultat confirme la persistance des isolats dans une zone géographique particulière. Dans aucun des deux cas il a été possible de mettre en évidence le portage de *C. ulcerans* chez les animaux de compagnie proches des deux patientes. La patiente du cas FRC0227 ayant interrompu le traitement antibiotique avant

la date prévue, le second prélèvement après traitement était encore positif. En effet, un *C. ulcerans* (FRC0251) porteur du gène *tox* a été isolé à partir de la plaie et le ST est identique au précédent isolat (ST328). Les prélèvements suivants réalisés après une durée de traitement antibiotique respectée se sont avérés négatifs.

- L'isolat FRC0228 a été obtenu à Vierzon à partir d'une plaie sur un des gros orteils chez une patiente de 59 ans. Cet isolat produit la toxine diphtérique et l'analyse génotypique a mis en évidence un nouvel ST, ST357. Bien que cette patiente soit entourée de plusieurs chats et chiens, aucun prélèvement vétérinaire n'a pu être réalisé car la patiente a refusé de coopérer pour l'enquête épidémiologique.
- L'isolat FRC0249 a été obtenu à Cahors à partir d'une plaie chez un patient de 77 ans (vaccination inconnue), aux lourds antécédents cardiovasculaires, souffrant d'une artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Amputé du 4ème orteil gauche en 2012, il a présenté en avril 2014 une gangrène non récupérable du 3ème orteil gauche. A J11 après l'amputation ce patient a présenté des lésions fibrineuses du moignon des orteils avec écoulement malodorant. Le prélèvement bactériologique a mis en évidence la présence de plusieurs microbes (*E.faecalis*, *A.faecalis* et *C.freundii*, *Proteus mirabilis*) ainsi qu'un *Corynebacterium ulcerans*, résistant à la pénicilline G et la fosfomycine et sensible aux autres β -lactamines et aux aminosides. Cet isolat ne produit pas la toxine diphtérique et l'analyse génotypique a mis en évidence un nouvel ST, ST358. L'enquête épidémiologique autour de ce cas n'a pas permis de mettre en évidence la source de la contamination. En effet, les recherches de corynebactéries du complexe *diphtheriae* par culture sur milieu spécifique réalisées sur les prélèvements du fils avec lequel séjournait le patient (écouvillonnage de gorge), et de son chien (prélèvements oculaire et nasal) se sont révélées négatives. Une communication par affiche sur ce cas a été présentée à la RICAI 2014 (réf.8).
- Concernant l'isolat FRC0260, il a été obtenu à Saint Gaudens, à partir d'une plaie chez une patiente de 87 ans. De manière similaire au cas FRC0249, l'enquête épidémiologique n'a pas abouti à la mise en évidence du portage dans l'entourage proche de la patiente (mari, infirmier soignant et chien). Cet isolat ne produit pas la toxine diphtérique, est résistant à la clindamycine (CMI = 1mg/L) et l'analyse génotypique a mis en évidence un ST331. Ce ST a été trouvé chez 8 autres *C. ulcerans* isolés entre 2001 et 2013 dans différentes régions géographiques en France Métropolitaine. Ceci met en évidence la capacité de dissémination au niveau géographique d'un isolat *C. ulcerans* ainsi que la capacité de cet isolat à continuer à circuler pendant plusieurs années.
- L'isolat FRC0279 a été obtenu à Bourg en Bresse à partir d'un prélèvement vétérinaire du liquide articulaire chez une chienne de chasse. Cet isolat est producteur de la toxine. L'analyse génotypique a mis en évidence un nouvel ST, ST364. Des prélèvements du

liquide articulaire réalisées chez la chienne après traitement antibiotique se sont avérés négatifs, ceci met en évidence l'efficacité du traitement. Mais, malgré l'efficacité du traitement antibiotique, la chienne a dû être euthanasiée car elle avait d'autres pathologies associées. Des prélèvements (pharyngés et oculaires) réalisés sur deux autres chiennes qui étaient en contact avec la chienne infectée se sont avérés négatifs.

2.2.2 Caractéristiques des isolats non porteurs du gène *tox*

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

Tableau 2 : Caractéristiques des isolats non porteurs du gène *tox*

N° CNR	Age/Sexe vaccin	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène <i>tox</i>	MLST
FRC0201	10 ans / F Inconnu	Plaie	Bron, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et intermédiaire à la Pristinamycine	-	350
FRC0203	5 ans / M	Plaie	Nice, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	351
FRC0204	48 ans / M Inconnu	Nasale	Le Chesnay, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	167
FRC0205	66 ans / M Inconnu	Plaie	Marseille, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) au Sulfaméthoxazole (CMI > 1024 mg/L) et intermédiaire au Triméthoprime (CMI = 6 mg/L)	-	356
FRC0206	39 ans / M Inconnu	Expectoration	Montpellier, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	359
FRC0223	62 ans / F Inconnu	Sinus	Coquelles, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) à la Rifampicine (CMI > 32 mg/L) et intermédiaire à la Ciprofloxacine (CMI= 1 mg/L)	-	365
FRC0229	73 ans / M Inconnu	Fibro aspiration bronchique	Nice, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	360

N° CNR	Age/Sexe vaccin	Prélèvement	Origine géographique	Identification	Resistance/ Intermédiaire	Gène tox	MLST
FRC0250	58 ans / M Inconnu	Lavage bronche-alvéolaire	Strasbourg, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	92
FRC0259	59 ans / F Inconnu	Hémoculture	Nancy, France	<i>C. diphtheriae</i> gravis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	361
FRC0263	15 ans / M Inconnu	Plaie	Troyes, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la rifampicine (CMI > 32mg/L)	-	362
FRC0265	8 ans / M Inconnu	Prélèvement osseux	Montpellier, France	<i>C. diphtheriae</i> gravis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la pénicilline (= 0,19 mg/L)	-	352
FRC0268	13 ans / M Inconnu	Plaie	Toulouse, France (Mayotte)	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	102
FRC0270	38 ans / M A jour	Plaie	Toulouse, France	<i>C. ulcerans</i>	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	325
FRC0271	28 ans / F Inconnu	Ponction de sinus	Creteil, France	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	353
FRC0272	65 ans / M Inconnu	Lavage bronche-alvéolaire	Rennes, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	226
FRC0274	41 ans / F Inconnu	Lavage bronche-alvéolaire	Grenoble, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	354
FRC0275	64 ans / F Inconnu	Aspiration bronchique	Chambéry, France	<i>C. diphtheriae</i> belfanti	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	294
FRC0210	6 ans / M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la Sulfamide (CMI > 1024 mg/L)	-	268
FRC0213	20 ans / M Revaxis, dernière dose en 2009	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> mitis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	95

FRC0261	5 ans/M Inconnu	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> gravis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L) et à la pénicilline (CMI = 0,125 mg/L)	-	En cours
FRC0276	8 ans / M	Plaie	Mayotte	<i>C. diphtheriae</i> gravis	Résistant à la Fosfomycine (CMI > 1024 mg/L)	-	355

France métropolitaine :

Dix-sept isolats non porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique provenant de la France métropolitaine ont été reçus au CNR en 2014. Seize appartiennent à l'espèce *diphtheriae* et un à l'espèce *ulcerans*. Neuf d'origine respiratoire, 5 d'origine cutanée, 1 d'une hémoculture et 1 d'un prélèvement osseux.

Il est important de noter que parmi les 9 isolats provenant des prélèvements respiratoires il y a sept *C. diphtheriae* biovar belfanti, confirmant la tendance mise en évidence ces dernières années (E. Farfour, et al. *J. Clin. Microbiol.* 2012). Tous les isolats d'origine cutanée ont le biovar mitis. Le *C. ulcerans* est aussi d'origine cutanée. L'âge des patients variait entre 5 et 73 ans. Le statut vaccinal de la plupart de patients était inconnu excepté pour un.

Parmi les 17 isolats 3 sont, soit résistants, soit ont une sensibilité diminuée à un antibiotique autre que la fosfomycine (rifampicine, pénicilline et pristinaïmycine) et 2 autres sont, soit résistants, soit ont une sensibilité diminuée à 2 antibiotiques (un isolat au sulfaméthoxazole et triméthoprime et l'autre à la rifampicine et à la ciprofloxacine).

Concernant l'analyse génotypique des isolats *tox* -, nous avons trouvé 12 nouveaux ST parmi les 17 isolats analysés. Ce résultat met en évidence une grande diversité génétique parmi les isolats *tox* - qui circulent actuellement en France métropolitaine. En parallèle nous observons aussi que certains isolats *tox* - continuent à circuler. En effet, nous avons trouvé que 5 des isolats ont un ST déjà répertorié. Le ST de l'isolat FRC0204, obtenu à partir d'un prélèvement nasal, est le ST167. Ce ST avait déjà été trouvé chez deux isolats qui avaient été obtenus en 1991 et en 2007 en France métropolitaine à partir également des prélèvements nasaux. De manière similaire, le ST de l'isolat FRC0250, obtenu à Strasbourg à partir d'un lavage broncho-alvéolaire, est le ST92. Ce ST a été déjà retrouvé chez un *C. diphtheriae* isolé aussi à Strasbourg, en 2008, à partir d'un prélèvement respiratoire. Un autre isolat, le FRC0268, possède le ST102, qui avait été retrouvé auparavant chez quatre autres isolats obtenus à Mayotte entre 2008 et 2013. Or, le patient à partir duquel l'isolat FRC0268 a été obtenu avait séjourné à Mayotte pendant un mois et demi. Du même, le ST 226 trouvé chez l'isolat FRC0272 avait déjà été trouvé chez un isolat obtenu à Paris en 1985.

Le ST de l'isolat *C. ulcerans tox*- (FRC0270) est ST325. Ce ST avait été trouvé précédemment chez 17 autres isolats circulant aussi bien en France qu'en Allemagne entre les années 1980 et 2014. Parmi ces 17 isolats on trouve aussi des isolats *tox* +, parmi lesquels les isolats FRC0212, FRC0219 et FRC0220. Un cas similaire a déjà été observé pour le ST8 qui

est un des ST fréquemment retrouvé chez des isolats *C. diphtheriae tox+* circulant en Russie ou *tox-* qui circulent en Pologne.

Mayotte :

Quatre isolats *tox-* ont été reçus en provenance de Mayotte et tous ont été obtenus à partir de prélèvements cutanés. Tous appartiennent à l'espèce *C. diphtheriae*. Aucun de ces isolats n'a le biovar belfanti, ce qui est souvent le cas dans les zones d'endémie et indique bien la différence entre la France métropolitaine et Mayotte. L'âge des sujets variait entre 5 et 20 ans. Leur statut vaccinal était inconnu, à l'exception du patient de 20 ans, qui avait reçu une dernière dose de Revaxis en 2009, mais l'isolat ne portant pas le gène *tox*, l'immunité vaccinale ne peut entrer en jeu. Concernant la susceptibilité aux antibiotiques, en plus de la fosfomycine, un des isolats est résistant aux sulfamides et l'autre à la pénicilline.

L'analyse génomique a montré un nouvel ST, ST355 pour un des isolats (FRC0276). Pour deux autres isolats leurs ST ont été déjà observés auparavant à Mayotte et confirment la circulation des isolats *tox* – dans cette zone géographique.

2.2.3 Isolats ne faisant pas partie du complexe diphtheriae

Depuis que nous avons repris le CNR en 2008, plusieurs identifications erronées nous sont parvenues. Nous avons confirmé que les identifications par API coryne posent des problèmes surtout au niveau des espèces *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* et que les identifications par Viteck peuvent être fausses, au niveau des trois espèces. Seules les identifications par spectrométrie de masse, n'avaient jamais posé de problème jusqu'en 2014 quand nous avons reçu par la première fois, un isolat identifié par maldi-tof comme étant un *C. diphtheriae* mais qui, après vérification au CNR, ne l'était pas. En effet, en 2014 nous avons eu à traiter 5 isolats initialement identifiés comme des *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* par les laboratoires de biologie médicale et hospitaliers mais qui se sont avérés ne pas faire partie du complexe *diphtheriae* après vérification de l'identification au CNR aussi bien par la technique maldi-tof que par l'identification moléculaire. Trois des isolats avaient été identifiés par Viteck, 1 par maldi-tof et pour 1 isolat la méthode d'identification n'avait pas été renseignée.

Nous pensons que l'erreur au niveau de l'identification par maldi-tof est une erreur due au laboratoire plutôt qu'à la technique elle-même. En fait, nous pensons que le laboratoire concerné nous aurait adressé un isolat qui ne correspondait pas à l'isolat identifié initialement comme étant un *C. diphtheriae*. Nous avons essayé de confirmer cette hypothèse mais le laboratoire n'a pas été en mesure de nous fournir des explications claires à ce sujet.

Ces résultats soulignent l'importance de l'utilisation des deux méthodes pour confirmer l'identification des isolats. Nous utilisons la technique maldi-tof dans un premier temps car elle est très rapide et fiable, et ensuite nous confirmons par la technique d'identification moléculaire.

2.2.4 Autres identifications

Pendant l'année 2014, nous avons reçu 4 échantillons qui nous ont été adressés pour recherche du gène *tox* et du matériel génétique de bactéries appartenant au complexe *diphtheriae* en raison de symptômes cliniques suggestifs d'une angine diphtérique. Ces échantillons se sont tous avérés négatifs.

2.2.5 Distribution des souches ou échantillons de matériel biologique

Dans le cadre de notre coopération avec Aleksandra Zasada du National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene à Varsovie en Pologne, nous lui avons envoyé dix isolats de *C. diphtheriae* pour analyser les gènes pili ainsi que les protéines qui sont codées par ces gènes et leur aptitude à former des biofilms sur des différentes surfaces. (Voir le point 6.2.4)

3. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE

3.1 INTRODUCTION

Les cas de diphtérie, dans les zones où la maladie est endémique, sont dus dans 99% des cas à des bactéries ayant le biotype *gravis*. Les groupes à risque sont les nouveau-nés non vaccinés et les plus de 40 ans dont l'immunité a diminué par manque de rappel vaccinal. La vaccination montre un effet protecteur très significatif mais des progrès sont à faire pour rappeler à la population vieillissante que les rappels vaccinaux ne sont pas que pour les enfants !

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

point 2.2.1 nous avons pu montrer la contamination d'une patiente par un *C. ulcerans* à partir d'une griffure par un chat porteur de *C. ulcerans*.

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

3.2 CAS DE DIPHTERIE EN FRANCE

En France, depuis la généralisation de la vaccination en 1945, la diphtérie est contrôlée et entre 1990 et 2001 aucun cas n'a été déclaré. Depuis 2002, 173 isolats ont été reçus au CNR. Parmi ces isolats, 50 étaient des Corynebactéries porteurs du gène *tox* (10 *C. diphtheriae* et 40 *C. ulcerans*). Les isolats *C. diphtheriae* ont été obtenus à partir de cas importés. Les cas dus à des *C. ulcerans* étaient majoritairement des personnes possédant des animaux de compagnie ou en contact régulier avec des personnes ayant des animaux de compagnie (Tableau 1). Les infections concernent le plus souvent des adultes qui n'avaient pas eu de rappel vaccinal récent. En 2014, les sept cas étaient des diphtéries cutanées.

En ce qui concerne les 104 isolats non porteurs du gène *tox*, on s'aperçoit que leur nombre varie selon les espèces. Les *C. diphtheriae tox-* (collectés sur des sujets de 2 à 94 ans) représentent 90% des *C. diphtheriae* reçus au CNR alors que les isolats de *C. ulcerans tox-* (collectés sur des sujets de 38 à 74 ans) ne représentent que 10% des *C. ulcerans* reçus au CNR.

Ces observations confirment que les *C. diphtheriae tox+* ne circulent plus en France mais que les *C. diphtheriae tox-* circulent toujours et que les *C. ulcerans tox+* sont maintenant détectés en raison du vieillissement de la population et affectent surtout les personnes âgées en contact avec des animaux de compagnie.

4. ALERTE DURANT L'ANNEE 2014

Les alertes sont réalisées selon les nouvelles recommandations (site http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf). Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignement afin de collecter un maximum d'informations cliniques ainsi que des données sur le mode de vie du patient (présence d'animaux, voyages...). Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox*, il contacte l'InVS par téléphone et par courriel (diphtherie-invs@invs.sante.fr) ainsi que le laboratoire expéditeur. Sept alertes pour des isolats obtenus à partir de prélèvements humains ainsi que trois signalements des isolats porteurs du gène *tox* obtenus à partir des prélèvements vétérinaires ont été faites pendant l'année 2014.

5. ACTIVITES D'INFORMATION ET DE CONSEILS

Site internet du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae>

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

6.1 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CNR-CCD

6.1.1 Constitution d'une collection

Nous avons, en 2014, poursuivi la constitution d'une collection avec le maximum de renseignements au niveau des caractéristiques de chaque isolat. Cette collection regroupe à présent 298 isolats.

6.1.2 Propriétés des *C. diphtheriae* collectés en 2014

Outre l'identification, la recherche du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique par le test Elek (***nous rappelons à ce propos que nous pouvons réaliser ce test grâce à notre collaboration avec l'Institut Pasteur de St. Petersbourg***), nous utilisons en routine le typage des isolats reçus au CNR par la technique du MLST.

Concernant le ST des 18 isolats *C. diphtheriae* reçus au CNR en 2014, nous avons identifié 12 nouveaux ST. L'analyse phylogénique au niveau des ST de ces isolats montre qu'ils se distribuent dans les deux lignages principaux décrits précédemment dans le schéma MLST de *C. diphtheriae* (Fig. 2). Sept se retrouvent dans le lignage I, qui est constitué par des isolats appartenant aux biovars mitis et gravis, et 5 se trouvent dans le lignage II, qui est constitué exclusivement par le biovar belfanti. Aucun isolat reçu en 2014 ne fait parti du lignage III.

Dans le lignage I, on observe un sous-groupe constitué par 4 isolats dont 3 ont des ST nouveaux : FRC0265, FRC0276 et FRC0259. Ces isolats ont des origines diverses aussi bien anatomiques que géographiques. Ceci indique que ces quatre isolats collectés récemment en France sont différents du reste des isolats *tox*- du lignage I, et confirment nos observations des années précédentes sur la diversification des isolats *tox*- circulant en France métropolitaine.

Concernant les isolats en provenance de Mayotte, un des isolats (FRC0276) a un nouvel ST. Ceci montre une tendance à la diversification des isolats circulant dans l'île.

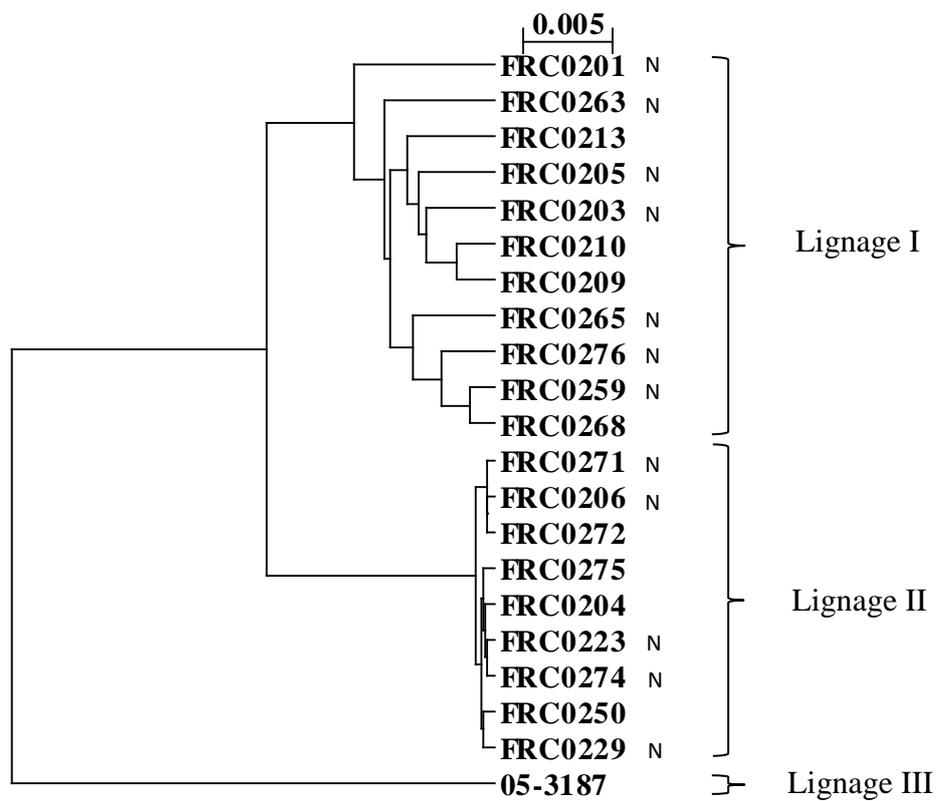


Figure 2. Représentation phylogénique utilisant la méthode de neighbour-joining corrigée avec l'algorithme Jukes-Cantor pour les isolats *C. diphtheriae tox-* collectés en 2014. Les isolats ayant un nouveau ST sont indiqués par un « N ».

6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE

6.2.1 Développement de la technique MLST pour *C. ulcerans*

Le développement de la technique MLST pour *C. ulcerans* a été réalisé grâce à la collaboration avec Frances Bolt et Christopher Dawson du Biological Sciences, Warwick University, Coventry, United Kingdom ainsi que d'Eric Farfour et Sophie Guillot dans notre Unité.

Cinq des sept gènes de ménage utilisés dans la technique MLST pour *C. diphtheriae* (*atpA*, *fusA*, *leuA*, *odhA* et *rpoB*) ont des séquences hautement conservées entre *C. ulcerans* et *C. diphtheriae* et peuvent être amplifiés chez *C. ulcerans* en se servant des amorces utilisés pour leur séquençage chez *C. diphtheriae*. Cependant, deux gènes (*dnaE* et *dnaK*) ont des séquences plus divergentes et ne peuvent pas être amplifiés avec les amorces utilisées pour *C. diphtheriae*. Des nouvelles amorces ont été dessinées pour ces deux allèles aussi bien pour leur amplification que pour leur séquençage. De ce fait, la technique MLST a pu être adaptée à *C. ulcerans*. Pour l'analyse des séquences obtenues après amplification des 7 gènes de ménage des isolats *C. ulcerans*, nous avons été autorisés par Keith Jolley à utiliser la base de données MLST de *C. diphtheriae*. En effet, Keith Jolley qui est le développeur de la base de données MLST de *C. diphtheriae* a considéré valable d'ajouter l'espèce *ulcerans* dans la même base de données que celle de *C. diphtheriae* vu le nombre de séquences hautement conservées entre les deux espèces. Cependant il se peut que dans le futur une base de données spécifique pour *C. ulcerans* soit créée.

Après adaptation de la technique MLST nous avons donc réalisé l'analyse génomique de 58 isolats de *C. ulcerans* de notre collection. Vingt ST différents ont été trouvés. Ces 20 ST sont répartis dans deux groupes phylogéniques (Fig. 3) et parmi lesquels il y a 5 complexes clonaux (sous-groupes de ST ne différant que par un allèle, Fig. 4)

Il n'est pas possible de distinguer les isolats *tox+* et *tox-* sur leurs profils alléliques, de même que leurs origines animale ou humaine ou la présentation clinique de l'infection. Cependant, cette technique est très utile dans les enquêtes épidémiologiques car elle permet d'identifier la source de l'infection autour d'un cas, comme nous l'avons démontré (réf. 5)

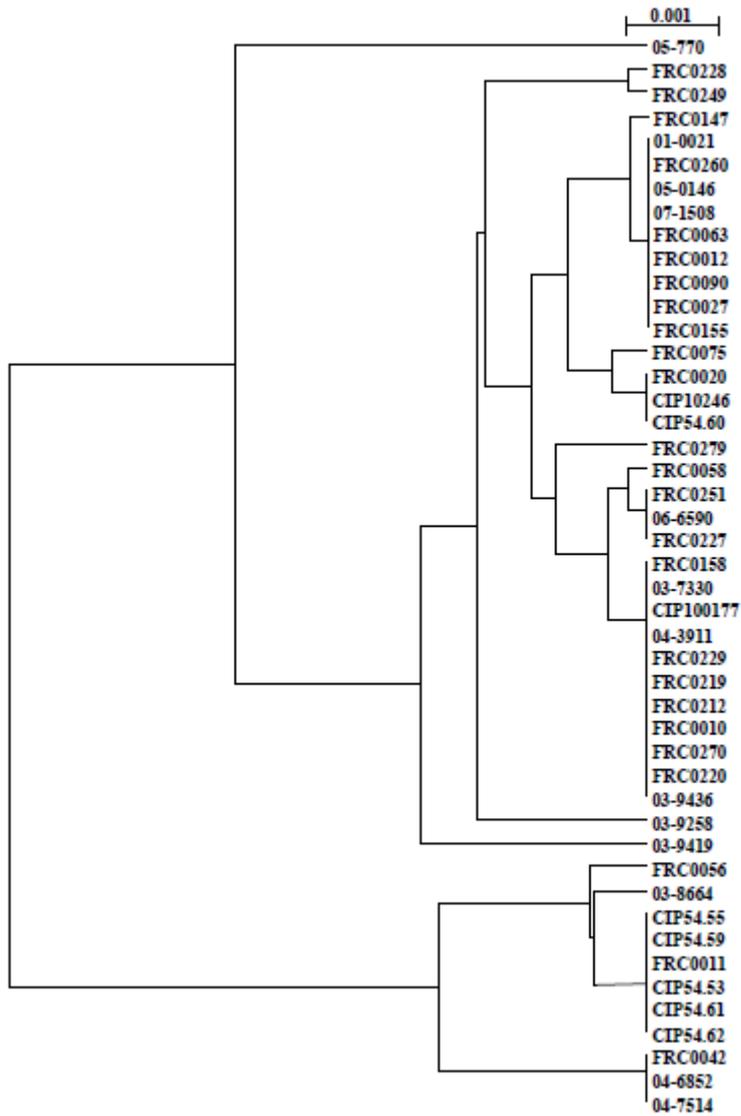


Figure 3. Représentation phylogénique, utilisant la méthode de neighbour-joining corrigée avec l'algorithme Jukes-Cantor, de 58 isolats *C. ulcerans* de la collection du CNR de corynebactéries du complexe *diphtheriae*.

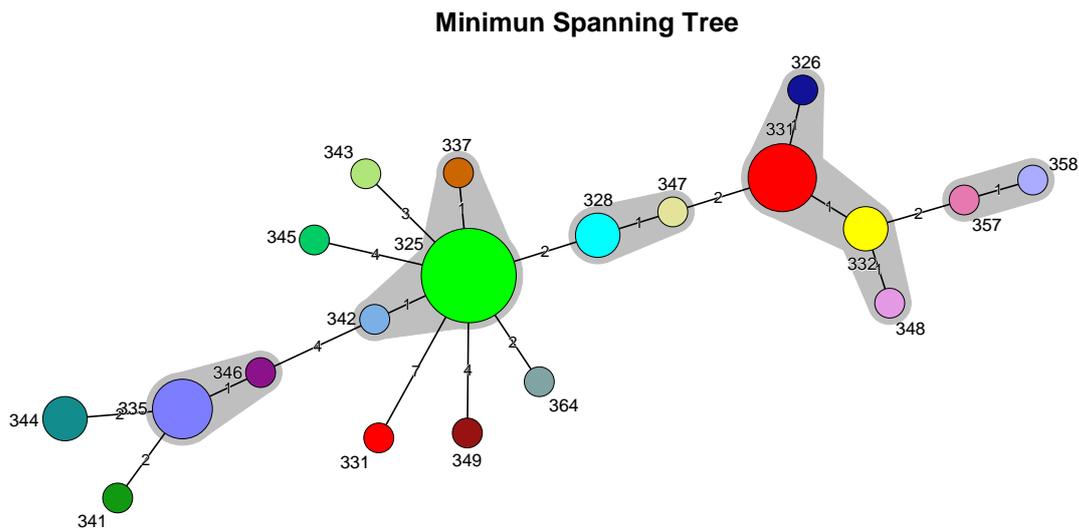


Fig 4. Le minimum spanning tree a été construit à partir du logiciel BioNumériques. Chaque cercle correspond à un ST. Le diamètre des cercles est proportionnel au nombre d'isolats par ST. Les numéros sur les branches indiquent les nombre d'allèles qui diffèrent entre les différents ST. Les complexes clonaux sont indiqués par les zones ombragées en gris et correspond à des ST ne différant les uns des autres que par un allèle.

6.2.2 Collaboration avec le Brésil

*Séquençage du génome des isolats de *C. ulcerans* circulant en France*

Dans le cadre d'une collaboration avec Vasco Azevedo, de l'Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, à Belo Horizonte nous lui avons transmis l'ADN de 37 isolats de *C. ulcerans* afin que le séquençage du génome de ces isolats soit réalisé. En 2014 le séquençage du génome complet de l'isolat FRC58 a été publié. Jusqu'à la publication de ce génome seulement 3 autres génomes avaient été déposés au National Center for Biotechnology Information (NCBI). L'équipe de Vasco Azevedo continue le séquençage d'autres ADN car les données générées par les nouveaux génomes sont utiles pour identifier des cibles d'antibiotiques et éventuellement vaccinale au moyen d'une analyse comparative ainsi que pour mieux caractériser les mécanismes de virulence de ce pathogène émergent (réf. 6).

6.2.3 Collaboration avec la Roumanie

Valeur ajoutée des méthodes moléculaires pour la surveillance de la diphtérie

L'objectif de l'étude était de caractériser une sélection d'isolats de *C. diphtheriae* collectés en Roumanie pendant plus de 40 années ainsi que pendant les épidémies récentes dans trois états de l'ancienne Union Soviétique.

La caractérisation a été réalisée par les techniques MLST et ribotypage. Sorin Dinu, du *Molecular Epidemiology Laboratory, "Cantacuzino" N.I.R.D.M.I., Bucharest, Romania*, avait été formé dans notre Unité à la technique du MLST et à l'utilisation du logiciel BioNumerics pour analyse des séquences.

Le but était de corrélérer les données obtenues par les deux techniques ainsi que d'évaluer la valeur ajoutée de ces méthodes moléculaires pour la surveillance de la diphtérie.

Un total de 207 isolats de *C. diphtheriae* recueillis entre 1961-2007 ont été sélectionnés à partir de la collection du Laboratoire national de référence pour la diphtérie en Roumanie. Ces isolats ont été obtenus à partir de patients atteints de diphtérie, pharyngite, porteurs asymptomatiques ainsi que des contacts de cas diphtérie.

Le ribotypage des 207 isolats a été réalisé comme décrit précédemment (*Damian et al., Res. Microbiol., 2002*). Quarante-six des 207 isolats, représentant des ribotypes identifiés, ont été caractérisés par MLST. L'analyse phylogénétique a été réalisée à partir d'un fragment d'ADN de 2544 nt. résultant de la concaténation des 7 loci dans le schéma MLST.

D'un nombre total de 32 ribotypes identifiés parmi les isolats de la collection roumaine, seulement 14 correspondaient aux ribotypes décrits dans la banque de données internationale avec un score Dice de 100% (18 ribotypes si on considère un score DICE de 88,9%).

Concernant l'analyse MLST, les isolats sont répartis en 24 STs : 13 STs étaient disponibles dans la banque de données internationale et 11 étaient de STs nouveaux.

Aucune corrélation entre les STs des isolats sélectionnés et leur statut toxigénique n'a été observée, ni entre ST et ribotypes. Cependant les souches isolées lors d'épidémies présentent des caractéristiques moléculaires identiques.

Cette étude rétrospective met en évidence une grande diversité génétique des isolats *C. diphtheriae* circulant les quarante dernières années en Roumanie ainsi que dans trois Etats de l'ancienne Union Soviétique.

Une banque de données représentant les ribotypes et ST circulants en Roumanie a été créée afin de détecter les isolats importés et de participer à la surveillance internationale de la circulation des isolats de *C. diphtheriae*.

Une affiche avec ces résultats a été présentée au « Scientific Symposium of the Institut Pasteur International Network » en septembre 2014 (réf. 9).

6.2.4 Collaboration avec la Pologne

Analyse des gènes codant les pili ainsi que les protéines codées par ces gènes

L'adhérence des bactéries pathogènes à des cellules hôtes est une étape cruciale lors de l'infection. La présence de facteurs d'adhésion spécifiques sur la surface cellulaire bactérienne détermine le tropisme de l'agent pathogène dans les tissus exprimant certains récepteurs de surface. L'adhésion est principalement médiée par des structures filamenteuses

appelées pili. Trois structures de pilus distincts peuvent être produites par *Corynebacterium diphtheriae*: pili SpaA-, SpaD- et SPAH-type. Les gènes responsables de la synthèse des pili codent un total de neuf protéines, nommés SpaA à SPAI, et six sortases (enzymes responsables de l'ancrage des protéines à la paroi bactérienne), nommés srtA à srtF. Tous les gènes codant les pili sont situés sur des îlots de pathogénicité et peuvent être acquis ou perdus par les différents isolats.

Dans le cadre de notre coopération avec Aleksandra Zasada du National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene à Varsovie en Pologne, une étude visant à analyser la présence de gènes codant les pili et des protéines codées par ces gènes chez des souches de *C. diphtheriae* est en cours. En effet, 83 ADNs des souches de la collection du CNR-CCd ont déjà été analysés. Ces 83 souches sont des souches récoltées dans divers pays et avaient servi auparavant à réaliser la nomenclature internationale pour la ribotypie de *Corynebacterium diphtheriae* (Grimont PA et al, Res Microbiol. 2004). Quatorze gènes codant les pili ont été recherchés (SpaA, SpaB, SpaC, SpaD, SpaE, SpaF, SpaG, SpaH, Spal, srtA, srtB, srtC, srtE et srtD). Les résultats sont très intéressants parce qu'il y a beaucoup de différences au niveau de la quantité des gènes codant les pili présents dans les 83 souches internationales.

Cependant, 10 isolats polonais non porteurs du gène *tox* collectés à partir d'infections invasives, possèdent les 14 gènes codant les pili. Les études préliminaires des profils de protéines des isolats polonais suggèrent que les profils sont identiques pour les isolats invasifs collectés récemment mais significativement différentes des isolats collectés en Pologne dans les années 1990.

Nous avons donc envoyé, en décembre 2014, 10 isolats de notre collection obtenus en France à partir d'infections invasives pour analyser la présence des gènes codant les pili mais aussi pour analyser les protéines codées par ces gènes et évaluer la capacité de formation de biofilm sur des différentes surfaces par ces isolats et les comparer avec les profils des isolats polonais. Ces analyses sont en cours.

6.3 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-CCD

6.3.1 Publications

1- Both L, Neal S, De Zoysa A, Mann G, Czumbel I, Efstratiou A; Members of the European Diphtheria Surveillance Network. Collaborators: Huhulescu S, Detecheva A, Pieridou-Bagatzouni D, Zavadilova J, Fuursted K, Peetso R, He Q, **Badell E**, Sing A, Alexandrou-Athanasouli H, Tzanakaki G, Tirczka T, Svandis Gretarsdottir O, Murphy P, Wall N, Valinsky L, Monaco M, Paberza R, Liachaviciute A, Reichert P, Cuschieri P, Reubsæet F, Steinbakk M, Piekarska K, Bajanca Lavado P, Damian M, Lengyelova V, Mioc V, Herrera Leon S, Morfeldt E, Nar Otgun S. **External quality assessments for microbiologic diagnosis of Diphtheria in Europe (2014)**. J Clin Microbiol. Dec;52(12):4381-4. doi: 10.1128/JCM.01776-14. Epub 2014 Oct 8.

- 2- Farfour E, **Badell E**, Jacques Natali L, Dommergues MA, Blot S, **Guiso N**, Pangon B, Foucaud P. **Answer to october 2014 photo quiz** (2014). J Clin Microbiol. Oct;52(10):3832-3.
- 3- Farfour E, **Badell E**, Jacques Natali L, Dommergues MA, Blot S, **Guiso N**, Pangon B, Foucaud P. **Photo quiz: multiple skin lesions on a 9-year-old boy returning from mali** (2014). J Clin Microbiol. Oct;52(10):3523.
- 4- Zasada AA, Formińska K, Wołkowicz T, **Badell E**, **Guiso N**. **The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates** (2014). Lett Appl Microbiol. Sep;59(3):292-8.
- 5- Vandentorren S, **Guiso N**, **Badell E**, Boisrenoult P, Micaelo M, Troché G, Lecouls P, Moquet MJ, Patey O, Belchior E. **Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a fatal human case and her feline contacts, France, March 2014** (2014). Euro Surveill.;19(38):pii=20910. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20910>
- 6- Silva Ado S, Baraúna RA, de Sá PC, das Graças DA, Carneiro AR, Thouvenin M, Azevedo V, **Badell E**, **Guiso N**, da Silva AL, Ramos RT. **Draft Genome Sequence of *Corynebacterium ulcerans* FRC58, Isolated from the Bronchitic Aspiration of a Patient in France** (2014). Genome Announc. Jan 9;2(1)

6.3.2 Communications orales

- 7- **E. Badell**, E. Farfour, T. Benoit-Cattin, L. Collet, S. Guillot, **N. Guiso**
 Dans le cadre de la 34^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse "RICAI" :
 "Analyse des populations de *C. diphtheriae* isolées à Mayotte". CNIT. La Défense, Paris. 28 novembre 2014

6.3.3 Affiches

- 8- **M. Haouane**, **E. Badell**, V. Rémy, S. Guyetand, A. Le Coustumier, **N. Guiso**.
 Dans le cadre de la 34^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse "RICAI" :
 "Découverte fortuite d'un cas autochtone de diphtérie cutanée" CNIT. La Défense, Paris. 27-28 novembre 2014
- 9- "M. Damian, S. Dinu, **E. Badell**, C. Dragomirescu and **N. Guiso**"
 Dans le cadre du Scientific Symposium of the Institut Pasteur International Network :
 "Added value of molecular methods for diphtheria monitoring" Institut Pasteur, Paris. 10-13 septembre 2014

6.3.4 Enseignement

Nicole Guiso :

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses, exemple de la coqueluche et de la diphtérie" - Institut Pasteur – le 11 février 2013 (3 heures)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of Pertussis and Diphtheria" Institut Pasteur - le 12 mars 2014 (1h30)

Dans le cadre du cours DIU de vaccinologie et prévention des Maladies Infectieuses: "vaccination diphtérique" Faculté Trousseau - 08 décembre 2014

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE

Pas de coopération cette année avec les laboratoires de santé animale. Cependant nous avons réalisé la recherche du portage de *C. ulcerans* sur une quantité importante de prélèvements vétérinaires suite à 6 alertes.

Il est prévu dans un futur proche d'établir une coopération avec le Dr. Séverine BOULLIER à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, pour la recherche du portage de *C. ulcerans* chez des chiens.

Annexe 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR :

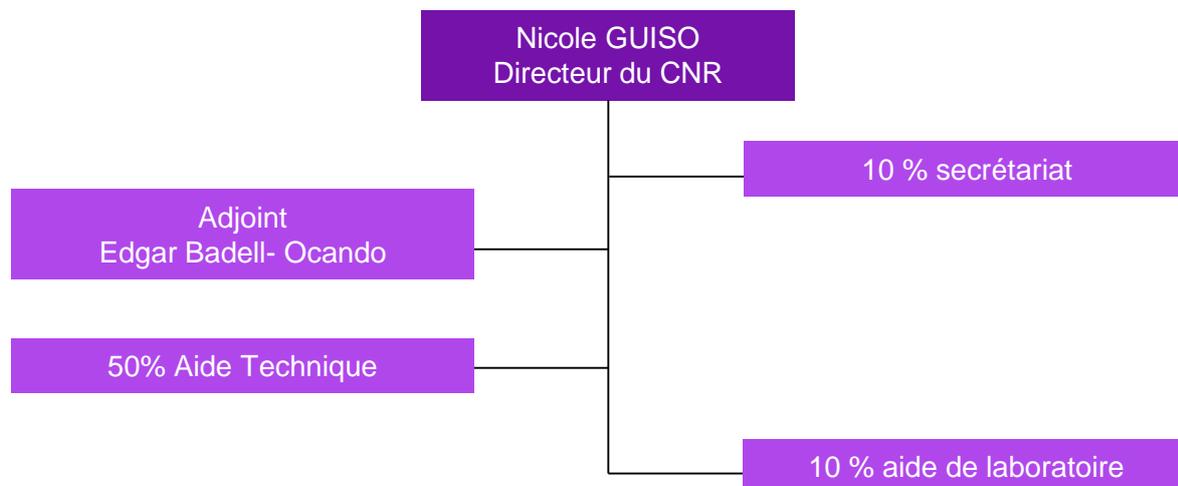
1.1 MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR :

- **Poursuivre le développement de la collection d'isolats existants :** Toutes les corynebactéries du complexe *diphtheriae* collectées en 2014 ont été caractérisées et mises en collection ;
- **Poursuivre l'analyse de la résistance aux antibiotiques de tous les isolats** reçus au CNR ;
- **Participer à la surveillance épidémiologique** en confirmant ou infirmant l'identification de tous les isolats cliniques du complexe *diphtheriae*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*, reçus des laboratoires français ;
- **Assurer le maintien d'une compétence bactériologique** concernant les bactéries du complexe *diphtheriae* ;
- **Apporter un soutien technique** (conseils, informations bibliographiques ou épidémiologiques, vérification de souches) aux laboratoires de biologie médicale, hospitaliers ou privés ;
- **Contribuer au réseau de surveillance européen ;**
- **Participer aux contrôles de qualité européens.**

1.2 EQUIPE :

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur la Figure 5. Ce CNR fait partie de l'unité de recherche PTMMH qui comprend aussi le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses, et une équipe de recherche avec un chef de laboratoire Institut Pasteur, un directeur de recherche au CNRS, un ingénieur, deux techniciens supérieurs, un stagiaire post-doctoral, deux étudiants en thèse et des stagiaires du réseau international des Instituts Pasteur.

Figure 5 : Organigramme en 2014



1.4 DEMARCHE QUALITE

Les objectifs de la politique qualité définis pour 2014 sont indiqués Figure 7.

Figure 7 : Politique qualité de l'Unité de Recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » et du CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*

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

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

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

Dans cette dynamique, voici les objectifs de l'unité pour 2014 :

- Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité sera donc particulièrement vigilante :
 - à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
 - au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.
- Nous porterons également nos efforts sur l'optimisation des performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de nos techniques de PCR en temps réel et sur la mise au point de nouvelles techniques de PCR temps réel, d'analyses et comparaison de séquences génomiques, de transcriptomique et de protéomique.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun cherchera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification plus efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.
- Enfin, les chercheurs et techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la planification des expériences et au pilotage des projets via l'élaboration de protocoles d'expériences décrivant les objectifs du projet, les moyens et les techniques à mettre en œuvre pour les atteindre, les résultats attendus et les risques de ne pas aboutir comme prévu (identification et prise en compte des freins probables).
- Dans le cadre de la politique qualité des CNRs l'unité c'était fixée comme objectif, en 2013 l'application de la norme ISO 15189 (exigences particulières concernant la qualité et la compétence), pour les techniques de diagnostic moléculaire par PCR en temps réel des infections à *Bordetella* et par PCR en point final pour la détection du gène de la toxine diphtérique. Cet objectif a été atteint car les techniques mentionnées ont été accréditées sous le numéro 8-2588 en novembre 2013. Les objectifs fixés pour la suite sont l'accréditation ISO 15189 partielle vers la fin 2016 et complète avant le 1er novembre 2020 conformément à l'article 8 de la loi n° 2013-442 du mai 2013.

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

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

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

Historique :

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

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

Bilan des actions réalisées en 2014 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie) ;
- Mise à jour du manuel qualité (V2)
- Formations : WebCampus (utilisateur et administrateur) et Kalilab ;
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 ;
- Revue de direction LREMS ;
- Inclusion de la vague 3 (CNR Anaérobie, CNR Yersinia, CNR Mycose et antifongique et CNR *E. Coli*) dans la démarche d'accréditation ISO 15189.
- Création d'une vague 4 (CNR HPV et Vibron Choléra)

Evènements d'importance en 2014 :

- Audit reporté en janvier 2015
- Mise à jour des pages web du CNR CCD dans un format et en incluant des informations permettant d'être en adéquation avec les conditions imposées par la norme ISO 15 189

Perspectives 2015 :

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars à mai 2015
- Revue de direction LREMS : Mai 2015
- Finalisation dossiers de validation de méthode (3ème vagues) : Mars 2015
- Audit de suivi ISO 15189 version 2007 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : janvier 2015
- Audit ISO 15189 de renouvellement en version 2012 : juin 2015

Annexe 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR-CCD

La recherche du gène *tox* se fait par PCR après extraction du matériel génétique de la bactérie.

L'identification des bactéries se fait par maldi-tof et la confirmation par PCR multiplex

La détermination du biotype est effectuée par test Rosco

La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* est réalisée à l'aide de disques. Les diamètres critiques retenus sont ceux définis dans les recommandations 2014 de la Société Française de Microbiologie. Si une résistance est observée la détermination de la CMI est réalisée par E-test.

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

2.2 CONSTITUTION D'UNE COLLECTION

Notre collection regroupe 298 isolats, 173 isolats reçus au CNR entre 2000 et 2014 et 125 souches de référence conservées aussi à la Collection de l'Institut Pasteur (CIP). L'ensemble de ces isolats a été re-caractérisé avec les techniques nouvellement développées, en ce qui concerne le biotype, la présence du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique. L'ensemble des nouvelles caractéristiques des souches de référence a été ajouté dans le catalogue de la CIP.



Added value of molecular methods for diphtheria monitoring



Maria Damian¹, Sorin Dinu¹, Edgar Badell^{2, 3}, Cerasella Dragomirescu^{4, 5} and Nicole Guiso^{2, 3}

¹Molecular Epidemiology Laboratory, "Cantacuzino" N.I.R.D.M.I., Bucharest, Romania

²Institut Pasteur, Molecular Prevention and Therapy of Human Diseases, Paris, France

³CNRS URA-3012, Paris, France

⁴Bacterial Respiratory Infections Laboratory, "Cantacuzino" N.I.R.D.M.I., Bucharest, Romania

⁵Department of Microbiology, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania
mdamian@cantacuzino.ro

Background

- *Corynebacterium diphtheriae* is the causative agent of diphtheria, a life-threatening respiratory disease.
- Despite the existence of an efficient vaccine (1920s), the disease is re-emerging in countries with low vaccination coverage and imported cases are observed in countries with high vaccination coverage.
- An Increase in Infections caused by non-toxicogenic *C. diphtheriae* isolates is recorded worldwide.
- In Romania, vaccination was introduced in 1960 and a decreasing trend of vaccine coverage has been observed in the recent years (DTP4 coverage <95%, 2012). No cases of diphtheria have been recorded since 1990 and no toxicogenic strains have been isolated since 1997.

Objectives

- The study aimed: (I) to characterize by multilocus sequence typing (MLST) and ribotyping a selection of *C. diphtheriae* isolates collected in over forty years in Romania and during the recent epidemics in three states of the former Soviet Union, (II) to correlate the resulted typing data and (III) to evaluate the added value of this molecular methods for diphtheria surveillance.

Material and methods

Bacterial isolates

□ A total of 207 *C. diphtheriae* isolates collected between 1961-2007 and recovered from patients with diphtheria, pharyngitis, tonsillitis, asymptomatic carriers and diphtheria contacts, were selected from the collection of the National Reference Laboratory for Diphtheria in Romania (Table 1).

PCRs for tox gene detection

□ DNA was extracted as previously described (Regnault et al., *Res. Microbiol.*, 1997) and used as template in two PCR assays targeting tox gene (Pallen et al., *J. Clin. Pathol.*, 1991; Hauser et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1993).

Diphtheria toxin production evaluation

□ The toxicogenicity of the isolates was assessed by Elek's test using an "in-house" serum as previously described (Damian et al., *Res. Microbiol.*, 2002)

Ribotyping

□ All 207 isolates were subjected to ribotyping as previously described (Damian et al., *Res. Microbiol.*, 2002)

MLST and phylogenetic analysis

□ Forty-six of the 207 isolates, representative for the identified ribotypes, were characterized by MLST as proposed by Boit et al. (*J. Clin. Microbiol.*, 2010).

□ The phylogenetic analysis was inferred from a 2544 nt. DNA fragment resulted by concatenation of the 7 loci in the MLST scheme (BioNumerics software v6.5, and UPGMA algorithm).

Table 1. Summary of the isolates analyzed in this study

Origin/ Total no. of isolates	Isolation period	No. of isolates	Biotype/ No. of Isolates	Toxin production/ No. of Isolates
RUSSIA/44	1997-1998	44	Gravic/37 Intermedius/7	Tox+/32 Tox-/12
MOLDOVA/62	1998	62	Gravic/48 Intermedius/8	Tox+/62
BELARUS/6	NK*	6	Gravic/6	Tox+/6
ROMANIA/108	1961-1968	36	Gravic/22 Mitu/3	Tox+/21 Tox-/14
	1970-1982	26	Gravic/21 Intermedius/4	Tox+/20 Tox-/6
	1982-2007	48	Gravic/36 NK/11	Tox-/36 NK/11

*Not known

Results and discussion

□ From a total number of 32 ribotypes identified among the isolates in our collection, only 14 matched the existing ribotypes described in the International data bank with a 100% Dice score (18 if 88.9% is considered also).

□ The analyzed isolates, were distributed into 24 sequence types (STs) : 13 STs were available in the international data bank and 11 were new STs. (figure 1).

□ No correlation between the STs of toxicogenic or non-toxicogenic selected isolates was observed, neither between certain ST and ribotypes. However strains isolated during epidemics exhibit identical molecular features (figure 1).

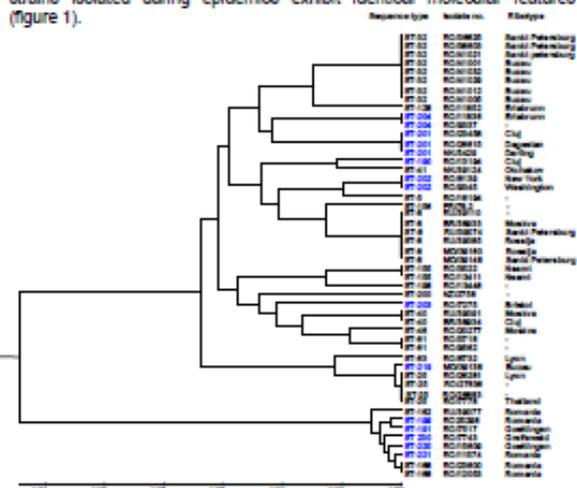


Figure 1. UPGMA dendrogram based on a 2544 nt. DNA fragment resulted by concatenation of the 7 loci in the MLST scheme. New sequence type (ST) depicted in this study are highlighted in blue.

Conclusions

- Our retrospective study depicted a great genetic diversity of the *C. diphtheriae* isolates circulating in the last forty years in Romania and in three states of the former Soviet Union. However strains isolated during epidemics exhibit identical molecular features.
- No obvious correlation can be made by comparing the data resulted from MLST and ribotyping.
- A data bank representing the circulating ribotypes and STs in Romania was created in order to detect imported strains and to participate to the international monitoring of *C. diphtheriae* circulation.

This work was supported from the budget of ACIP A-01-2009 RiDPHNET project managed by Dr. Nicole Guiso (Institut Pasteur, Paris, France)



Découverte fortuite d'un cas autochtone de diphtérie cutanée

M. Hacoune¹, E. Badell², V. Rémy³, S. Guyotand², A. Le Coustumier¹, N. Guiso⁴

¹Service de Biologie - Service des maladies infectieuses et de médecine interne - Unité de chirurgie vasculaire, Centre Hospitalier, Cahors; marlem_hacoune@yahoo.fr
²Centre National de Référence (CNR) des corynebactéries du complexe diphthérie, Institut Pasteur, Paris, France

Introduction

L'agent principal de la forme respiratoire de la diphtérie (*C. diphtheriae*) est décrit pour la première fois par Klebs en 1883. Loeffler le cultive en 1884. Gaston Ramon produit l'anatoxine diphtérique en 1923.

La diphtérie à *C. diphtheriae* est strictement humaine (transmission essentiellement aérienne). La généralisation de la vaccination en France, effective depuis 1945, a permis de voir chuter le nombre de cas et de décès : aucun cas déclaré entre 1990 et 2001 et depuis une dizaine de cas à *C. diphtheriae* « tox + » ont été recensés, tous importés.

Au contraire depuis les années 2000, on voit une augmentation des cas autochtones à *C. ulcerans* par transmission zoonotique, particulièrement en France. Cette espèce est également capable de sécréter la toxine diphtérique.

Nous en présentons un cas rare de forme cutanée.

Discussion et Conclusion

La déclaration obligatoire des diphtéries aux corynebactéries du complexe diphthérie « tox+ » (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*) a été instaurée depuis 2003.

L'incidence de cas autochtones de diphtérie à *C. ulcerans* « tox + » est en augmentation en France (28 cas depuis 2002). Ces infections sont partagées entre les formes respiratoires & cutanées. Ces formes cutanées jouent un rôle épidémiologique important à la fois de réservoir et de vecteur de diffusion.

La pérennité de *C. ulcerans* « tox + » en France est probablement due au portage asymptomatique chez les animaux (ovins et chats++) et au vieillissement de la population. En effet, elles touchent essentiellement des personnes âgées en contact régulier avec des animaux de compagnie.

Dans le cas présent, l'identification par le Vitek 2 et la galerie API a permis de conclure à *C. ulcerans*. Cependant fréquemment ces deux méthodes conduisent à une identification erronée concernant les espèces *ulcerans* et *pseudotuberculosis*. L'introduction récente de la spectrométrie de masse dans la routine des laboratoires pourrait permettre une identification plus fréquente des corynebactéries du complexe diphthérie.

Bien que l'isolat soit porteur du gène *tox*, il ne produit pas la toxine diphtérique. Les causes de la non expression de la toxine sont en cours de caractérisation.

Cas clinique

Patient de 78 ans (vaccination inconnue), aux lourds antécédents cardiovasculaires, souffrant d'une artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Amputé du 4ème orteil gauche en 2012 et ce présente en avril 2014 (J0) avec une gangrène non réouvrable du 3ème orteil gauche.

J5 : Angioplastie jambière G triple axe et amputation 3ème orteil gauche.

J11 : Lésions fibrineuses du molignon des orteils avec écoulement malodorant → prélèvement bactériologique qui retrouve avec *E. faecalis*, *A. faecalis* et *C. freundii* :

- *Proteus mirabilis* sensible aux β-lactamines et aux aminosides.
- *Corynebacterium ulcerans* : résistant à la pénicilline G et la fosfomycine, sensible aux autres β-lactamines et aux aminosides.

J18 : Plo fébrile. Pipéraquine + tazo. Hémo cultures positives à *P. mirabilis*.

J17 : Amputation jambe gauche.

J18 : Céfotaxime + amikacine

J22 : Relais amoxicilline orale.

J38 : Amputation orteil gauche.

Les prélèvements ultérieurs (5 mois plus tard) du molignon de ulcère ne retrouvent pas de corynebactéries.

Enquête épidémiologique : ont été prélevés le fil (écouvillonnage de gorge), avec lequel séjournait le patient, et son chien (prélèvements oculaire et nasal). Les recherches de corynebactéries du complexe diphthérie par culture sur milieu spécifique (CNR) se sont avérées négatives.

Conduite à tenir devant une atteinte cutanée isolée due à *C. ulcerans* (H.A.S. 2011)

Mesures concernant le cas

- **Isolément** avec protection mécanique de la plaie jusqu'à ce que deux prélèvements à 24h d'intervalle au moins réalisés au décours de l'antibiothérapie soient négatifs. Prélèvement de contrôle à J30 dans tous les cas.
- **Antibiothérapie** : amoxicilline 14j (macrolides en cas d'allergie).
- **Sérum** à adresser au CNR : dosage des anticorps anti-toxine diphtérique avant toute sérothérapie et un mois après si aucune sérothérapie n'est pratiquée.
- **Sérothérapie** : sérum équins soumis à ATU
 - en urgence en cas de présence de signes toxiques.
 - dès confirmation souche « tox + ».
- Vaccination systématique à la phase de convalescence.
- **Signalement** immédiat à l'Agence Régionale de Santé.
- **Déclaration obligatoire** pour tout isolement d'une corynebactérie du complexe diphthérie « tox + ».

Mesures concernant les sujets contacts

- **Définition** : contacts proches et répétés avec le patient (famille vivant sous le même toit et professionnels de santé ayant effectué des soins locaux).
- **Recherche de corynebactéries « tox + »** dans des prélèvements pharyngés et cutanés (s'il y a une plaie).
- **Antibioprophylaxie** si les prélèvements sont positifs.
- **Si contact avec des animaux domestiques ou d'élevage** : prélèvements systématiques (oculaire, nasal et cutané le cas échéant).



C. ulcerans gélose Columbia sang de mouton / CO2 / 48h
CAMP-test reverse S. aureus / C. ulcerans

Bactériologie:

Corynebacterium ulcerans...

- Pousse sur milieux riches sous CO2 ou en anaérobiose :

- Gélose au sang simple ou ANC : colonies crémeuses de taille moyenne, avec un halo de β-hémolyse.
- Milieu tellurite « Tinsdale » : Colonies noires entourées d'un halo brun.

- **Baillie gram positif**, corynéforme, (palissade ou en lettres) non sporulé, immobile. Catalase positive, nitrate réductase positive.

- **Identification** :

- Automate Vitek 2® ANC : *C. ulcerans* (87% probabilité, excellente Id.)
- API Coryne® : *C. ulcerans* (Id. 88.7%, typicité = 1)
- CAMP-test reverse : positif.

- **Antibiogramme** : diffusion en milieu solide, comprimés Rosco®

- Pénicilline G, fosfomycine : résistant.
- Amoxicilline, kanamycine, gentamicine : sensible.

- **CNR** :

- **PCR en point final** :

- Gène ARN188 (espèce *C. ulcerans*) : positif.
- Gène de la toxine diphtérique « tox + » : positif.
- Production in vitro de la toxine diphtérique par le test Elek : négatif.

Références :

- Rapport annuel d'activité CNR Corynebactéries du Complexe diphthérie 2014
- Lantique MF et al., *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. J Clin Microbiol 2005; 43:996-1001.
- De Zoysa A, et al., Characterisation of indigenous corynebacterium ulcerans strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005; 43: 4377-81
- Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. Haut Conseil de la Santé Publique. 4 mars 2011

Infections bactériennes diverses P. 388
RICA1, 27-28 novembre 2014, Paris