

Rapport annuel d'activité

2017

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

Année d'exercice

2016



TABLE DES MATIERES

RESUME ANALYTIQUE	5
1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	6
2 ACTIVITES D'EXPERTISE	6
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES EN 2016.....	6
2.1.1 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES : METHODE, ETAT D'AVANCEMENT, PRINCIPAUX RESULTATS	7
2.1.2 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	7
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.2.1 NOMBRE D'ÉCHANTILLONS REÇUS ET ANALYSES EN 2016	7
3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	8
3.1 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	8
3.1.1 ISOLATS PORTEURS DU GENE <i>TOX</i> (<i>TOX+</i>)	8
3.1.2 ISOLATS NON PORTEURS DU GENE <i>TOX</i> (<i>TOX-</i>)	9
3.2 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX.....	11
3.3 PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE	13
3.4 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	13
4 ALERTE	13
5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	14
5.1 ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE, ACCUEIL DE STAGIAIRES	14
5.1.1 LISTER LES GUIDES ELABORES (CONTENU, MODES DE DIFFUSION) : PAS DE GUIDE ELABORE.	14
5.1.2 MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET PRODUCTION DU CNR	14
5.1.3 ACTIVITES DE CONSEIL AUX PROFESSIONNELS (ORGANISATION DU CNR POUR RECEPIONNER LES APPELS OU EMAILS, VOLUME D'ACTIVITES...).....	15
5.1.4 ACTIVITES D'EXPERTISES AUPRES DU MINISTERE CHARGE DE LA SANTE, DE SANTE PUBLIQUE FRANCE, DES AUTRES AGENCES DE SECURITE SANITAIRE, DE LA HAUTE AUTORITE EN SANTE OU DE STRUCTURES EUROPEENNES (ECDC, ...) OU INTERNATIONALE (OMS, ...) :	15
6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	15
6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS.....	15
SEQUENÇAGE GENOMIQUE (WGS, POUR WHOLE GENOME SEQUENCING) DES ISOLATS DE <i>CORYNEBACTERIUM</i> ET BIO-INFORMATIQUE	15
6.2 LES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES OU PREVUES EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR	16
6.2.1 PUBLICATIONS INTERNATIONALES :	16
6.2.2 COMMUNICATIONS NATIONALES (INVITEES).....	17

6.2.3 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (INVITEES)	17
--	----

7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D’HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX..... 17

7.1 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE ET D’HYGIENE ALIMENTAIRE DONT LES LNR	17
---	----

7.2 ÉCHANGES TECHNIQUES ENTRE LE CNR ET LE LNR ? (PRECISER ECHANGES DE SOUCHES, ECHANGES METHODOLOGIQUES...)	17
---	----

7.3 PROJETS PARTAGES (ETUDES, COMITE SCIENTIFIQUE, GROUPE DE TRAVAIL OU D’EXPERTS .. ?) OU LE CNR ET LE LNR APPORTENT ET ECHANGENT LEUR EXPERTISE	17
--	----

7.4 SI LES COLLABORATIONS ENTRE LE CNR ET LE LNR NE SONT PAS EFFECTIVES, PRECISER LES PERSPECTIVES ET/OU CONDITIONS DE RENFORCEMENT DES LIENS	17
--	----

ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 18

1.1 MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR	18
---	----

1.2 EQUIPE	18
-------------------------	----

<i>FIGURE 5. ORGANIGRAMME DU CNR EN 2016</i>	18
--	----

1.3 DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE	19
--	----

1.3.1 POLITIQUE QUALITE DU CNR	19
---	----

<i>FIGURE 7. LETTRE D’ENGAGEMENT DE L’UNITE PTMMH</i>	20
---	----

1.3.2 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE DE REFERENCE ET D’EXPERTISE MULTI-SITE (LREMS) : SYNTHESE 2016	21
---	----

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR 23

2.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE: DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE, EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTI-INFECTIEUX :	23
---	----

2.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES	23
---	----

2.3 COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUN-SERUMS DE REFERENCE :	24
---	----

2.4 LISTE DES TECHNIQUES (DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE, SENSIBILITE AUX ANTI- INFECTIEUX...) RECOMMANDEES PAR LE CNR	24
--	----

Liste des et acronymes

Acronyme	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
cgMLST	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
CMI	Concentration minimale inhibitrice
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
HCSP	Haut Comité de Santé Publique
InVS	Institut de Veille Sanitaire, devenu 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)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (ou quantitative)

Résumé analytique

La diphtérie fait partie des maladies à déclaration obligatoire. C'est une maladie infectieuse contagieuse, potentiellement mortelle, causée par les souches toxigènes des espèces bactériennes *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) et *C. ulcerans*. Le vaccin à base de toxine inactivée protège très efficacement contre la maladie. La couverture vaccinale élevée surtout chez les enfants (98%) a permis une élimination quasi-totale de la maladie en France. Cependant, les isolats continuent à circuler et il est crucial de maintenir une surveillance active de la diphtérie car (1) Des cas d'infection à *C. diphtheriae* importés de zones endémiques continuent à être rapportés ; (2) Des cas autochtones sont causés par *C. ulcerans*, souvent liés aux animaux de compagnie ; et (3) Des souches multi-résistantes aux anti-infectieux émergent. Comprendre la dynamique de circulation des souches entre les zones d'endémie et les zones à forte couverture vaccinale, et le rôle du portage animal, apporte des informations précieuses pour orienter les politiques de contrôle de la diphtérie.

En 2016, 6 cas d'infection, tous importés, due à *C. diphtheriae* porteur du gène *tox* dans son matériel génétique (*tox+*), ont été rapportés. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 49 fois, dont une fois chez un chien. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 2 cas cliniques et chez un chat. Enfin, *C. ulcerans tox-* a été isolé 6 fois.

Un tiers des isolats de *C. diphtheriae* analysés en 2016 sont résistants à la pénicilline. L'analyse temporelle de la résistance à cet antibiotique indique que ce niveau de résistance se maintient depuis plusieurs années.

Introduction

La diphtérie est une maladie infectieuse contagieuse, potentiellement mortelle et à prévention vaccinale, causée par les souches toxigènes des espèces bactériennes *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) et *C. ulcerans*. Cette dernière est un pathogène zoonotique qui peut être transmis à l'homme par certains animaux domestiques comme les chiens et les chats. Dans la mesure où certaines souches d'une troisième espèce de corynebactéries, *C. pseudotuberculosis*, peuvent également produire la toxine et causer des symptômes diphtériques, on regroupe cette espèce avec les deux agents majeurs de la diphtérie dans le « complexe *diphtheriae* », qui forme une branche à part dans la phylogénie des corynebactéries. La toxine diphtérique est responsable des symptômes de la diphtérie et est utilisée sous une forme modifiée comme vaccin. La toxine est portée par un phage qui peut infecter certaines souches de corynebactéries du complexe *diphtheriae* et s'intégrer dans leur chromosome, rendant les souches lysogénisées capables de produire la toxine. D'autres infections (bactériémies, endocardites, ...) peuvent être causées par des souches non toxigènes du complexe *diphtheriae*.

1 Missions et organisation du CNR

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

Les activités scientifiques et techniques du CNR sont appuyées par des activités de recherche qui sont menées en lien étroit avec les activités du CNR, au sein de l'unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur. Nos activités scientifiques portent principalement sur l'épidémiologie, le diagnostic, l'évolution et la pathogénicité des Corynebactéries du complexe *diphtheriae*.

Le CNR, attaché à l'unité PTMMH, a été placé sous la responsabilité de Nicole Guiso jusqu'en mars 2015, de Benoit Garin d'avril 2015 à avril 2016, et de Sylvain Brisse depuis le 2 mai 2016. Cette équipe assure seule les missions de CNR : il n'y a pas de laboratoire associé.

En 2016 le CNR a collaboré avec Dr Olivier Patey et Dr Sophie Dellion (Centre Hospitalier de Villeneuve Saint-Georges) pour les conseils cliniques demandés par nos correspondants.

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques en 2016

Nous avons mis au point le séquençage génomique pour les corynebactéries du complexe *diphtheriae* à la fin 2016. Pour ce faire, nous avons dû adapter la méthode d'extraction de l'ADN. En effet, la méthode que nous utilisions en routine pour extraire l'ADN ne permettait pas d'obtenir de l'ADN de bonne qualité et en quantités suffisantes pour réaliser le séquençage génomique des isolats. Actuellement, après la modification de la quantité de culture utilisée pour faire l'extraction ainsi que des modifications des températures, des temps d'incubation et des vitesses de centrifugation, nous avons réussi à obtenir des quantités d'ADN suffisantes et d'un bon niveau qualitatif. De ce fait, nous avons commencé à séquencer le génome des isolats de notre collection par technologie Illumina. Cela permettra d'analyser le gène *tox* et son contexte génomique, identifier

des gènes marqueurs d'espèce, les gènes pour le typage moléculaire multilocus sequence typing (MLST) ainsi que les gènes de résistance.

2.1.1 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats

En 2016 nous n'avons pas évalué de techniques, ni de réactifs ou de trousse.

2.1.2 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2016,

- nous avons accueilli pendant 15 jours Jibir Zanguina (CERMES, Niamey, Niger) afin de transférer les techniques d'identification des Corynebactéries et de détection de la toxine dans son Institut.
- le CNR a transmis ses protocoles pour la détection du gène *tox* et l'identification moléculaire des corynebactéries du complexe *diphtheriae* au Laboratoire du Pôle de Biologie-Santé site Félix Guyon du CHU de la Réunion, qui en a fait la demande.

2.2 Activités d'expertise

Les prélèvements biologiques (expectorations, prélèvements nasaux, sérums, prélèvements cutanés, pus, membranes) ainsi que les isolats que nous avons reçus en 2016 provenaient essentiellement des microbiologistes hospitaliers de France métropolitaine, ou de Mayotte, La Réunion et de Nouvelle-Calédonie.

2.2.1 Nombre d'échantillons reçus et analysés en 2016

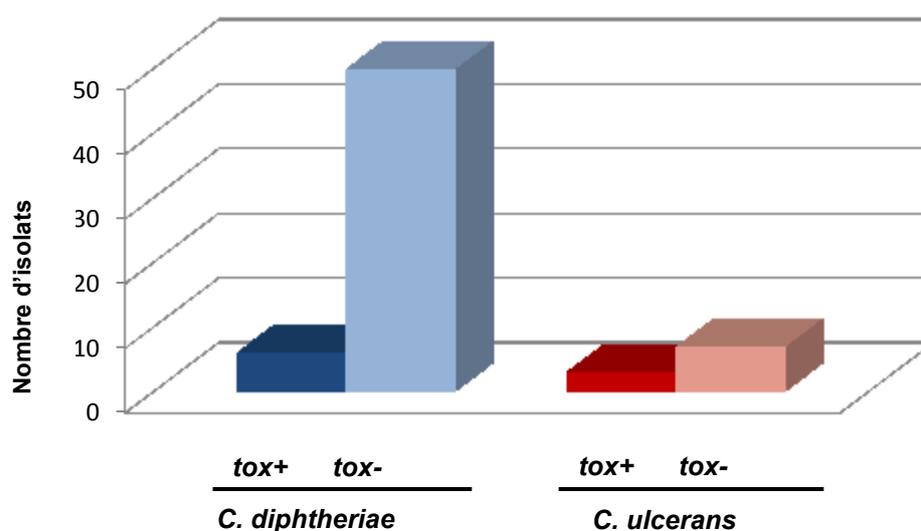
Pendant l'année 2016, nous avons reçu 93 échantillons à analyser. Ces échantillons incluaient :

- des souches déjà isolées dont nous avons vérifié la pureté et l'identification, et pour lesquelles nous avons recherché le gène *tox* ;
- des prélèvements (tissus ou écouvillons) que nous avons mis en culture et/ou sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée ;
- des sérums pour déterminer le taux d'anticorps antitoxine diphtérique.

Parmi les 93 échantillons reçus, 24 étaient négatifs, aucune bactérie appartenant au complexe *diphtheriae* n'ayant pu être isolée à partir de ces prélèvements. Une partie de ces prélèvements (4/24 ; soit 16%) correspondait à des identifications erronées réalisées par les laboratoires de biologie médicale et hospitaliers. Dix prélèvements (42%) correspondaient à des échantillons qui nous ont été adressés au CNR en raison de symptômes cliniques suggestifs d'une angine diphtérique. Deux échantillons négatifs (2/24 ; soit 12%) correspondaient à des échantillons qui nous ont été envoyés par erreur. Le reste des échantillons négatifs (8/24 ; soit 33%) correspondait à des échantillons prélevés lors d'une enquête épidémiologique autour d'un cas pour lequel un isolat *tox+* avait été isolé.

Pour les 69 échantillons restants, 4 étaient des sérums et 65 échantillons à partir desquels nous avons pu isoler ou confirmer la présence des corynebactéries appartenant au complexe *diphtheriae* (**Figure 1**). Ces 65 échantillons comprenaient 6 *C. diphtheriae* et 3 *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* (*tox+*), ainsi que 49 *C. diphtheriae* et 7 *C. ulcerans* qui ne portaient pas le gène *tox* dans leur génome (*tox-*).

Figure 1 : Nombre d'isolats cliniques de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* analysés par le CNR en 2016



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

Parmi les 65 échantillons appartenant au complexe diphtheriae que nous avons analysés en 2016, 63 correspondaient à des isolats, qui ont tous été testés pour leur sensibilité aux anti-infectieux. Les résultats sont donnés dans le point 3.2.

Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

En 2016 nous avons envoyé 6 souches, 5 ADN et 12 amorces à Jibir Zanguina (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire, Niamey, Niger) afin qu'il puisse mettre en place dans son institut les techniques d'identification des Corynebactéries du complexe diphtheriae et de détection de la toxine diphtérique, qu'il avait apprises au CNR.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Il n'y a pas de réseau de partenaires constitué pour la diphtérie ; la maladie étant à déclaration obligatoire et les isolats faciles à cultiver, tous les laboratoires d'analyse de biologie médicale ou de microbiologie sont susceptibles de nous envoyer des isolats. En 2016, 56 correspondants nous ont envoyé des échantillons à analyser. Cinquante-deux correspondants sont en France Métropolitaine et 4 en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants reste stable par rapport à 2015.

Tous les isolats appartenant au complexe diphtheriae ou prélèvements de cas suspects ayant des symptômes évocateurs de diphtérie sont envoyés au CNR pour recherche du gène *tox* et confirmation de l'identification.

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

En 2016, nous avons reçu ou isolé 9 isolats porteurs du gène *tox* : 6 *C. diphtheriae* et 3 *C. ulcerans*. Concernant les isolats *C. diphtheriae*, 5 appartiennent au biovar mitis et 1 au biovar gravis.

Les caractéristiques des isolats *tox+* sont détaillées dans le Tableau 4 en annexe. Un résumé est donné ci-dessous.

Caractéristiques démographiques et cliniques :

Isolats *C. diphtheriae tox+* : Cinq isolats ont été isolés à partir de prélèvements cutanés et 1 à partir d'un prélèvement respiratoire. L'âge des 6 patients varie de 1 à 64 ans ; 50% des patients sont des hommes, et 50% des femmes. Parmi les 6 isolats, 3 sont producteurs de la toxine diphtérique (test ELEK), et donc trois ne produisent pas la toxine *in-vitro* malgré le portage du gène dans leur matériel génétique.

Isolats *C. ulcerans tox+* : Parmi les 3 isolats *C. ulcerans tox+*, 1 a été isolé chez un chat, au niveau d'une plaie, et ne produit pas la toxine. Les deux autres ont été isolés chez des patientes âgées de 63 et 83 ans, en contact avec des animaux de compagnie. Une des patientes avait une infection respiratoire, l'autre une infection cutanée. Ces deux isolats sont producteurs de la toxine.

Sensibilité aux antibiotiques :

Quatre des 6 isolats *C. diphtheriae tox+* sont multi-résistants aux antibiotiques et 1 *C. ulcerans tox+* est résistant à la clindamycine (voir partie 3.2).

Typage épidémiologique :

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

- L'isolat FRC0385, isolé à la Réunion, appartient au ST91. Ce ST a déjà été trouvé sur d'autres isolats à Madagascar et à Mayotte en 2007. L'isolat FRC0421, isolé chez un patient qui rentrait des Comores, appartient au ST109. Ce ST a déjà été trouvé en France en 2004 dans un isolat isolé chez un patient qui rentrait de Madagascar.
- L'isolat FRC0424, obtenu chez un patient d'origine afghane, appartient au ST308. Ce ST a été trouvé aussi en Allemagne chez un individu Sri-Lankais.
- Les isolats FRC0430 et FRC0436 ont été isolés chez des patientes d'origine sénégalaise. Le ST des deux isolats est ST217. Ce ST avait été trouvé en France en 2002 dans un isolat obtenu à partir d'un prélèvement réalisé chez une patiente d'origine chinoise qui venait d'immigrer clandestinement en France.
- L'isolat FRC0458, obtenu chez un patient qui venait d'arriver en France en provenance de la Nouvelle Guinée. Le ST de cet isolat est un ST nouveau n'ayant pas été décrit auparavant.

Ces résultats vont dans le sens de la notion de cas importés, et indiquent la persistance de génotypes particuliers de *C. diphtheriae* dans certaines régions géographiques.

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

- Le ST de l'isolat obtenu chez le chat est ST325. Ce ST a été rapporté pour des isolats infectant majoritairement des chats et des chiens en Allemagne, en Belgique et en France. En France, ces isolats circulent au moins depuis 2004.
- Les deux autres isolats *C. ulcerans tox+* ont le même ST, ST331 et ont été isolés dans deux régions différentes en France métropolitaine. Ce ST a été aussi trouvé dans des isolats *C. ulcerans* circulant en Allemagne et en Belgique.

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

En 2016, le CNR a reçu ou isolé 55 isolats *tox-* : 49 *C. diphtheriae* et 6 *C. ulcerans*. En ce qui concerne les isolats *C. diphtheriae*, 14 appartiennent au biovar *gravis*, 12 au biovar *belfanti* et 20 au biovar *mitis*.

Les caractéristiques des isolats *tox-* sont résumées dans le Tableau 5 en annexe. Un résumé est donné ci-dessous.

Caractéristiques démographiques et cliniques :

C. diphtheriae tox- : Parmi les 48 isolats *C. diphtheriae tox-*, 36 ont été isolés chez des individus vivant en France métropolitaine (75%) et 12 en France d'Outre-Mer (25%). Le pourcentage de patients de sexe masculin est de 66% et celui de sexe féminin est de 34%. L'âge des patients de métropole variait de 0 à 74 ans, et de 0 à 78 ans pour les patients de France d'Outre-Mer. Les isolats de *C. diphtheriae tox-* ont été collectés majoritairement à partir de prélèvements cutanés (65%) suivi des prélèvements réalisés au niveau du tractus respiratoire supérieur (24%). Les 11% restant ont été collectés à partir d'autres sites.

C. ulcerans tox- : Sept patients étaient infectés par des isolats *C. ulcerans tox-* en 2016. Six patients vivaient en France métropolitaine et un à La Réunion. La moyenne d'âge des patients était de 70 ans (48 à 81 ans). Six isolats *C. ulcerans tox-* ont été collectés à partir de prélèvements cutanés et 1 a été obtenu à partir d'un prélèvement chirurgical suite à une ovariectomie.

Sensibilité aux antibiotiques :

14 des *C. diphtheriae tox-* et 1 *C. ulcerans tox-* sont multi-résistants aux antibiotiques (voir partie 3.2).

Typage épidémiologique :

C. diphtheriae tox- : Le typage épidémiologique a pu être réalisé pour 47 des 49 des isolats *tox-* analyses. Nous avons trouvé 39 ST différents dont 22 qui n'avaient pas été décrits auparavant. Ce résultat confirme la grande diversité des isolats *tox-* observée les années précédentes.

C. ulcerans tox- : Nous avons trouvé 4 ST différents parmi les 6 isolats analysés. L'isolat en provenance de la Réunion a un ST qui a déjà été retrouvé dans des isolats circulant en France Métropolitaine. Parmi les trois autres ST, 1 est nouveau et les deux autres ont déjà été trouvés en France Métropolitaine, mais, à ce jour, pas ailleurs dans le monde.

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

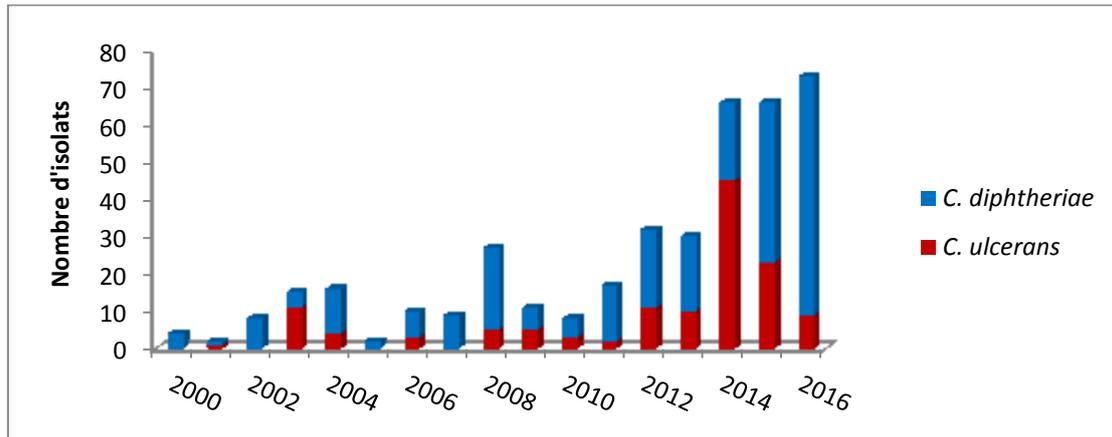
Parmi les 49 isolats *C. diphtheriae tox-* reçus au CNR en 2016, 46 ont pu être cultivés et leur biotype déterminé. Quatorze isolats *tox-* appartiennent au biovar *gravis* (30%), 12 au biovar *belfanti* (26%) et 20 au biovar *mitis* (44%).

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 totalement absent en France d'Outre-Mer.

Tendance temporelle :

La Figure 2 montre une augmentation régulière des isolats reçus au CNR depuis 2000. Cette augmentation a été plus marquée en 2014, possiblement liée en partie à la généralisation de l'identification par la méthode MALDI-TOF. En ce qui concerne les isolats *C. diphtheriae*, ils ont continué à augmenter en 2016. Inversement, nous constatons une diminution du nombre d'isolats de *C. ulcerans* cette année, qui prolonge celle déjà observée en 2015.

Figure 2. Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2000 et 2016



3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* sont testés systématiquement. Nous déterminons leur sensibilité à un panel de 22 antibiotiques par la méthode de diffusion de disques en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité est mise en évidence par la méthode de disques, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode E-test.

Nous utilisons les seuils de sensibilité des Corynebactéries publiés en 2016 par le CA-SFM. Ces seuils sont indiqués sur le tableau 1.

Tableau 1 : Seuils critiques de sensibilité pour les Corynebactéries

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

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

Source : CA-SFM 2016

Résultats

Les pourcentages d'isolats résistants à chaque antibiotique sont donnés par catégorie d'isolat sur la Figure 3. Ces résultats montrent :

Isolats porteurs du gène *tox* :

C. diphtheriae tox+ : 33% des isolats sont résistants à la pénicilline, 33% aux sulfamides, 17% à la tétracycline, 67% au triméthoprime, 33% au cotrimoxazole, 17% à la rifampicine et 17% à l'oxacilline. Quatre isolats sont multi-résistants : 1 isolat est résistant à trois antibiotiques, 2 isolats sont résistants à 4 antibiotiques et 1 isolat est résistant à 5 antibiotiques.

C. ulcerans tox+ : 1 isolat est résistant à la clindamycine

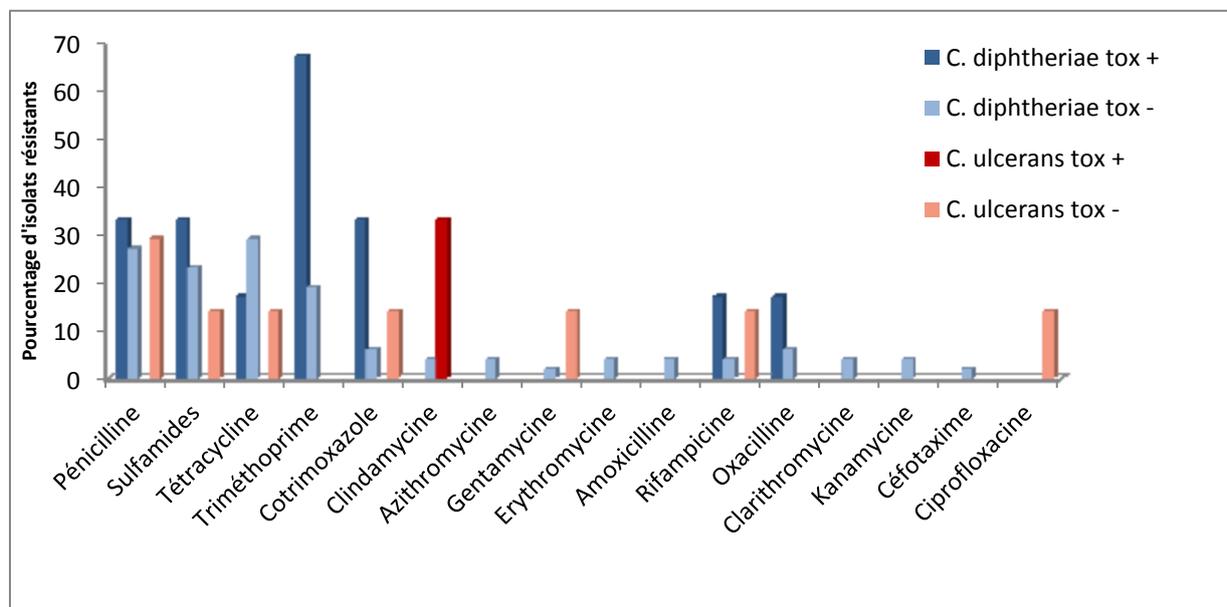
Isolats non porteurs du gène *tox* :

C. diphtheriae tox- : 27% des isolats sont résistants ou ont une sensibilité diminuée à la pénicilline, 23% aux sulfamides, 29% à la tétracycline, 19% triméthoprime, 6% au cotrimoxazole, 4% à la clindamycine, 4% à la azithromycine, 2% à la gentamycine, 4% à l'érythromycine, 4% à l'amoxicilline, 4% à la rifampicine, 6% à l'oxacilline, 4% à la clarithromycine, 4% à la kanamycine, 2% au céfotaxime.

Sept isolats sont multi-résistants : 3 isolats sont résistants à deux antibiotiques et 4 isolats sont résistants à 4 antibiotiques.

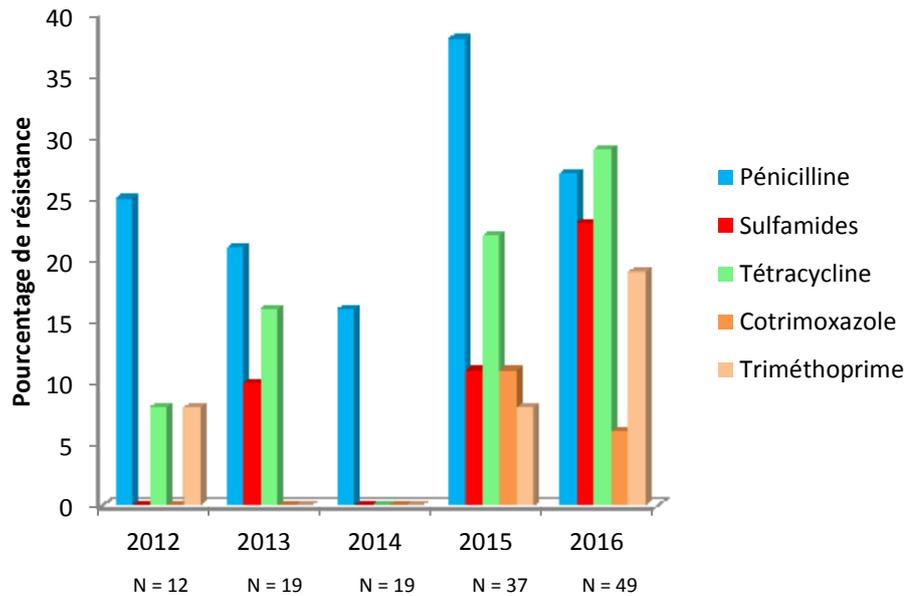
C. ulcerans tox- : 33% des isolats sont résistants à la pénicilline, 17% aux sulfamides, 17% à la tétracycline, 17% au cotrimoxazole, 17% à la gentamycine, 17% à la rifampicine, 17% à ciprofloxacine.

Figure 3. Résistance aux anti-infectieux des isolats analysés au CNR en 2016



Ces résultats, même s'ils sont basés sur un petit nombre de souches (pour les *tox+*), montrent un taux important de résistance à la pénicilline, antibiotique utilisé en première intention en cas de diphtérie dans de nombreux pays. Il sera nécessaire de surveiller l'évolution de la résistance à l'amoxicilline, utilisée en France. Le taux de résistance aux macrolides, recommandé en cas d'allergie aux pénicillines, reste faible.

Figure 4. Analyse temporelle de la résistance aux anti-infectieux pour la période 2012-2016



L'analyse temporelle suggère une fluctuation du niveau de résistance à la pénicilline autour de 20% des isolats et une augmentation de la résistance à la tétracycline (Figure 4).

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

National : Comme indiqué dans le point 4, nous informons Santé Publique France en temps réel pour chaque détection d'un isolat porteur du gène *tox*. Des analyses des isolats circulant en France métropolitaine ainsi que en France d'Outre-Mer sont faits ponctuellement. Une publication conjointe concernant l'épidémiologie de la diphtérie à Mayotte est en préparation.

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

Le CNR a participé à une enquête européenne (organisée par le centre OMS sur demande de l'ECDC) pour inventorier les techniques utilisées et les besoins des laboratoires de référence européens de la diphtérie.

Les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données de référence des génotypes MLST de *C. diphtheriae* (<http://pubmlst.org>) qui permet la comparaison internationale des souches.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2016 nous avons contribué au montage d'un projet en collaboration avec Santé Publique France et des collègues vétérinaires visant à mieux définir la prévalence et les facteurs de risque de portage de *C. ulcerans* chez les chiens et les chats. Une partie du financement a été obtenue, mais nous sommes en discussion pour trouver le reste du financement nécessaire pour démarrer l'étude.

Le CNR a participé à une étude rétrospective, coordonnée par SPF, sur la situation de la diphtérie à Mayotte.

4 Alerte

Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP :

Site : http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcsp20110304_conduitediphtherie.pdf.

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

En 2016, 8 alertes pour des isolats obtenus à partir de prélèvements humains, ainsi que un signalement d'un isolat porteur du gène *tox* obtenu à partir d'un prélèvement vétérinaire, ont été faites.

Nous avons détecté avec le CHU de Dijon, une suspicion de transmission croisée entre 4 patients atteints de mucoviscidose, infectés par *C. diphtheriae* biovar belfanti. Nous avons fait le génotypage des isolats par MLST et avons trouvé que les isolats ont le même ST, ST208. Des analyses plus approfondies au niveau du génome complet des isolats sont en cours pour déterminer s'ils sont vraiment identiques car la technique de MLST n'est pas suffisante pour pouvoir conclure.

Nous avons également analysé avec le Laboratoire de Bactériologie du centre de Biologie et Pathologie Est à BRON (Hospices Civils de Lyon), des contacts autour d'un cas de *C. diphtheriae* porteur du gène *tox*. Deux frères d'une patiente infectée par un isolat *tox+* présentaient des lésions cutanées à partir desquelles des isolats *C. diphtheriae* ont été isolés. Cependant la recherche du gène *tox* s'est avérée négative pour les deux frères et l'analyse génomique a confirmé que leurs isolats sont très différents de celui de leur sœur (ST411 et ST217, respectivement).

5 Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

Pas d'enseignements durant cette période de transition.

Une stagiaire de Mastère 2 IMVI/Paris 6, Marina Barros, a commencé son stage début décembre 2016 sur le sujet de la génomique de *C. diphtheriae* sous la responsabilité scientifique de S. Brisse.

5.1.1 Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion) : Pas de guide élaboré.

5.1.2 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

(i) Rétro-information aux partenaires

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

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

Les autres données (confirmation d'identification, antibiogramme, biovar) sont envoyées quelques jours après, et toujours < 10 jours après réception de l'échantillon.

(ii) Diffusion aux professionnels : conférences, site internet (adresse du site, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport d'activité mis en ligne)

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

En 2016, le site web du CNR a été réorganisé pour gagner en clarté et ergonomie.

5.1.3 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Le CNR peut être joint par téléphone, aux heures ouvrables, au poste du responsable, de l'adjoint et du secrétariat. Le CNR peut également être joint par courriel et par portable en cas d'urgence. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR.

Pendant l'année 2016, nous avons reçu 31 appels de la part des médecins biologistes, infectiologues, dermatologues qui voulaient des renseignements divers sur la diphtérie et/ou pour l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié à cette activité.

5.1.4 Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de Santé publique France, des autres agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structures européennes (ECDC, ...) ou internationale (OMS, ...) :

En 2016 nous n'avons pas participé à ce type d'expertises.

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

6.1 Activités de recherche en cours

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

Devant les progrès technologiques du séquençage, qui font baisser les délais d'analyse et les coûts, il est crucial de mettre en place et d'évaluer les applications du WGS pour la caractérisation des souches et la surveillance épidémiologique. Le typage des souches de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* a jusqu'à présent été réalisé systématiquement par la technique MLST, basée sur le séquençage de 7 gènes. Cependant, cette approche n'est pas assez discriminante pour étudier la transmission ou même l'évolution fine des populations. Par ailleurs, la méthode MLST ne fournit pas d'information sur les gènes d'intérêt pour le diagnostic (toxine, biotypes) et la résistance aux antibiotiques. Notre objectif prioritaire en termes de développements de nouvelles approches est de tirer profit du séquençage génomique pour ces divers champs d'application : identification et phylogénie, typage, analyse des gènes de virulence et de la toxine, et gènes de résistance. Ces différents objectifs requièrent des développements de stratégies d'analyse spécifiques qui ont démarré en 2016, dans la ligne de précédents travaux (sur d'autres pathogènes) du nouveau responsable du CNR (Bialek-Davenet et al Emerg. Inf. Dis. 2014 ; Maury et al Nat Genetics 2016 ; Moura et al Nat Microbiol 2017 ; Perrin et al Nat Comm. 2017).

Caractérisation des isolats résistant aux antibiotiques

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons souvent des profils de multirésistance. Un de nos projets prioritaires est de réaliser un profilage génomique des gènes de résistance putatifs des isolats, et de déterminer les gènes associés aux phénotypes de résistance, ainsi que leur contexte génomique. Cela permettra de définir le degré d'association entre génotype et phénotype pour différentes classes d'antibiotiques et de définir dans quels cas le phénotype pourra être 'prédit' avec confiance à partir de la séquence génomique, et de caractériser les éléments génétiques mobiles qui portent les gènes de résistance.

Ce projet pourra être poursuivi par des projets plus fondamentaux pour identifier d'éventuels nouveaux mécanismes de résistance et caractériser leur transfert horizontal entre souches ou espèces. Pour ces projets, nous chercherons des collaborations, par exemple avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.

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

6.2.1 Publications internationales :

1. Thouvenin M, Beilouny B, Badell E, Guiso N. *Corynebacterium ulcerans* pulmonary infection. **Ann Biol Clin** (Paris). 2016 Jan-Feb;74(1):117-20. doi: 10.1684/abc.2015.1120. French.
2. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Carneiro AR, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strain 04-7514, Isolated from a Dog in France. **Genome Announc**. 2016 Mar 31;4(2). pii: e00172-16. doi: 10.1128/genomeA.00172-16.
3. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Carneiro AR, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium ulcerans* Strain 04-3911, Isolated from Humans. **Genome Announc**. 2016 Mar 31;4(2). pii: e00171-16. doi: 10.1128/genomeA.00171-16.
4. Guimarães LC, Lopes T, Ramos RT, Carneiro AR, Cavalcante AL, Barreto D, de Sá PC, Veras AA, Rocha FS, Bagano P, Pereira FL, Dorella FA, Leal CA, Carvalho AF, Bizet C, Guiso N, Badell E, Figueiredo HC, Azevedo V, Silva A. Draft Genome Sequences of Two Pathogenic *Corynebacterium* Species Isolated from Cows. **J Genomics**. 2016 Mar 2;4:7-9. doi: 10.7150/jgen.14456. eCollection 2016.
5. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strain 03-8664 Isolated from a Human Throat. **Genome Announc**. 2016 Jul 28;4(4). pii: e00719-16. doi: 10.1128/genomeA.00719-16.
6. Benamrouche N, Hasnaoui S, Badell E, Guettou B, Lazri M, Guiso N, Rahal K. Microbiological and molecular characterization of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Algeria between 1992 and 2015. **Clin Microbiol Infect**. 2016 Aug 29. pii: S1198-743X(16)30333-0. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.013.

Les publications suivantes ont été réalisées par S. Brisse et sont pertinentes par rapport au projet du CNR :

7. Bialek-Davenet, S., A. Criscuolo, F. Ailloud, V. Passet, L. Jones, A. S. Delannoy-Vieillard, B. Garin, S. Le Hello, G. Arlet, M. H. Nicolas-Chanoine, D. Decre and S. Brisse (2014). "Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups." **Emerg Infect Dis** 20(11): 1812-1820.
8. Maury, M. M., Y. H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. Rocha, S. Brisse* and M. Lecuit* (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." **Nature Genetics** 48(3): 308-313.
9. Moura, A., A. Criscuolo, H. Pouseele, M. M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, J. T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larssonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit and S. Brisse (2016). "Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*." **Nature Microbiology** 2: 16185.
10. Amandine Perrin*, Elise Larssonneur*, Ainsley C. Nicholson*, David J. Edwards, Kristin M. Gundlach, Anne M. Whitney, Christopher A. Gulvik, Melissa E. Bell, Olaya Rendueles, Jean Cury, Dominique Clermont, Vincent Enouf, Vladimir Loparev, Phalasy Juieng, Timothy Monson, David Warshauer, Lina I Elbadawi, Maroya Spalding Walters, Matthew B Crist, Judith Noble-Wang, Gwen Borlaug, Eduardo P.C. Rocha, Alexis Criscuolo, Marie Touchon, Jeffrey P. Davis, Kathryn E. Holt, John R. McQuiston* and Sylvain Brisse* Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* Wisconsin outbreak strain. **Nat Communications**, in press

6.2.2 Communications nationales (invitées)

S. Brisse a été invité aux journées 'CNR-LNR' organisées par l'Institut de Veille Sanitaire (31 mars 2016, Maisons-Alfort) pour y parler de « CNR et LNR au temps du NGS : enjeux et perspectives pour la référence et la santé publique ».

S. Brisse a été invité aux journées 'CNR-LNR' organisées par l'Institut de Veille Sanitaire (27 novembre 2015, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) pour y parler de « Séquençage génomique des pathogènes bactériens: structure génétique des espèces et surveillance épidémiologique ».

6.2.3 Communications internationales (invitées)

S. Brisse a été invité à Stockholm le 21 juin 2016 par the European CDC, en tant qu'expert pour discuter de la mise en place de typage génomique dans la surveillance des maladies infectieuses à l'échelle européenne.

S. Brisse a été invité au congrès IMMEX-XI à Estoril, Portugal (12-14 mars 2016), afin de présenter le projet de génotypage génomique de *Listeria monocytogenes* effectué en collaboration avec le CNR Listeria.

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

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

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

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

Non applicable.

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

Non applicable.

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

Non applicable.

Annexe 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

1.1 MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR

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

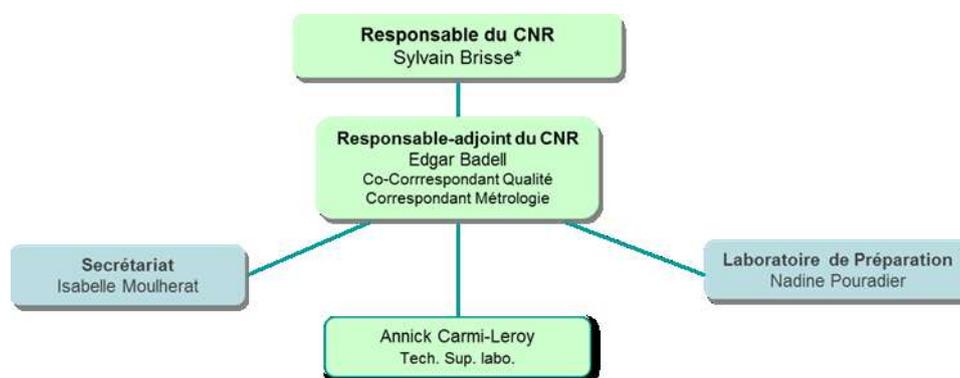
1.2 EQUIPE

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur la Figure et le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Liste du personnel dévolu au CNR

Nom Prénom	Position	Part ETP	Co-financement
Garin Benoit (jusqu'en avril 2016) Brisse Sylvain (depuis mai 2016)	Responsable du CNR et chef d'Unité	0.10	Institut Pasteur
Badell Edgar	Responsable adjoint du CNR	0.50	Institut Pasteur
Carmi-Leroy Annick	Technicienne sup. de laboratoire	0.50	Institut Pasteur
Moulherat Isabelle	Assistante	0.25	Institut Pasteur
Pouradier Nadine	Technicienne de laboratoire	0.10	Institut Pasteur

Figure 5. Organigramme du CNR en 2016



* Benoit Garin jusqu'à avril 2016 puis Sylvain Brisse

Liste des principaux équipements de l'unité :

- Une Station Eau pure (France Eau)
- 2 Autoclaves
- 5 postes de sécurité microbiologique
- 4 étuves
- 1 microscope à fluorescence
- 3 congélateurs à -80°C et plusieurs à -20°C
- 2 incubateurs à agitation orbitale
- 1 appareil à champ pulsé pour l'ECP
- 1 chaîne ELISA
- 5 appareils PCR
- 1 thermocycleur en temps réel LC480
- 5 centrifugeuses
- 1 compteur à radioactivité
- 2 balances de précision
- 2 Spectrophotomètres pour acides nucléiques (1 Qubit / 1 Nanodrop)
- 1 Spectrophotomètre pour les cultures bactériennes

De plus, nous bénéficions des équipements de la plateforme mutualisée P2M pour l'extraction (robot extracteur MagnaPure, de Roche) et pour le séquençage Illumina des acides nucléiques (séquenceur NextSeq-500, Illumina).

1.3 DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE

1.3.1 Politique qualité du CNR

L'unité PTMMH ainsi que le CNR sont très impliqués dans la démarche qualité. En mai 2016, le COFRAC a renouvelé l'accréditation du CNR pour le diagnostic par PCR en point final de la toxine. En cohérence avec la politique qualité du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur (voir 1.4.2), la lettre d'engagement de l'unité qui inclut le CNR est présentée dans la Figure 7.

Figure 7. Lettre d'engagement de l'unité PTMMH

SUPPORT D'ENREGISTREMENT	VERSION
POLITIQUE QUALITÉ DE L'UNITÉ PTMMH	B

La politique qualité de l'Unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » (PTMMH), qui inclut le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses, et le CNR des corynebactéries du complexe diphtérique, est de répondre toujours mieux :

- ◆ à ses missions de Centres nationaux de Référence;
- ◆ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Médecins cliniciens, Biologistes, Industriels, Partenaires scientifiques;
- ◆ Aux exigences de qualité de ses résultats de recherche scientifique.

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 que nous poursuivons pour 2016 :

1. Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques, nous incitent à assurer le **maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité**. Pour ce faire :

- ◆ Chaque technique de chaque CNR doit être partagée par au moins deux personnes. Un transfert de savoir-faire sera organisé notamment par le biais de formations par le personnel déjà habilité et par l'encadrement. Le succès du transfert sera sanctionné par une habilitation.
- ◆ Les contrôles du maintien des compétences seront réalisés régulièrement.

2. 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 les systèmes informatiques LAGON.

3. Les techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la **planification des expériences via l'élaboration de protocoles d'expériences** décrivant les objectifs, les moyens et les techniques à mettre en œuvre pour les atteindre.

4. Dans le cadre de la politique qualité des CNRs, garants de l'expertise des techniques de diagnostic, l'unité s'était fixée comme objectif en 2015, le maintien de l'accréditation ISO 15189 obtenue en novembre 2013 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 le COFRAC a décidé (numéro N° S-2588 rév.7) en novembre 2015 de maintenir l'accréditation des techniques mentionnées.

5. Les objectifs du LREM8 pour la suite sont l'accréditation ISO 15189 partielle vers la fin 2017, et complète avant le 1er novembre 2020 conformément à l'article 8 de la loi n° 2013-442 du 2 mai 2013.

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

- ◆ à fournir à l'ensemble du personnel de l'Unité les moyens nécessaires à la mise en œuvre de cette politique qualité
- ◆ 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.

Sylvain Brisse,
Directeur du CNR de la coqueluche et autres bordetelloses
Directeur du CNR des corynebactéries du complexe diphtérique
Responsable par intérim de l'Unité PTMMH

Actualisation le 15 septembre 2016



1.3.2 Démarche qualité du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2016

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le Guide de Bonne Exécution des Analyse en Biologie Médicale (GBEA) et, depuis 2008, dans le cadre des inspections de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur :

Ce projet s'inscrit dans l'objectif de répondre à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Les Centres Nationaux de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur et la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) sont organisés en Multisite et constituent le LREMS.

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

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

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

Actions d'importance 2016 conduites auprès des CNR de l'Institut Pasteur à Paris et Lyon:

Janvier à Mars 2016 : réalisation des revues qualité des CNR.

1^{er} Avril 2016 : demande d'extension d'accréditation pour les CNR des Papillomavirus, E. Coli, Salmonelles, Shigelles et Vibrions Cholera (en attente de la notification de réception du dossier).

Mai 2016 : notification par le COFRAC du renouvellement de l'accréditation du LREMS (CIBU, CNR Anaérobies, CNR de la Coqueluche et autres bordetelloses, CNR des Corynébactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR des Hantavirus, CNR des Fièvres Hémorragiques Virales, CNR des Virus *Influenzae*, CNR de la Leptospirose, CNR des Listeria, CNR des Méningocoques, CNR des Mycoses invasives et antifongiques, CNR de la Peste et autres yersiniose, CNR de la Rage) .

L'attestation d'accréditation est disponible à l'adresse :

<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>

23 Mai 2016 : revue de direction du LREMS.

Juin-Juillet 2016 et septembre-octobre 2016 : audits internes technique et qualité.

4^{ème} trimestre 2016 : article dans la revue Compétences du COFRAC concernant l'accréditation des CNR de l'Institut Pasteur avec un focus sur le CNR des Fièvres Hémorragiques Virales.

Octobre 2016 : report de l'audit de surveillance COFRAC en Janvier 2017.

Perspectives 2017 :

Janvier à Mars 2017 : réalisation des revues qualité des CNR.

16 au 20 janvier 2017 : **audit de surveillance COFRAC** ; les conclusions de l'audit de surveillance de Janvier 2017 ont été positives, le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LREMS.

Avant le 22 mai 2017 : revue de direction du LREMS.

Juin-Juillet 2017 et septembre-octobre 2017 : audits internes technique et qualité.

Septembre 2017 : organisation de groupes de travail technique pour les prochains projets de validation de méthodes et finalisation des dossiers de validation de méthode pour une demande d'extension prochaine.

Courant 2017 : ajout de nouvelles méthodes dans le périmètre d'accréditation, pour les CNR ayant déjà des techniques accréditées sous la même portée d'accréditation.

Fin 2017-début 2018 : audit de surveillance et/ou d'extension du LREMS.

Annexe 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

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

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

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

En parallèle nous réalisons le **typage moléculaire des isolats** par la technique multilocus sequence typing (MLST).

La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* est réalisée à l'aide de disques sur milieu gélosé Muller 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 2016 de la Société Française de Microbiologie.

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Les marqueurs épidémiologiques disponibles sont les 7 gènes de ménage de la technique MLST indiqués dans le Tableau 3. Une nomenclature internationale standardisée des génotypes est maintenue par le CNR via le site MLST <http://pubmlst.org>

Tableau 3 : Gènes utilisés pour déterminer le ST des isolats de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans*.

Gène	Fonction
<i>atpA</i>	ATP synthase alpha chain
<i>dnaE</i>	DNA polymerase III alpha subunit
<i>dnaK</i>	Chaperone protein
<i>fusA</i>	Elongation factor G
<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase
<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 components
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain

Nous développons actuellement la méthode core genome MLST (cgMLST, avec un peu plus de 1300 gènes) pour affiner l'analyse génomique des isolats.

2.3 COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUN-SERUMS DE REFERENCE :

- Description

Notre collection regroupe plus de 400 isolats reçus au CNR entre 2000 et 2016, et 125 souches de référence. L'ensemble de ces isolats a été caractérisé pour le biotype, la présence du gène *tox* et l'expression de la toxine diphtérique (pour les isolats porteurs du gène *tox*). De plus, la majorité des isolats a été typée par MLST.

Toutes les données de provenance des isolats sont stockées dans l'application informatique Lagon (Epiconcept).

- Conditions de stockage

Tous les isolats reçus au laboratoire et ceux de la collection sont conservés en double dans deux congélateurs à -80°C différents, chacun branché sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel Oceansoft. Les souches de référence sont aussi conservées au sein de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP).

- Conditions de mise à disposition des collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigé pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant le statut industriel ou académique du partenaire et la nature de l'accord, cette mise à disposition donne éventuellement lieu à une contrepartie financière.

2.4 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR

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