

Rapport annuel d'activité

2021

**Centre de national de référence
Brucella**

**Années d'exercice
2019
et
2020**

Résumé analytique

Le CNR a traité 56 prélèvements ou souches bactériennes pour identification de *Brucella* et 419 sérums en 2019. Sur cette année-là, 41 cas de brucellose ont été déclarés, tous en France métropolitaine; 31 souches appartenant au genre *Brucella* ont été définitivement identifiées au CNR, 6 cas par PCR et 4 cas par sérologie. La PCR multiplexe « Bruce Ladder » a montré que toutes les souches identifiées appartenaient à l'espèce *B. melitensis*, à l'exception d'une souche de *B. suis* (biovar 2) et une souche atypique (*B. inopinata*-like).

En 2020, 46 prélèvements ou souches bactériennes et 290 sérums ont été analysés. Vingt-deux cas ont été déclarés, tous en France métropolitaine, à l'exception d'un cas dans le département de la Guyane. Parmi ces 22 cas, 17 souches de *Brucella* sp. a été isolée chez 17 patients. La PCR multiplexe « Bruce Ladder » a identifié 12 souches appartenant à l'espèce *B. melitensis*, 2 souches à l'espèce *B. abortus* et 2 souches à l'espèce *B. suis* (dont une appartenant au biovar 2 et une, d'origine Guyanaise, non typable et récemment reclassifiée comme une nouvelle espèce). Un cas de brucellose a été identifié par PCR et 4 par sérologie.

Aucun cluster n'a été observé en 2019 et 2020. Deux cas de contamination en laboratoire par *B. melitensis* ont été rapportés en 2019. Seuls cinq cas identifiés étaient autochtones : une réactivation d'une infection chronique chez un agriculteur à la retraite, 2 cas de *B. abortus* (probablement du à une réactivation), 2 cas rares d'infection à *B. suis* bv2 (endémique chez les sangliers en France) et un cas exceptionnel à partir duquel une *Brucella* atypique (*B. inopinata*-like) a été identifiée.

Pour les 31 cas importés où *B. melitensis* a été isolée, les pays (ou régions) présumés de contamination (voyage, séjour habituel ou lien familial étroit dans un pays d'endémie/enzootie) étaient : l'Algérie (n=13), le Portugal (n=4), l'Italie (n=2), la Turquie (n=2), le Maghreb (n=1), la Tunisie (n=1), le Maroc (n=1), l'Afghanistan (n=1) et le Liban (n=1). Un isolat d'une nouvelle espèce (initialement identifié comme appartenant à l'espèce *B. suis*) a été identifié dans un Portugal (4), Italie (2), Turquie (2), département d'Outre-Mer (Guyane).

The CNR has processed 56 bacterial samples or strains for identification of *Brucella* and 419 sera in 2019. During this year, 41 brucellosis cases were reported, all in metropolitan France. Thirty-one strains belonging to the genus *Brucella* were definitively identified at the CNR, 6 cases were by PCR and 4 cases by serology. The multiplex PCR "Bruce Ladder" showed that all the strains identified belonged to the *B. melitensis* species, with the exception of one strain of *B. suis* (bv2) and one atypical strain (*B. inopinata*-like).

In 2020, 46 samples or bacterial strains and 290 sera were analyzed. Twenty-two cases were reported, all cases were reported in metropolitan France, except for one case in French Guyana. Among the 22 cases, a *Brucella* strain was isolated from 17 patients. The multiplex PCR "Bruce Ladder" identified 12 strains of *B. melitensis*, 2 strains of *B. abortus* and 2 strains of *B. suis* (one of which was bv2 and one of Guyanese origin, non-typable and recently reclassified as a new species). One brucellosis case was identified by PCR and four by serology.

No clusters were observed in 2019 or 2020. Two cases of laboratory contamination with *B. melitensis* were reported in 2019. Only five identified cases were autochthonous: one reactivation of a chronic infection in a retired farmer, 2 *B. abortus* (probably due to a reactivation), 2 rare cases of *B. suis* bv2 infection (endemic in wild boar in France), and one exceptional case from which an atypical (*B. inopinata*-like) *Brucella* was identified.

For the 31 imported cases where *B. melitensis* was isolated, the presumed countries (or regions) of contamination (travel, usual stay or close family link in an endemic/enzootic country) were: Algeria (13), Portugal (4), Italy (2), Turkey (2), Maghreb (1), Tunisia (1), Morocco (1), Afghanistan (1) and Lebanon (1). One isolate of a new species (initially identified as *B. suis*) was found in French Guyana.

1 Missions et organisation du CNR

Depuis Janvier 2017, le service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière du CHU de Nîmes et l'unité INSERM 1047 assurent le diagnostic direct (bactériologique et, le cas échéant moléculaire) de la maladie (détection, recherche, identification et typage des souches de *Brucella*), l'expertise épidémiologique, le diagnostic indirect (sérologique) et l'expertise clinique.

Le CNR *Brucella* exerce les fonctions avec comme responsable scientifique le Dr. David O'CALLAGHAN (DR2 INSERM) et comme responsable médical le Pr. Jean-Philippe LAVIGNE (PU-PH Bactériologie).

En 2018, les effectifs du CNR des *Brucella* étaient les suivants : 1.40 ETP (équivalent temps plein). Theo PASTRE, technicien de laboratoire au CHU de Nîmes, assure les activités de diagnostic et de recherche du CNR. Le Dr. O'CALLAGHAN et le Pr. LAVIGNE sont impliqués au quotidien dans cette activité pour la réalisation du diagnostic sérologique, la validation des résultats techniques, l'interprétation des tests diagnostiques, la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs. Le Dr Anne KERIEL gère les aspects de biologie moléculaire et MALDI-TOF. De plus, les Drs O'CALLAGHAN et KERIEL, ainsi que des post doctorants et doctorants, sont impliquées dans les activités de recherche du CNR.

Le Dr. Paul LOUBET a rejoint les effectifs du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales en Novembre 2019 et a intégré le CNR Brucella en janvier 2020. Le Pr. SOTTO (PU-PH Maladies Infectieuses et Tropicales), le Dr. LOUBET et le Pr. LAVIGNE fournissent des conseils thérapeutiques et médicaux dans la prise en charge des patients et la surveillance des personnels de laboratoires. Le Pr. SOTTO et le Dr. LOUBET reçoivent en consultation les patients suspects de brucellose adressés par des confrères. Le Dr O'CALLAGHAN et le Pr. LAVIGNE effectuent également le recueil des renseignements cliniques et épidémiologiques, et l'élaboration des comptes rendus adressés à Santé Publique France.

L'organigramme

Directeur	David O'CALLAGHAN (DR2 INSERM)
Co-directeur	Jean-Philippe LAVIGNE (PU-PH Bactériologie)
Conseil clinique	Albert SOTTO (PU-PH Maladies infectieuses et tropicales) Paul LOUBET (PH Maladies infectieuses et tropicales) depuis janvier 2020
Recherche fondamentale	Anne KERIEL (CR INSERM) Flavia HAUSENAUR (post-doctorante) Sonia VECTION (doctorante)
Technicien de Laboratoire	Fanny Broussard (Tech CHU Nîmes) jusqu'à Août 2020 Théo Pastre (Tech CHU Nîmes) depuis Septembre 2020

2 Activités d'expertise

2019 56 prélèvements ou souches bactériennes, 419 sérums. 41 cas de brucellose (31 souches, 6 par PCR, 4 par sérologie).
2020 46 prélèvements ou souches bactériennes, 290 sérums. 22 cas de brucellose (17 souches, 1 par PCR, 4 par sérologie).

Le CNR a, en 2019 et 2020, apporté son appui aux laboratoires d'analyse et de biologie médicale et aux laboratoires hospitaliers pour l'isolement et l'identification présomptive des *Brucella*. Il est, à ce titre, le destinataire exclusif des souches suspectées d'appartenir au genre *Brucella* par les laboratoires. Le CNR met également en œuvre, le cas échéant, des outils moléculaires de détection (PCR), lorsque, en particulier, les tentatives d'isolement par les méthodes bactériologiques classiques n'ont pas donné de résultat malgré une forte suspicion (selon le tableau clinique et/ou épidémiologique). Il est également, à ce titre, le destinataire des prélèvements destinés à la recherche directe de *Brucella* ou de leurs acides nucléiques et du sérodiagnostic. Dans le cadre de l'accréditation COFRAC des laboratoires, le service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière du CHU de Nîmes est accrédité selon la NF EN ISO15189. Dans le champ de cette accréditation, sont inclus, l'identification bactérienne de souches (par MALDI-TOF), l'antibiogramme, la biologie moléculaire et la sérologie.

2.1 Évolutions des techniques

La nouvelle base de données développée en collaboration avec la société bioMérieux (Marcy l'Etoile, France) nous permet d'identifier correctement les isolats comme *Brucella* par MALDI-TOF. Cette base de données est maintenant intégrée en routine dans tous les appareils de spectrométrie de masse de type Vitek MS®.

Nous avons remplacé la nested-PCR ciblant la séquence d'insertion *IS711* spécifique de *Brucella* par une qPCR utilisant une sonde taqMan.

Nous avons développé et introduit une nouvelle PCR basée sur les régions flanquant le locus 'ectoine' présent dans certains isolats atypiques de *Brucella*.

Enfin, une plateforme de séquençage génomique a été mise en place.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

bioMérieux et Biorad ont arrêté la commercialisation de leurs kits Rose Bengale à la fin de l'année 2020. Cela a posé un sérieux problème pour nous et pour d'autres laboratoires de diagnostic car il s'agit du test de criblage le plus simple et le plus rapide utilisé pour le sérodiagnostic de la brucellose. Nous avons évalué le test Rose Bengale fabriqué par la société Vircell et distribué par la Société Orgentec dans une démarche de validation de méthode. Les évaluations au CNR de ce kit sont tout à fait satisfaisantes et identiques aux autres kits.

Le tableau des résultats est présenté ci-joint (Tableau 1). La méthode statistique Kappa de Cohen a été appliquée aux résultats. Elle valide la correspondance des résultats entre les deux kits jusqu'à la dilution 1/8.

Date	Référence serum patient	Bio-Rad		Vircell	
		Serum patient		Serum patient	
		pur	dernière dilution avec agg°	pur	dernière dilution avec agg°
27/04/2021	BRU-2018-861	POS	>1/32	POS	>1/32
27/04/2021	BRU-2019-1004	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1006	POS	1/4	POS	1/4
27/04/2021	BRU-2019-1066	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1112	POS	1/4	POS	1/4
27/04/2021	BRU-2019-1131	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1143	POS	1/8	POS	1/8
27/04/2021	BRU-2019-1212	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1214	POS	1/16	POS	1/8
27/05/2021	BRU-2019-1214	POS	1/8	POS	1/16
27/04/2021	BRU-2019-1266	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1276	POS	1/16	POS	1/16
27/05/2021	BRU-2019-1309	POS	1/16	POS	1/16
27/04/2021	BRU-2019-1313	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1336	POS	1/4	POS	1/4
27/04/2021	BRU-2019-1352	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2019-1398	POS	1/16	POS	1/16
27/04/2021	BRU-2020-1443	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1457	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1474	POS	pur	POS	pur
27/04/2021	BRU-2020-1482	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1526	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1541	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1580	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1621	POS	1/2	POS	1/2
27/04/2021	BRU-2020-1632	NEG		NEG	
27/04/2021	BRU-2020-1642	POS	1/16	POS	1/16
27/04/2021	BRU-2020-1678	POS	>1/32	POS	>1/32
27/04/2021	BRU-2021-1696	POS	1/8	POS	1/16
27/05/2021	BRU-2021-1696	POS	1/8	POS	1/8
27/04/2021	BRU-2021-1737	POS	1/8	POS	1/16
27/05/2021	BRU-2021-1737	POS	1/8	POS	1/8

Tableau 1. Comparaison des résultats de kits de Rose Bengale fournis par Bio-Rad et Vircell.

L'ensemble des résultats ont été réalisés en triplicate en aveugle des résultats obtenus pour chaque sérum.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

N/A

2.4 Collections de matériel biologique

Le CNR dispose d'une collection de 102 isolats cliniques, comprenant 36 souches de *Brucella melitensis*, 4 souches de *Brucella suis*, et 2 souches de *Brucella* sp. Nous avons également deux souches qui représentent une nouvelle espèce de *Brucella* (analyse en cours) et des isolats d'une *Brucella* atypique proche de *B. inopinata*. Le CNR a vu son nombre d'isolats cliniques augmenter de 39 au cours de l'année 2019 et 26 en 2020. Cette collection est stockée dans un congélateur à -80°C dans l'enceinte du CNR. L'INSERM U1047 dispose également d'une collection de souches de référence pour les espèces et biovars de *Brucella*, d'une grande collection d'isolats d'origine

animale et humaine ainsi qu'une collection de mutants construits au laboratoire dans le cadre de la recherche fondamentale sur la pathogénicité de la bactérie.

Le CNR dispose de 1699 sérums ou Liquides céphalo-rachidiens (LCR). Cette collection est stockée dans un congélateur à -20°C dans l'enceinte du CNR.

2.5 Activités d'expertise

Cas de Brucellose

En 2019 et 2020, 42 et 22 cas de brucellose ont été déclarés et validés par Santé Publique France, respectivement ; tous les cas ont été déclarés en France métropolitaine, à l'exception d'un cas en 2020, dans le département de la Guyane. Ce nombre est à peu près stable depuis 10 ans (**Tableau 1** et **Figure 1**). Nous avons noté une baisse en 2020, probablement en raison de la réduction des déplacements suite à la crise sanitaire liée au virus SARS-CoV-2.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Nombre de cas de brucellose*	21	32	29	16	19	22	30	25	41	22	
Cas confirmés par isolement de <i>Brucella</i> (identifiées et typées au CNR) ou PCR	Isolement	24	23	20	12	17	21	27	23	31	17
	PCR uniquement	0	3	0	0	0	1	11	1	6	1
Cas confirmés par sérologie uniquement au CNR	0	6	8	2	1	2	1	1	4	4	

Tableau 1. Bilan des cas de brucellose confirmés en France depuis 2011.

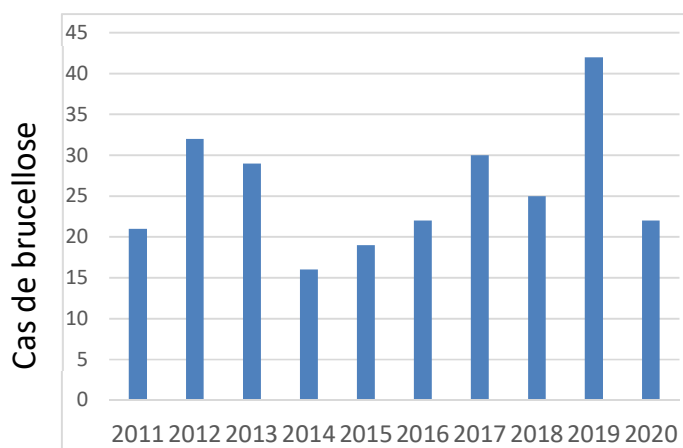


Figure 1. Cas de brucellose déclarés annuellement en France entre 2011 et 2020.

Méthodes d'identification directes

Souches et prélèvements reçus

En 2019, le CNR a traité 56 prélèvements ou souches bactériennes pour identification de *Brucella*. La PCR multiplexe « Bruce Ladder » a montré que toutes les souches identifiées appartenaient à l'espèce *B. melitensis*, à l'exception d'une souche appartenant à l'espèce *B. suis* (bv2) et une souche atypique (voir 'Cas exceptionnel) (Tableau 2).

En 2020, le CNR a eu à traiter 46 prélèvements (confirmation de souches bactériennes, diagnostic direct) concernant 46 patients en 2020, provenant majoritairement de France métropolitaine. Dix-sept souches appartenant au genre *Brucella* ont été définitivement identifiées chez 17 patients différents (Tableau 2). Douze souches ont été confirmées comme appartenant à l'espèce *B. melitensis*, 2 souches de *B. abortus*, 2 de *B. suis* (dont un bv2 et un, d'origine Guyanaise, non typable et récemment identifié comme une nouvelle espèce). L'analyse de cette nouvelle espèce est en cours et sera décrite dans le prochaine rapport.

Tous les isolats ont été reçus pour des demandes de confirmation de suspicion de *Brucella*. La majorité (n=32) provenait de flacons d'hémocultures positifs. Les autres souches ont été isolées à partir de pus, d'une plaie cutanée, de liquides ou biopsies articulaires (genou et hanche), d'autres biopsies (aorte, sein) et sur une voie veineuse centrale. Nous avons identifié un cas rare d'infection chez un nouveau-né (dont la mère présentait un cas importé de brucellose), acquise soit *in utero*, soit lors de l'accouchement.

L'ADN de *Brucella* a été détecté par PCR dans 3 prélèvements (adénopathies cervicales, ponction du disque vertébral) issus de 2 patients en 2019, et 2 prélèvements (sang Total et moelle osseuse) issues d'un patient en 2020 (Tableau 3).

La majorité des cas étaient importés (Tableau 2, Figure 2). On constate, de façon générale, que les pays du Maghreb représentaient la principale région du Monde en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France et plus largement le pourtour du Bassin Méditerranéen (Figure 2). On peut expliquer cette constatation par les liens très étroits entre ces pays et la France, la forte communauté Franco-Maghrébine résidant en France et la proximité de ces pays pour des voyages touristiques. Ces pays demeurent toujours des pays d'endémie/enzootie pour la brucellose humaine. Nous avons identifié un cas de brucellose en Guyane, chez un patient vivant en forêt amazonienne. Les cas autochtones correspondaient à deux infections acquises en laboratoire, deux cas de *B. suis* bv2 (souches associées à des sangliers en France), et deux probables réactivations d'infections antérieures (à *B. melitensis* et *B. abortus*). Un cas exceptionnel d'infection par une souche atypique de *Brucella* a été signalé en 2019.

No CNR	Espèce	Nature du prélèvement	Données cliniques	Séjour pays à risque	Commentaires
BRSO-2019-081	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Spondylite	Algérie	
BRSO-2019-086 BRSO-2019-089	Atypique <i>B. inopinata</i> like	Ganglion cervical gauche	AEG, Fièvre, sueurs, adénopathies, tableau pulmonaire	France	Contact avec des serpents, tortues, grenouilles
BRSO-2019-087 BRSO-2019-088	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Fièvre, amaigrissement	Maroc	
BRSO-2019-092	<i>Brucella melitensis</i>	NR		France	Technicienne de Laboratoire, manipulation de flacon d'hémoculture en décembre 2018
BRSO-2019-093	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Fièvre avec sudation, douleur jambe	Algérie	Consommation de lait cru
BRSO-2019-094	<i>Brucella melitensis</i>	Liquide de ponction du disque	Spondylodiscite	Algérie	
BRSO-2019-095 BRSO-2019-121 BRSO-2019-130	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Arthrite du genou sur PTG		Consommation lait de chamelle
BRSO-2019-097	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Spondylodiscite	Portugal	
BRSO-2019-100	<i>Brucella melitensis</i>	Ponction vertébrale	Spondylodiscite	Algérie	Consommation fromage et lait cru
BRSO-2019-102	<i>Brucella melitensis</i>	Ponction du genou	Fièvre, arthrite du genou	Portugal	
BRSO-2019-103 BRSO-2019-105	<i>Brucella melitensis</i>	Liquide articulaire	Fièvre, arthrite du genou	Portugal	
BRSO-2019-104	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre+ spondylite avec abcès L4-L5	Algérie	
BRSO-2019-106	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre prolongée, douleur abdominale		
BRSO-2019-112	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Asthénie, fièvre prolongée	France	Technicienne de Laboratoire, manipulation de <i>Brucella</i>
BRSO-2019-114	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Hyperthermie, AEG, possible arthrite genou droit	Algérie	Dépeçage d'un mouton
BRSO-2019-117	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Douleur abdominale, fièvre	Maroc	
BRSO-2019-120	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture		Tunisie	

BRSO-2019-122	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre, syndrome pseudo-grippal et sueurs nocturnes	Turquie	Consommation de fromage
BRSO-2019-124	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre syndrome pseudo grippal et sueurs nocturnes	Turquie	Consommation de fromage
BRSO-2019-125 BRSO-2019-129	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre intermittente	Maroc	
BRSO-2019-127	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Hyperthermie persistante depuis 1 mois, sueurs nocturnes	Algérie	
BRSO-2019-135	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture		Maghreb	
BRSO-2019-139	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre	Algérie	
BRSO-2019-143	<i>Brucella melitensis</i>	Culture voie veineuse centrale		Espagne ou Portugal	
BRSO-2019-149	<i>Brucella melitensis</i>	Liquide gastrique			Nouveau-né dont la mère a voyagé en Algérie (été 2019) et bu du lait de vache
BRSO-2019-152 BRSO-2019-153	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture et Placenta	Fièvre, Endométrite, perte de l'enfant, présentation d'une RPM avec oligoamnios et hypotrophie fœtale	Italie	Voyage en Sicile
BRSO-2019-155	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Bactériémie, suspicion spondylodiscite	Afghanistan	
BRSO-2019-156	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Fièvre d'un mois, sueurs nocturnes, troubles digestifs	Liban	
BRSO-2019-157	<i>Brucella suis</i> bv2	Liquide de ponction	Suppuration au niveau du genou	France	Suppuration au niveau du genou (prothèse)
BRSO-2019-158	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	AEG depuis 2 mois, fièvre depuis 1 semaine		
BRSO-2019-159	<i>Brucella melitensis</i>	Culture voie veineuse centrale	Fébricule depuis 8 jours		
BRSO-2020-169	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre. Suspicion infection urinaire		
BRSO-2020-170	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture		Algérie	Voyage en Algérie, sacrifice de moutons et ingestion des abats.
BRSO-2020-179	<i>Brucella melitensis</i>	Culture sonde de défibrillateur			
BRSO-2020-181	<i>Brucella melitensis</i>	NR			

BRSO-2020-182	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture			Anciennement connue positive
BRSO-2020-191	<i>Brucella melitensis</i>	NR			Sérologie positive
BRSO-2020-195	<i>Brucella melitensis</i>	NR		Algérie	
BRSO-2020-196	<i>Brucella melitensis</i>	NR			
BRSO-2020-197	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture			
BRSO-2020-200	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Lombalgie, fièvre depuis 3 mois		
BRSO-2020-207	<i>Brucella melitensis</i>	NR	Fièvre, douleurs lombaires, syndrome grippal		
BRSO-2020-209	<i>Brucella abortus</i>	NR	Toux fébrile depuis 1 mois		
BRSO-2020-210	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre, douleur thoracique	Algérie	A gardé des moutons et consommé du fromage
BRSO-2020-211	<i>Brucella melitensis</i>	Hémoculture	Fièvre, douleur thoracique	Tunisie	Séjour dans une ferme avec des moutons et consommation de lait de brebis
BRSO-2020-213	<i>Brucella spp.</i>	Hémoculture	Fièvre chronique persistante	Guyane	Vie dans la forêt amazonienne Nouvelle espèce de <i>Brucella</i>
BRSO-2020-214	<i>Brucella suis</i> bv2	Biopsie de tissu aortique	Faux anévrisme sur endoprothèse aortique	France	
BRSO-2020-215	<i>Brucella abortus</i>	Plaie cutanée			Ancien chasseur, peu de signes cliniques

Tableau 2. Bilan des souches de brucellose confirmés en 2019 et 2020.

NR, non renseigné ; AEG, Altération de l'état général ; PTG, prothèse totale de genou ; RPM, rupture prématurée des membranes

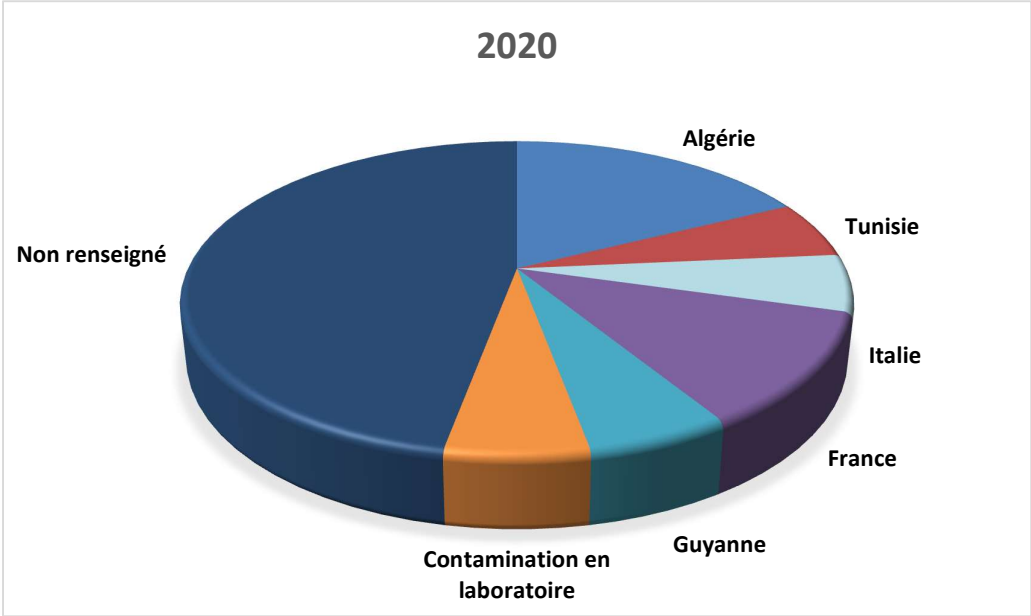
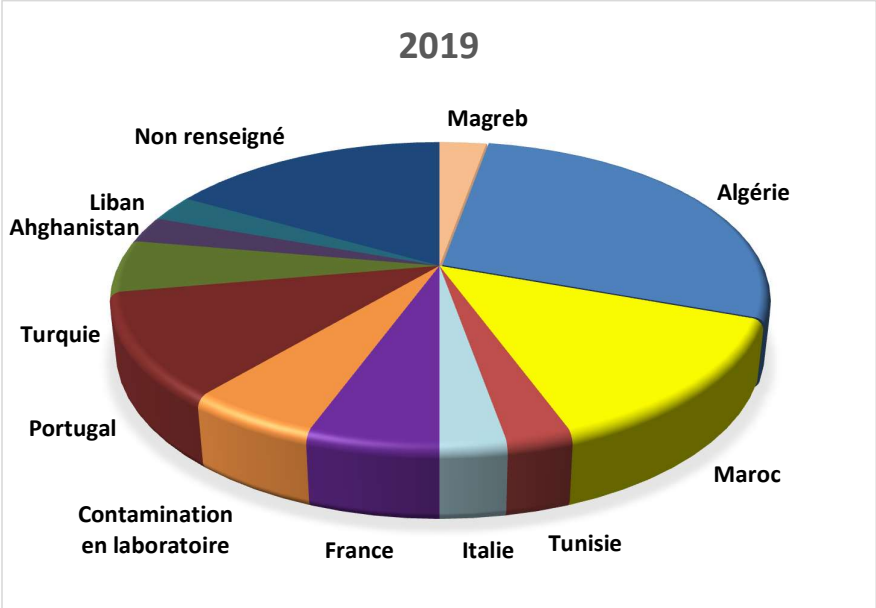


Figure 2. Pays en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France.

No CNR	Prélèvement	Commentaire
BRSO-2019-119 BRSO-2019-123	Ponction de Disque vertébral (Spondylodiscite).	Ancienne agricultrice de Lozère
BRSO-2019-141	Sang	
BRSO-2019-142	Sang	Voyage au Sénégal ? Cuisinier
BRSO-2019-144	Sang	
BRSO-2019-151	Biopsie de quoi ?	Asthénie, plusieurs voyages
BRSO-2020-189 BRSO-2020-190	Sang total Moelle osseuse	Pancytopenie

Tableau 3. Cas de brucellose identifiés par PCR seulement.

Méthodes de diagnostic indirectes

2019 En 2019, le CNR a expertisé 419 sérums. Notre objectif principal était d’investiguer les suspicions de brucellose non confirmées par culture.

Pour 358 sérums (provenant de 312 patients), nous avons rendu un résultat négatif. Quatre patients ont été identifiés comme ayant une infection fortement probable par *Brucella* sur la base du tableau clinique, de l’épidémiologie et du résultat des deux sérologies réalisées (**Tableau 4**). Dix sérologies positives ont été confirmées par l’isolement d’une souche de *Brucella* concomitamment chez le patient (**Tableau 5**).

Six sérologies, représentant 5 cas distincts, n’ont pas permis de conclure à une brucellose (**Tableau 6**). Un patient avait des résultats sérologiques négatifs, mais le dossier clinique suggérait une brucellose chronique (ce qui n’est pas incompatible). Un patient avait des résultats sérologiques négatifs, alors qu’un test PCR positif a été obtenu. Un suivi sérologique a été demandé chez ce patient, mais aucun échantillon supplémentaire n’a été adressé au CNR. Deux sérums prélevés chez un patient ont donné un résultat douteux.

Finalement, 27 sérologies issues de 26 patients ont été considérées comme correspondant à des fausses positivités dues à des réactions croisées, fréquentes avec ces sérologies (**Tableau 7**).

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2019-1006	1/4	1/640	960	Positif	Positif	1/1280
BRU2019-1057	1/8	1/160	240	Positif	Négatif	1/640
BRU2019-1063	>1/32	>1/2560	>3840	Positif	Positif	>1/5120
BRU2019-1065	>1/32	1/1280	1920	Positif	Positif	>1/5120

Tableau 4. Cas de brucellose confirmé par sérologie uniquement. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2019-1111	1/16	1/320	480	Positif	Positif	1/2560
BRU2019-1145	>1/32	1/640	960	Positif	Positif	1/2560
BRU2019-1197	>1/32	>1/2560	>3840	Positif	Positif	>1/5120
BRU2019-1214	1/16	1280	1920	Positif	Positif	1/1280
BRU2019-1245	1/4	1/320	480	Positif	Positif	>1/5120
BRU2019-1251	1/4	1/320	480	Positif	Positif	1/1280
BRU2019-1293	1/4	1/160	240	Positif	Positif	1/1280
BRU2019-1309	1/16	1280	1920	Positif	Positif	>1/5120
BRU2019-1336	1/16	1280	1920	Positif	Douteux	1/2560
BRU2019-1398	1/32	>1/2560	>3840	Positif	Négatif	>1/5120

Tableau 5. Résultats de sérologie pour les cas de brucellose avec isolement de *Brucella* par méthode directe. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt	Commentaire
BRU2019-1058	1/4	QI	-	Douteux	Douteux	1/320	Sérologie douteuse
BRU2019-1059	1/4	QI	-	Douteux	Douteux	1/320	Sérologie douteuse
BRU2019-1112	1/2	1/80	120	4.3 +	2.9 +	1/320	Sérologie douteuse
BRU2019-1145	>1/32	1/640	960	Positif	Positif	1/2560	Brucellose ?
BRU2019-1173	Négatif	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif	Brucellose chronique?
BRU2019-1301	Négatif	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif	Brucellose chronique? PCR +

Tableau 6. Cas de patients ayant un résultat sérologique non contributif. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2019-1004	0,5	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1013	Pur	0,0125	120	1.4 +	Négatif	Négatif
BRU2019-1014	0,5	0,0125	120	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2019-1019	Pur	0,0125	120	1.0 +	Négatif	Négatif
BRU2019-1020	Pur	0,0125	120	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2019-1021	Négatif	0,0125	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1022	Négatif	0,0125	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1023	Pur	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1026	Négatif	Négatif	-	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2019-1031	0,5	1/160	240	Négatif	Douteux	Négatif
BRU2019-1066	Pur	0,0125	120	Négatif	5,4 +	Négatif
BRU2019-1075	Négatif	0,0125	120	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2019-1098	Négatif	0,0125	120	1.4 +	Négatif	Négatif
BRU2019-1099	Pur	1/160	240	1.7 +	17.8 +	1/320
BRU2019-1101	Négatif	0,025	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1114	Pur	0,0125	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1140	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1141	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1142	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1143	0,5	0,025	60	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2019-1147	Négatif	0,0125	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1158	Négatif	0,05	30	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1162	Négatif	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1182	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1226	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1237	Pur	0,0125	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1254	0,5	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1255	Pur	0,025	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1256	Négatif	0,025	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1260	Négatif	0,05	30	Négatif	Négatif	Négatif

BRU2019-1276	0,5	1/320	480	Douteux	Douteux	1/320
BRU2019-1348	0,125	1/320	480	Négatif	Négatif	1/320
BRU2019-1349	Négatif	Négatif	-	Négatif	Douteux	Négatif
BRU2019-1352	Pur	0,025	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2019-1361	Pur	0,0125	120	Positif	Douteux	1/320

Tableau 7. Cas de sérologies considérées comme faussement positives. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

2020 _En 2020, le CNR a expertisé 290 échantillons (283 sérums, 6 LCR et 1 prélèvement de moelle osseuse). Notre objectif principal était d’investiguer les suspicions de brucellose non confirmées par culture.

Pour 220 patients, nous avons rendu un résultat négatif. Quatre cas ont été identifiés comme ayant une infection fortement probable par *Brucella* sur la base du tableau clinique, de l’épidémiologie et du résultat des sérologies réalisées (**Tableau 8**). Une sérologie positive a été confirmée par la culture en parallèle d’une souche de *B. melitensis* chez le patient (**Tableau 9**). Dix sérologies, représentant 7 cas distincts, n’ont pas permis de conclure à une brucellose (contexte épidémio-clinique non évocateur) (**Tableau 10**). Finalement, 27 sérologies prélevées chez 26 patients ont vu leurs résultats sérologiques considérés comme faussement positives dues à des réactions croisées (**Tableau 11**).

No CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2020-1460	1/8	1/320	480	Négatif	Douteux	1/320
BRU2020-1461	1/16	1/320	480	Douteux	Positif	1/1280
BRU2020-1532	1/4	1/160	240	Négatif	Positif	1/640
BRU2020-1555	>1/32	1280	1920	Positif	Positif	>1/5120
BRU2020-1615	1/16	1280	1920	Douteux	Positif	>1/5120
BRU2020-1678	e1/32	2560	3840	Négatif	Positif	1/320
BRU2020-1679	e1/32	2560	3840	Négatif	Positif	1/320

Tableau 8. Cas de brucellose confirmé par sérologie uniquement. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

No Dossier	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2020-1532	1/4	1/160	240	Négatif	Positif	1/640

Tableau 9. Cas de brucellose avec isolement de souche par culture, confirmé par sérologie. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

N°CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt	Conclusion
BRU2020-1557	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1558	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1582	Pur	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1594	1/16	1/640	960	Douteux	Positif	1/2560	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1612	1/8	1/640	960	Douteux	Négatif	1/2560	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1617	1/2	1/160	240	Douteux	Négatif	1/320	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1621	1/2	1/160	240	Douteux	Positif	1/320	A interpréter en fonction de la clinique

BRU2020-1637	Négatif	1/80	120	Douteux	Négatif	Négatif	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1642	1/32	1/320	480	Douteux	Positif	1/320	A interpréter en fonction de la clinique
BRU2020-1664	Négatif	1/80	120	Négatif	Positif	1/320	Cicatrice sérologique

Tableau 10. Cas de patients ayant un résultat sérologique non contributif. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

No Dossier	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2020-1436	Négatif	1/40	20	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1437	Négatif	1/20	30	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1438	Négatif	1/20	30	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1460	1/8	1/320	480	Négatif	Douteux	1/320
BRU2020-1461	1/16	1/320	480	Douteux	Positif	1/1280
BRU2020-1474	Pur	1/320	480	Négatif	Négatif	1/640
BRU2020-1488	1/4	1/320	480	Négatif	Douteux	1/640
BRU2020-1502	1/2	1/320	480	Négatif	Négatif	1/320
BRU2020-1511	Négatif	1/80	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1515	1/4	1/40	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1538	1/2	1/160	240	Négatif	Négatif	1/320
BRU2020-1539	Négatif	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1540	Négatif	1/80	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1564	1/4	1/40	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1580	Pur	1/40	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1583	Pur	1/40	60	Douteux	Douteux	1/320
BRU2020-1584	Pur	1/40	60	Douteux	Douteux	1/320
BRU2020-1595	Négatif	1/320	480	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1597	Négatif	1/40	60	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2020-1599	Négatif	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1600	Négatif	1/40	60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1604	1/2	1/20	30	Négatif	Négatif	1/160e
BRU2020-1613	Négatif	1/320	480	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1614	Négatif	1/80	120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1639	1/4	1/160	240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1640	Négatif	Négatif	-	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2020-1641	Pur	1/80	120	Négatif	Négatif	Négatif

Tableau 11. Cas de sérologies considérées comme faussement positives. Résultats du Rose Bengale (EAT, Epreuve Antigène Tamponné) exprimés en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultats de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée et en unités internationales (IU)) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultats de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultats des Ig par immunocapture (exprimé en dilution).

2.6 Activités de séquençage

Le CNR *Brucella* n'a pas d'activité de séquençage génomique en routine. Les apports du séquençage sont négligeables pour le diagnostic et la prise en charge de la brucellose humaine.

Toutefois, le plateau de Biologie Moléculaire du CHU de Nîmes est doté d'un système Illumina MiSeq et un system Nanopore Minion. En 2020, une activité de séquençage des génomes bactériens et viraux a été mise en place. Le séquençage génomique complet est utilisé dans les caractérisations génotypiques des isolats atypiques. Etant donnée la grande conservation des séquences génomiques des *Brucella*, il sera un outil précieux pour des études épidémiologiques en cas de cluster (SNP, MLST et MLVA).

3 Activités de surveillance

3.1 Description du réseau de partenaires

A priori tous les laboratoires d'analyses médicales, publics et privés, en France disposent via le site Santé Publique France de l'information nécessaire pour contacter le CNR afin d'envoyer les souches, les prélèvements, les sérums ou demander des conseils diagnostiques ou thérapeutiques. De plus, le CNR dispose d'un site internet (www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/accueil.html) accessible à tous et facilement identifiable sur les moteurs de recherche internet. Le nombre de souches et de sérums reçus correspond au nombre de DO validées au niveau de Santé Publique France. On peut donc considérer que le réseau est quasi-exhaustif sur le territoire. Des contacts réguliers ont été mis en place avec le laboratoire CERBA (Dr Stéphanie Haim-Boukobza, responsable du Pôle Infectiologie) pour suivre les prélèvements adressés à cette structure.

Par ailleurs, nous avons des contacts informels avec les centres de référence (humain et vétérinaires) en Europe et dans d'autres pays du monde (Chine, Argentine, Mexique, Brésil, Costa Rica, USA, Canada, Indonésie, ...).

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

L'activité en 2019 a été marquée par un pic dans le nombre de cas (n=41). Cependant, ce chiffre reste stable par rapport à la moyenne sur les 10 dernières années (25 cas par an en moyenne entre 2011 et 2017). Il faut souligner que la majorité des cas signalés sont importés, et que ces chiffres reflètent donc les niveaux de brucellose dans les pays où les personnes ont voyagé. Cela explique également la réduction des cas enregistrés en 2020 (n=22), les voyages ayant été fortement limités par la pandémie de COVID-19.

Très majoritairement les pays du Maghreb et plus largement le pourtour du Bassin Méditerranéen (n=18, 82%) représentent les principales régions en lien épidémiologique avec les cas de brucellose détectés en France. On peut expliquer ces constatations par les liens très étroits entre ces pays et la France, la forte communauté Franco-Maghrébine résidant en France et la proximité de ces pays pour des voyages touristiques. Ces pays demeurent toujours des pays d'endémie/enzootie pour la brucellose humaine (en particulier du fait de consommation de lait de chèvre).

Les cas autochtones sont généralement des réactivations d'infections anciennes ou chroniques (à *B. abortus* et *B. melitensis*), des techniciens infectés en laboratoire et de rares cas de *B. suis* bv2, qui est endémique chez le sanglier. En 2019, nous avons rapporté un cas exceptionnel d'infection par une *Brucella* atypique, similaire à la souche *B. inopinata*-like BO2 et à une souche isolée d'une grenouille PacMan que nous avons récemment caractérisée. Bien qu'il ne s'agisse que de la troisième infection humaine par une *Brucella* atypique signalée, il est possible que ces infections soient beaucoup plus fréquentes. Ces souches ont une croissance et des caractéristiques phénotypiques différentes de celles des *Brucella* classiques. Elles ont une croissance rapide, sont mobiles et n'expriment pas l'antigène-O classique de *Brucella*, ce qui signifie qu'elles ne donnent pas une réponse sérologique qui peut être détectée dans les tests standard utilisés en laboratoire. En outre, ces souches peuvent être confondues avec *Ochrobactrum*, un pathogène opportuniste. Ces souches peuvent maintenant être identifiées par MALDI-TOF MS. Nous suggérons qu'une attention particulière soit accordée aux souches identifiées comme *Ochrobactrum* par les méthodes classiques telles que les galeries API 20E®.

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

Aucune étude de sensibilité *in vitro* n'est réalisée de façon systématique sur les souches reçues au CNR en raison de l'absence de résistance acquise rapportée à ce jour pour les traitements recommandés pour la brucellose (seuls quelques cas décrits dans la littérature) et des difficultés d'interprétation des antibiogrammes (absence de seuils d'interprétation spécifiques pour *Brucella* définis par l'EUCAST).

Cependant, le CNR a effectué des antibiogrammes sur les isolats cliniques reçus afin de surveiller l'absence d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez *Brucella*. Aucune résistante aux antibiotiques n'a été observé. De plus, la souche atypique de *Brucella* (*B. inopinata* like-BO3) isolée d'un cas humain en 2019 et une souche très similaire isolée d'une grenouille, ainsi que la possible nouvelle espèce de *Brucella* isolée en Guyane, ont été testées et n'ont montré aucune résistance aux antibiotiques utilisés en clinique.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Non applicable

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Non applicable

4 Alerte

Toute confirmation diagnostique d'un cas de brucellose au CNR a fait l'objet d'un signalement à Santé Publique France. Plusieurs situations peuvent être considérées comme anormales et doivent être signalées sans délai à Santé Publique France et à la DGS :

- Un phénomène épidémique : les cas de brucellose en France sont habituellement sporadiques, en lien épidémiologique avec un pays d'endémie.
- La survenue de cas de brucellose en territoire français, chez un patient n'ayant pas voyagé au cours des mois précédents. La France étant considérée comme un pays indemne de brucellose bovine, ovine et caprine, la confirmation d'un cas autochtone impliquerait une action sanitaire vétérinaire immédiate.
- La survenue de cas groupés de pneumonies à *Brucella* spp. pourrait évoquer une action malveillante.

Aucune alerte relevant de ces trois cas évoqués n'a été déclenchée en 2019 et 2020.

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

Ce chapitre concerne principalement les activités à destination des professionnels de santé (notamment formation aux techniques de laboratoire) ; les activités liées à l'enseignement et la formation universitaires sont exclues.

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Un site web (<http://www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/accueil.html>) a été mis en place lors de la création du CNR. Ce site permet de contacter le CNR et informe les différents lecteurs sur l'épidémiologie, la clinique, le diagnostic et le traitement de la brucellose. Récemment, le site a été modifié (dans les limites de l'architecture imposée par le CHU), afin de permettre à nos partenaires de trouver plus facilement les informations. Les formulaires de demande d'analyse et les instructions pour l'envoi des prélèvements et souches ont été améliorés. Les rapports d'activité du CNR depuis 2017 sont également disponibles sur le site. Nous avons également une adresse e-mail (CNR.brucella@chu-nimes.fr), avec redirection automatique des messages reçus sur l'ancienne adresse de l'ANSES (cnr.brucella@anses.fr), permettant d'être en lien étroit avec les professionnels de Santé en France. Afin de favoriser les communications entre le CNR et le LNR, l'équipe du LNR reçoit les communications adressées au CNR. Elle est tenue informée des cas de brucellose humaine identifiés.

Le CNR a une activité de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Les communications sont réalisées par e-mail sur l'adresse générique ou les adresses professionnelles des médecins du CNR ou par téléphone. L'activité téléphonique représente entre 2 et 10 appels hebdomadaires. Le Pr. LAVIGNE donne son numéro de portable pour être le plus rapidement et le plus facilement joignable par les professionnels de Santé.

En termes de formation, les Pr. SOTTO et LAVIGNE donnent des cours magistraux en maladies infectieuses et microbiologie (et en particulier sur la brucellose) à la Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes. Les Dr. Keriell et O'Callaghan ont donné des conférences sur la brucellose en France et à l'étranger (USA, Chine, Brésil). Le Pr. SOTTO est le Président du Collège universitaire des Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT). Il coordonne la rédaction du référentiel de Maladies Infectieuses et Tropicales, PILLY et notamment le chapitre dédié à la brucellose. Le Pr. LAVIGNE a participé à la rédaction du chapitre « *Brucella* » dans la 6^{ème} Edition du REMIC (Référentiel en microbiologie médicale). Une nouvelle version du chapitre sera revue en 2021. Enfin, les Pr. LAVIGNE et SOTTO ont revu le chapitre dédié au diagnostic et au traitement de la brucellose pour l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale (sortie prévue en 2021). Enfin, ils ont participé au groupe de travail qui sous l'égide de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) a proposé des recommandations pour la prise en charge des personnes ayant une exposition accidentelle à *Brucella* en 2020.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Le CNR répond à toute demande de conseils dans ses domaines de compétence. Plusieurs fiches ont été établies en collaboration avec Santé Publique France et servent de base à l'information des laboratoires qui déclarent les cas de brucellose à Santé Publique France ou qui demandent une expertise diagnostique concernant cette maladie. Une fiche d'accompagnement des souches et autres prélèvements lors d'envoi au CNR a été mise en place (téléchargeable sur le site internet du CNR). Ces documents ont été mis à jour pour tenir compte des évolutions du CNR et de la modification de la réglementation concernant les Micro-organismes et Toxines (MOT). Le CNR, dispose d'une équipe de cliniciens, scientifiques et technicien, qui assure une permanence téléphonique 5 jours sur 7.

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

Non applicable

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Etude de la virulence de *Brucella*

Brucella est un pathogène intracellulaire facultatif, qui survit et se multiplie dans certaines cellules de l'hôte (cellules immunitaires, épithéliales ou placentaires). Notre équipe travaille sur les facteurs bactériens et cellulaires impliqués dans cette survie intracellulaire.

Systèmes de sécrétion et virulence. Du côté des facteurs de virulence bactériens, nous nous intéressons à plusieurs protéines appelées « effecteurs », qui sont transloquées par *Brucella* dans la cellule infectée via son système de sécrétion de type IV, VirB. Nous étudions également d'autres mécanismes de sécrétion présents chez *Brucella*, comme le système Tat (Twin Arginine Translocator).

En 2019, une thèse de doctorat a été soutenue par Elia Riquelme sur le thème: 'Analysing the role of secretion systems in the physiology and pathogenesis of *Brucella*'. Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec le Dr Bérengère Ize (LISM, Marseille).

Biologie cellulaire des infections. Nous étudions, par ailleurs, l'importance de différents facteurs de l'hôte dans la vie intracellulaire des *Brucella*. En collaboration avec le Dr Chloe Feral (IRCAN, Nice), nous travaillons sur le rôle du transporteur d'acides aminés CD98hc dans l'infection des trophoblastes (García-Méndez et al., 2019), des cellules placentaires dans lesquelles la multiplication des *Brucella* pourrait être corrélée aux complications lors de la grossesse chez les femmes infectées.

Nouveau traitement pour la brucellose. Des travaux menés au CNR avaient identifié une voie cellulaire essentielle à la réplication des *Brucella* dans les cellules de l'hôte (résultats non publiés). En 2020, nous avons démontré qu'une molécule connue pour cibler spécifiquement cette voie inhibe très fortement l'infection de différents types de cellules par des *Brucella in vitro*. Nous souhaitons désormais évaluer cette molécule dans un modèle murin de brucellose. Nous avons pour cela initié une collaboration avec Renée Tsolis (UC Davis, USA). Cette équipe vient de lancer des études préliminaires, sur un petit groupe de souris. Il est important de noter que ce projet s'inscrit dans une stratégie de repositionnement thérapeutique. La molécule évaluée (renommée « NTB » par souci de confidentialité) est en effet un médicament déjà sur le marché pour le traitement d'une maladie chronique, non infectieuse. Elle a donc déjà subi plusieurs phases d'évaluations précliniques et cliniques, et les données de tolérance sont disponibles. Sa diffusion serait par ailleurs facilitée par la préexistence de ses chaînes de production industrielle.

Cas exceptionnel En 2019, nous avons identifié un nouveau cas de brucellose humaine. Un patient a été admis au CH de Lorient avec des polyadénopathies associées à de multiples condensations pulmonaires. Nous avons identifié un isolat bactérien issu d'hémocultures chez ce patient comme appartenant à une *Brucella* atypique. Les analyses phénotypiques et du séquençage du génome ont montré que la souche était identique à une souche atypique isolée à partir d'un PacMan Frog. Le patient a eu de nombreux contacts personnels et professionnels avec des animaux exotiques, mais aucune source d'infection n'a pu être identifiée. Les infections à *Brucella* atypique ne peuvent pas être détectées par les tests sérologiques disponibles et peuvent être plus fréquentes qu'on ne le pense.

Score diagnostique Un travail débuté en 2020 et en cours de finalisation en 2021 a porté sur l'amélioration des performances des tests sérologiques en particulier du test au Rose Bengale. Si ce test a une bonne sensibilité (98.4%), sa valeur prédictive positive est très faible (43.5%). Un travail sur la dilution de cette sérologie (traditionnellement utilisé sans dilution en suivant les instructions des fournisseurs) permet d'améliorer cette valeur (84.2% en diluant au ¼). Par ailleurs, un score diagnostique a été établi et doit être validé combinant les différents tests sérologiques et permettant d'augmenter les performances de l'ensemble des tests utilisés isolément.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Publications

- Rouzic N, Desmier L, Cariou ME, Gay E, Foster JT, Williamson CHD, Schmitt F, Le Henaff M, Le Coz A, Lorléac'h A, Lavigne JP, O'Callaghan D, Keriél A. First case of brucellosis caused by an Amphibian-type *Brucella*. Clin Infect Dis 2021 ; 72(9) : e404-e407. Doi : 10.1093/cid/ciaa1082.
- Stahl JP, Bru JP, Gehanno JF, Herrmann JL, Castan B, Deffontaines G, Sotto A, Lepelletier D, Tattevin P, Godefroy N, Haddad E, Mailles A, Lavigne JP. Guidelines for the management of accidental exposure to *Brucella* in a country with no case of brucellosis in ruminant animals. Med Mal Infect. 2020; 50(6): 480-485. doi: 10.1016/j.medmal.2020.05.002.
- O'Callaghan D. Human brucellosis: recent advances and future challenges. Infect Dis Poverty. 2020 Jul 23;9(1):101. doi: 10.1186/s40249-020-00715-1.
- Jiang H, O'Callaghan D, Ding JB. Brucellosis in China: history, progress and challenge. Infect Dis Poverty. 2020 May 24;9(1):55. doi: 10.1186/s40249-020-00673-8.
- García-Méndez KB, Hielpos SM, Soler-Llorens PF, Arce-Gorvel V, Hale C, Gorvel JP, O'Callaghan D, Keriél A. Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionis* modifies essential physiological functions of human trophoblasts. Cell Microbiol. 2019 Jul;21(7):e13019. doi: 10.1111/cmi.13019.

Oral Communications

- Riquelme E, Felix C, Vergunst A and O'Callaghan D An 'open channel conformation' VirB10 deregulates intracellular trafficking and virulence of *Brucella suis*. 63rd Annual Wind River Conference on Prokaryotic Biology. Estes Park, Colorado. 5-9 2019.
- Hasenauer, FC, Hielpos MS, O'Callaghan D and Keriél A. Cell-to-cell spreading of *Brucella* infection through apoptotic bodies Journée de boursiers de l'Infectiopol Sud, Marseille July 2019
- O'Callaghan D Evolution of *Brucella* as a pathogen. Keynote lecture International Symposium on Brucellosis, Manzhouli, China. 24-25 August, 2019.
- O'Callaghan D. Brucellosis in the European Union, DITRA Workshop, Chicago, 1 November 2019
- Riquelme E, Ize B, O'Callaghan D. The twin arginine system is essential for *Brucella*. Brucellosis Research Conference, Chicago. 2-3 November 2019
- O'Callaghan D: Invited Professor, Universidad Federale de Lavras, Brazil. Funded by CAPES Brazil. 7-19 March, 2020
 - Non-mammalian animal models for infectious disease research
 - Cell biology of brucellosis
 - Brucellosis in the Europe Union
 - Mechanisms of Type IV secretion in *Brucella*
- O'Callaghan D. *Brucella* genomics; how did *Brucella* evolve as a pathogen? Keynote speaker International symposium; 'Brucellosis: "One Health" challenges and opportunities'. Universidad Federale de Lavras, Brazil. 13-14 March, 2020.

- **Vecton, S C** A new Drug to fight brucellosis ? CRWAD (USA) 13 Nov 2020 (online)

Posters

- **Hasenauer, FC**, Hielpos MS, O'Callaghan D and Keriell A. Cell-to-cell spreading of *Brucella* infection through apoptotic bodies Journée de boursiers de l'Infectiopole Sud, Marseille July 2019
- Rouzic N, **Desmier L**, Cariou ME, Gay E, Foster JT, Williamson CHD, Schmitt F, Le Henaff M, Le Coz A, Lorléac'h A, Lavigne JP, O'Callaghan D, **Keriell A**. First Case of Brucellosis Caused by an Amphibian-type Brucella. Brucellosis Research Conference, Chicago. 2-3 November 2019
- **Hasenauer FC**, García-Méndez K, Feral C, O'Callaghan D and Keriell A Quantitative monitoring of macropinocytosis during infection by intracellular pathogens: a comprehensive image-based workflow Journée de boursiers de l'Infectiopole Sud, Marseille July 2020

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

Le CNR travaille en étroite collaboration avec le Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort (Laboratoire National de Référence de *Brucella*).

Les deux parties collaborent dans le domaine de l'information, de la formation, de la recherche et de l'appui scientifique et technique.

Cette collaboration avec le LNR, qui est également Laboratoire Européen de référence de la brucellose animale, contribue ainsi la surveillance et le contrôle de la brucellose humaine et animale. Tous les cas de brucellose humaine sont ainsi signalés au LNR.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Beaucoup de nos projets ont été mis en attente depuis la crise sanitaire liée au COVID-19 durant laquelle les infectiologues et microbiologistes de notre CNR ont été tout particulièrement mobilisés.

- **Démarche d'accréditation du CNR selon la norme ISO 15189** : Notre équipe a décidé de continuer à engager cette démarche en extension de portée (en bénéficiant des outils de qualité mis en place au CHU de Nîmes). Le site web du CNR, de par sa visibilité et son accessibilité, a été totalement mis à jour récemment. Toutes les informations nécessaires aux pré-analytiques (envoi de prélèvements par les laboratoires extérieurs, fiche de recueil clinique, non opposition des patients pour la conservation des prélèvements) ont été modifiées en lien avec la démarche d'accréditation. De plus, un audit a été réalisé sur le travail analytique du CNR. Le processus analytique comporte de nouvelles méthodes qui doivent être intégrées à la portée d'accréditation. Un travail sur la dilution des sérums dans le test du Rose Bengale (ou de l'Épreuve à l'Antigène Tamponné (EAT)) et l'optimisation d'un score diagnostique a été réalisé. La modification de l'EAT différant des préconisations de la notice d'utilisation a nécessité la mise en place d'un dossier de Validation de Méthode.

- **Renforcement du réseau de partenaires** et collaborations à constituer ou renforcer :

*Notre équipe va continuer sa collaboration avec le LNR/EURL des *Brucella* (ANSES, Maison Alfort).

*Au niveau international, les services de Microbiologie et de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nîmes ont signé un accord de collaboration avec l'hôpital Viet Tiep d'Haiphong (Vietnam). Dans ce cadre, des formations à la recherche de brucellose seront organisées car ce diagnostic n'est à ce jour pas effectué couramment dans ce pays.

*Le Dr O'Callaghan a été contacté par des employés du ministère indonésien de la santé pour aider à mettre en place un programme de dépistage de la brucellose. Le Dr O'Callaghan a reçu un financement de l'Institut France Indonésie pour une mission à Jakarta afin de discuter de ce projet et de donner des conférences lors d'un symposium d'une journée sur la brucellose.

*Nous allons poursuivre notre collaboration avec l'ICDC à Pékin. Le Dr O'Callaghan bénéficie d'un financement du Programme Chine Découvert pour visiter des laboratoires à Pékin et Hangzhou afin d'établir de nouvelles collaborations sur les biomarqueurs de la brucellose humaine.

-**Développement de techniques de détection, d'identification et de caractérisation des brucelloses** :

*Les techniques sérologiques et de biologie moléculaires évoluent sans cesse. Nous évaluerons les différents coffrets qui seront mis sur le marché français (voir européen) afin d'établir les sensibilités, spécificités de ces techniques. Nous sommes actuellement en contact avec la société EllieLab (Germantown, WI, USA) qui commercialise une technique par Fluorescence Polarisation Assay pour la détection de *Brucella*. Par ailleurs, une spin-off de l'Université de Liège en Belgique (CIDE-SOCRAN), nous a contactés pour la mise en place d'un kit conçu pour typer les bactéries appartenant au genre *Brucella*, dans un but d'identification de l'espèce concernée et de suivi épidémiologique. Enfin, un travail sur les performances de la dilution du test au Rose Bengale et l'établissement d'un score diagnostique sont en cours de réalisation.

Ces projets ont été impactés par la crise sanitaire actuelle et pour certains ont été mis en attente.

-**Activités de recherche** : L'unité INSERM 1047 a été recrée en janvier 2021 pour 5 ans. L'ensemble des activités de recherche menées par l'équipe 'Brucella' de cette unité continueront d'être développées durant l'année avec toujours un focus sur la relation hôte-pathogène et les effecteurs du système de sécrétion de Type IV et le system Tat.

-**Communication** : Dr O'Callaghan est co-organisateur du Congrès international sur la Brucellose (75th Annual Brucellosis Research Conference) qui aura lieu en Italie en 2022.