



RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Brucella

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Expert	CHU, Nimes	David O'Callaghan
Laboratoire Associé		

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	8
2.4 Collections de matériel biologique	8
2.5 Activités d'expertises	10
2.6 Activités de séquençage	15
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	16
3. Activités de surveillance	17
3.1 Description du réseau de partenaires	17
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	18
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	18
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	19
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	19
4. Alertes	20
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	21
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	21
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	21
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	21
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	22
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	Error! Bookmark not defined.
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	Error! Bookmark not defined.

7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	26
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	27
1.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	29
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	29
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	29
1.3	Locaux et équipements	33
1.4	Collections de matériel biologique	34
1.5	Démarche qualité du laboratoire	35
2.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	39
2.1	Liste des techniques de référence	39
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	40
3.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	42
3.1	Permanence du CNR	42
3.2	Autorisations MOT	42
3.3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	43
3.4	Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	43
3.5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France	43
3.6	Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR	43
3.7	Autres remarques à destination du comité des CNR	43

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

En 2022, le CNR a traité 117 prélèvements ou souches bactériennes (issus de 83 patients) pour identification de *Brucella*. En tout, 43 cas de brucellose ont été déclarés, 41 en France métropolitaine, un en Guadeloupe et un à Wallis et Futuna. Des souches appartenant au genre *Brucella* ont été définitivement identifiées au CNR pour 37 patients, 2 cas ont été diagnostiqués par PCR spécifique sur biopsies (avec sérologies positives) et 6 cas par sérologie seule. 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 1) isolée chez le patient de Wallis et Futuna (où des foyers de brucellose porcine ont été décrits) et une souche de *B. abortus* (correspondant à une réactivation d'une ancienne infection).

Parmi les 43 patients, 41 étaient des cas importés. Pour les deux cas autochtones, un correspondait à la réactivation d'une ancienne infection avec *B. abortus*, le deuxième était basé uniquement sur le résultat de la sérologie et un rapport d'une souche identifiée par un laboratoire privé (la souche ne nous a pas été adressée). Dans ce 2^{ème} cas, le patient était un chasseur de sanglier (possibilité de *B. suis* bv2). Deux cas ont été signalés dans des départements/collectivités d'outre-mer. Un cas en Guadeloupe a été associé avec une consommation de fromages au lait cru venant du Liban ; le deuxième à un cas de *B. suis* bv1 à Wallis et Futuna. Les autres cas diagnostiqués ont été importés de pays endémiques, avec une forte majorité provenant des pays du bassin Méditerranéen (principalement du Maghreb). Sur les 43 cas, 19 ont signalé un comportement à risque (17 par consommation de produits à base de lait cru, un des produits locaux, et le chasseur de sangliers).

En collaboration avec des praticiens hospitaliers de Guyane française (CH de Cayenne), le CNR *Brucella* a récemment découvert une nouvelle espèce, nommée (nommée *B. amazoniensis*). Cette espèce a été à l'origine de deux infections humaines chez des habitants de la forêt amazonienne. Des comparaisons génétiques ont révélé que d'anciens cas humains avaient également été causés par *B. amazoniensis* : 4 au Texas et 1 dans le Nord du Brésil. Nous travaillons avec le Laboratoire National de Référence des brucelloses (animales), les autorités sanitaires et vétérinaires locales pour déterminer l'incidence de la brucellose humaine dans le département et identifier les éventuels réservoirs animaux.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

In 2022, the CNR examined 117 samples or bacterial strains (83 patients) for the identification of *Brucella*. In total, 43 cases of brucellosis were reported, 41 in mainland France, one in Guadeloupe and one in Wallis and Futuna. Strains belonging to the *Brucella* genus were definitively identified at the CNR for 37 patients, 2 cases were diagnosed by specific PCR on biopsies (associated with positive serologies) and 6 cases by serology alone. Bruce Ladder multiplex PCR showed that all the strains identified were *B. melitensis*, with the exception of one strain of *B. suis* bv1 in Wallis and Fortuna (where there are outbreaks of swine brucellosis) and one strain of *B. abortus* (patient with a reactivation of an old infection).

Of the 43 patients, 41 were imported cases. For the two cases in mainland France, one was the reactivation of an old infection with *B. abortus*, the second was based on serology and a report of a strain by a private laboratory (we were unable to recover the strain). The patient was a wild boar hunter (possibility of *B. suis* bv2). Two cases were reported in overseas departments/collectives. One case in Guadeloupe, associated with the consumption of unpasteurized cheese from Lebanon, and the second, a case of *B. suis* bv1 in Wallis and Futuna. The other cases were imported from endemic countries, with a strong majority from the Mediterranean basin, mainly North Africa. Of the 43 cases, 19 reported at risk behaviour (17 consuming raw milk products, one consuming local products, and the wild boar hunter).

In collaboration with the hospital center in French Guyana (CH Cayenne), the CNR *Brucella* has recently discovered a new *Brucella* species, named *B. amazoniensis*, which has caused two human infections in Amazonian forest dwellers. Genetic comparisons also revealed that other old human cases had also been caused by *B. amazoniensis*: 4 in Texas and 1 in northern Brazil. We are working with the National Reference Laboratory (animal) and the local health and veterinary authorities to determine the incidence of human brucellosis in the department and to identify any animal reservoirs.

1. Missions et organisation du CNR

PAS DE CHANGEMENT VOIR ANNEXE 1

Organigramme

Tableau 1. Liste des personnels dévolus aux activités du CNR Laboratoire Expert *Brucella*

Nom	Appartenance	ETP	Rôle
David O'CALLAGHAN	DR2 INSERM	0,2	Responsable Scientifique
Jean-Philippe LAVIGNE	PU-PH, UM, CHU Nîmes	0,3	Responsable Biologique et Médical Médecin biologiste
Paul LOUBET	PH CHU Nîmes	0,1	Médecin Infectiologue
Chloé MAGNAN	AHU CHU Nîmes	0,1	Pharmacien biologiste
Albert SOTTO	PU-PH, UM, CHU Nîmes	0,05	Médecin Infectiologue
Anne KERIEL	CRCN INSERM	0,3	Recherche fondamentale
Théo PASTRE	Technicien de laboratoire, CHU Nîmes	1	Sérologie, Bactériologie classique, Diagnostic moléculaire, Accréditation, Gestion des stocks
Ludovic DESMIER	Technicien de laboratoire, CHU Nîmes	0,1	Technicien de la Plateforme Génomique Microbienne (MICRO&BIO)
Marion DIAZ	Secrétaire, CHU Nîmes	0,1	Rendu des résultats, Réception des communications téléphoniques

Mission et Organisation

PAS DE CHANGEMENTS (Voir ANNEXE 1)

Démarche Qualité

Le CNR-LE est dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189. Le Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière est accrédité selon la norme NF15189 depuis le 1^{er} janvier 2015 (Accréditation N°8-3367). La demande d'accréditation spécifique du CNR sera normalement évaluée lors de la venue des experts-visiteurs la dernière semaine de septembre 2023 au CHU de Nîmes.

2. Activités d'expertise

Evolution des techniques

BioRad et BioMérieux ont cessé de produire et distribuer les tests sérologiques de Wright et de Rose Bengale.

Pour le test au Rose Bengale, nous avons trouvé une alternative appropriée avec l'antigène de Virclia, commercialisé par la société Orgentec (voir Rapport 2021).

Par contre, il n'existe pas de kit de Wright homologué pour le diagnostic humain. Cela pose un problème majeur à l'ensemble des laboratoires français (publics et privés) et au CNR. En effet, afin de rester en accord avec la nomenclature NABM, il est demandé que 2 techniques minimum avec recherche d'anticorps bloquants soient pratiqués pour faire un diagnostic.

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Non applicable en 2022.

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Non applicable.

Collections de matériel biologique

Le CNR Brucella détient une collection de souches, une sérothèque et une collection de LCR.

La collection de souches correspond à :

- des souches de référence ATCC/NCTC et des souches types (pour *B. cetii*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* et *B. papionis* récemment approuvées) et de l'ensemble des espèces et biovars de *Brucella* actuellement reconnus,
- une collection de près de 175 souches d'origine humaine et animale isolées des principales espèces domestiques et sauvages,
- une collection de souches apparentées aux *Brucella* au plan génomique (*Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, etc.) ou antigénique (*Yersinia enterocolitica* O:9),
- une collection de sérums (n=2273) et de LCR (n=20) positifs, négatifs, faussement positifs ou douteux au diagnostic de brucellose.

Un bilan de l'ensemble des souches de *Brucella* identifiées par le laboratoire chez l'homme est communiqué à Santé Publique France dans le rapport annuel du CNR.

La collection de souches est conservée dans un congélateur à -80°C au sein de l'unité VBIC accréditée pour détenir des MOTs (micro-organismes et toxines hautement pathogènes).

La sérothèque et les LCR sont conservés transitoirement dans un congélateur à -80°C au sein de l'unité VBIC puis transférées et conservées définitivement au sein du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes.

La mise à disposition de ces souches de collection ou des sérums est possible sur les bases de collaborations et en fonction de l'intérêt scientifique du projet.

Activités d'expertises

▪ Activités d'expertise microbiologique

En 2022, le CNR-LE a apporté son appui aux différents laboratoires d'analyses de biologie médicale et aux laboratoires hospitaliers pour l'isolement et l'identification des *Brucella*. Il a, par ailleurs, eu en charge la caractérisation moléculaire des *Brucella*, à minima au niveau de l'espèce. Il est, à ce titre, le destinataire (*a priori* exclusif) des souches suspectées d'appartenir au genre *Brucella* par les laboratoires français. Le CNR-LE a mis en place de nouveaux outils de biologie moléculaire et des techniques sérologiques qui font actuellement référence dans le diagnostic direct ou indirect de la brucellose humaine.

Méthodes d'identification directes

En 2022, le CNR-LE a traité 83 isolats et prélèvements et identifié 39 (45.8%) positifs pour *Brucella* avec 37 souches (Tableau 2) et 2 PCR positives sur biopsie (Tableau 3).

-Les 37 isolats appartenant au genre *Brucella* (isolés chez 37 patients) comprenaient : 35 *B. melitensis*, 1 *B. abortus* et 1 *B. suis* bv1.

Tableau 2. Cas de brucellose par identification directe à partir d'une souche.

N° CNR	Souche	Vitek MS	Bruce- LADDER	PCR IS711	Prélèvement	Séjour pays à risque	Commentaire
BRSO-2022-283	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru et fromage frais au lait cru
BRSO-2022-284	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ITALIE / TUNISIE	
BRSO-2022-302	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2022-305	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	TUNISIE	Consommation de lait cru
BRSO-2022-306	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	DJIBOUTI	Consommation de lait cru
BRSO-2022-307	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ARMENIE	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2022-309	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	DJIBOUTI	Consommation de lait cru
BRSO-2022-310	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	DJIBOUTI	Consommation de lait cru
BRSO-2022-311	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	DJIBOUTI	Consommation de lait cru
BRSO-2022-312				Présence de Brucella	Abcès biopsie vertébrale	MAGHREB	
BRSO-2022-314	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru et fromage frais au lait cru
BRSO-2022-315	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2022-316	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-317	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-318	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	TURQUIE	
BRSO-2022-319	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	TURQUIE	
BRSO-2022-321	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-322	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-323	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-324	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru, consommation de viande peu cuite
BRSO-2022-325	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru, consommation de viande peu cuite
BRSO-2022-326	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	
BRSO-2022-327				Présence de Brucella	Biopsie vertébrale	TURQUIE	
BRSO-2022-328	Brucella	Brucella spp	melitensis		Biopsie vertébrale	TURQUIE	
BRSO-2022-329	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	TURQUIE	
BRSO-2022-334	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	TUNISIE / DUBAI	
BRSO-2022-335	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2022-336	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur biopsie	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2022-337	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	
BRSO-2022-340	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-344	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		
BRSO-2022-345	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		
BRSO-2022-347	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2022-348	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de produits locaux, Médecin généraliste retraité
BRSO-2022-349	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2022-350	Brucella	Brucella spp	suis bv 1		Souche	WALLIS-ET-FUTUNA	
BRSO-2022-351	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	LIBAN	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2022-352	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	LIBAN	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2022-355	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-356	Brucella	Brucella spp	melitensis		Hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-357	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-358	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-359	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-367	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	
BRSO-2022-368	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	ALGERIE	
BRSO-2022-371	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		
BRSO-2022-373	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Proximité élevage de moutons
BRSO-2022-374	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Proximité élevage de moutons
BRSO-2022-375	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de viande peu cuite (mouton)
BRSO-2022-376	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de viande peu cuite (mouton)
BRSO-2022-382	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	TURQUIE	
BRSO-2022-383	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	ALGERIE	
BRSO-2022-388	Brucella	Brucella spp	abortus		Souche sur biopsie		Consommation de lait cru, consommation de fromage frais au lait cru, pratique de la chasse
BRSO-2022-389	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		Consommation de lait cru, et produits à base de lait cru (origine algérienne)
BRSO-2022-390	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		Consommation de lait cru, et produits à base de lait cru (origine algérienne)
BRSO-2022-391	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture		Consommation de lait cru, et produits à base de lait cru (origine algérienne)
BRSO-2022-395	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche	CHINE	
BRSO-2022-398	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche		Consommation de fromage frais au lait cru fait au LIBAN
BRSO-2022-399	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	DJIBOUTI	
BRSO-2022-400	Brucella	Brucella spp	melitensis		Souche sur hémoculture	DJIBOUTI	

La majorité des isolats a été reçue à partir de cultures bactériennes sur milieu gélosé. Ces isolats étaient suspectés d'appartenir au genre *Brucella* et étaient adressés au CNR pour confirmation. La plupart d'entre eux provenaient d'hémocultures positives. Nous avons également reçu des flacons d'hémocultures positives pour mise en culture et analyse bactériologique lorsque le laboratoire suspectait une brucellose mais n'avait pas les conditions de sécurité requises pour manipuler les cultures ou lorsqu'il avait détruit les cultures suspectes d'appartenir au genre *Brucella* pour des raisons de biosécurité. Vue la propension de *Brucella* à infecter différents organes chez l'Homme, notamment en cas d'infections subaiguës ou chroniques, nous sommes amenés à recevoir des biopsies (os, ganglion, articulation, placenta, débris utérins...) et des fluides biologiques (sang, sérum, LCR, liquides articulaires, pus...), pour la culture de ces prélèvements et la recherche de *Brucella* par des techniques moléculaires.

-Le CNR-LE a rapporté 2 cas de brucelloses avec 2 prélèvements positifs basés sur des tests moléculaires (PCR sur l'ADN isolé des prélèvements) Tableau 3.

Tableau 3. Cas de brucellose identifiées par PCR spécifique uniquement en 2022.

N° CNR	Prélèvement	Commentaire
BRSO-2022-312	Biopsie vertébrale/Abcès	Origine MAGHREB
BRSO-2022-327	Biopsie vertébrale	Voyage en TURQUIE, Spondylodiscite L3-L4

Au total, parmi les 43 patients ayant eu une brucellose, 41 étaient des cas importés. Pour les deux cas autochtones en France métropolitaine, un correspondait à une réactivation d'une ancienne infection à *B. abortus*, le deuxième était basé sur un résultat sérologique et un rapport d'une identification d'une souche réalisée par un laboratoire privé (il est à noter que le laboratoire n'a pas été en mesure de nous adresser la souche pour confirmation de l'identification). Le patient était un chasseur de sanglier (possibilité de *B. suis* bv2).

Deux cas ont été signalés dans des départements/collectivités d'outre-mer. Un cas en Guadeloupe, était associé avec une consommation de fromages au lait cru venant du Liban ; le deuxième cas correspondant à une souche de *B. suis* bv1 a été identifié chez un patient de Wallis et Futuna (où *B. suis* bv1 est présent dans la population porcine).

Les autres cas ont été importés de pays endémiques (Tableau 2, Figure 1), avec une forte majoritaire des cas provenant des pays du bassin Méditerranéen, principalement le Maghreb. Sur les 43 cas, 19 présentaient des facteurs de risque connus à la brucellose (17 patients consommaient des produits à base de lait cru, un des produits locaux, et le dernier cas était un chasseur de sangliers).

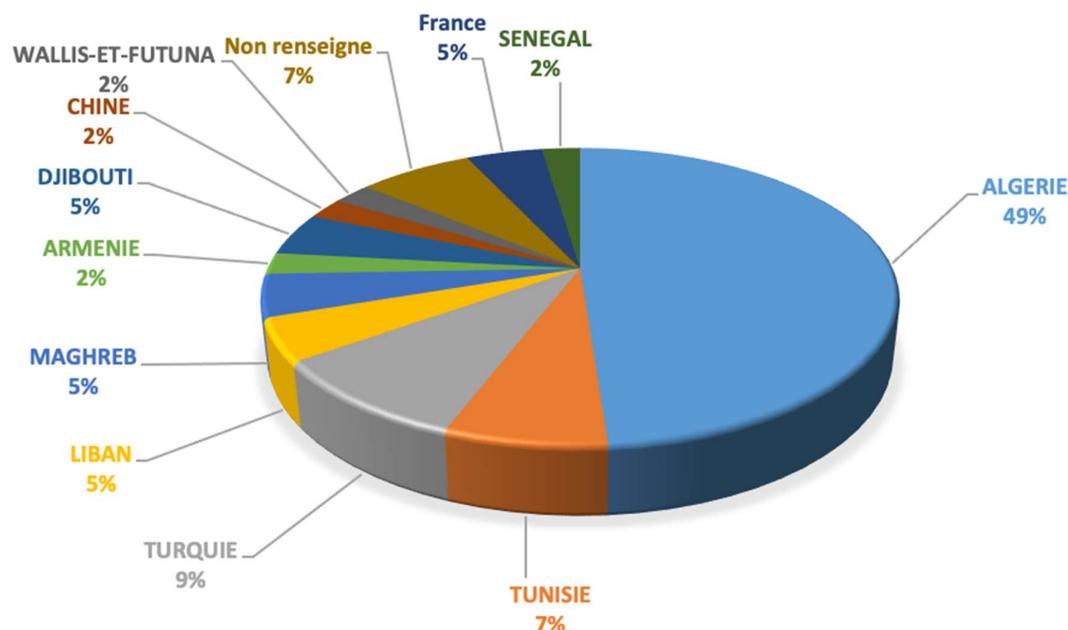


Figure 1. DOM/TOM ou pays en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France pour l'année 2022.

Méthodes de diagnostic indirectes

En 2022, le CNR-LE a analysé 344 sérums et LCR dont 20 (5.8%) étaient positifs pour la brucellose (Tableaux 4 à 9).

Parmi les 344 sérums, 284 sérums (82.6%) étaient négatifs.

Un total de 18 patients (20 sérums) 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. Pour 16 de ces patients (17 sérums), une infection aiguë active a été diagnostiquée (Tableau 4).

Pour 10 des 18 patients, les sérologies positives ont confirmé une brucellose diagnostiquée par l'isolement d'une souche de *Brucella* concomitamment chez le patient (Tableau 5).

Six patients avaient une brucellose suspectée uniquement par le résultat de la sérologie (Tableau 6).

Pour deux patients, le dossier clinique était en faveur d'une brucellose ancienne ou chronique (situation clinique difficilement diagnosticable par la sérologie) (Tableau 7).

Enfin, un patient avait des résultats sérologiques négatifs, alors qu'un test PCR positif avait été obtenu. Un suivi sérologique a été demandé chez ce patient, mais aucun échantillon supplémentaire n'a été adressé au CNR.

Tableau 4. Sérologies positives confirmant un diagnostic de brucellose humaine en France en 2022.

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2022-1949	1/8e	1/640	titre 960	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-1959	1/8e	1/320	titre 480	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-1961	1/2e	1/160	titre 240	Positif	Négatif	1/1280e
BRU-2022-1980	>1/32	1/1280	titre 1920	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-2017	1/8e	1/160	titre 240	Positif	Négatif	1/1280
BRU-2022-2032	1/8e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2043	1/16e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2058	1/32e	1/2560e	titre 3840	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-2101	1/4e	NON FAIT	/	Positif	Positif	1/1280e
BRU-2022-2115	1/16e	NON FAIT	/	Négatif	Positif	1/2560e
BRU-2022-2126	1/4e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2022-2134	1/4e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/1280e
BRU-2022-2200	1/2e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/640
BRU-2022-2258	1/16e	1/640e	titre 960	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2259	1/8e	1/640e	titre 960	Positif	Positif	1/2560e
BRU-2022-2262	1/2e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/1280e
BRU-2022-2270	1/16e	1/640e	titre 960	Négatif	Positif	1/5120e

NB: Les numéros BRU-2022-1959 et BRU-2022-1961 correspondent au même patient.

Tableau 5. Résultats de sérologies pour les cas de brucellose humaine avec isolement de *Brucella* par méthode directe durant l'année 2022.

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2022-1980	> 1/32	1/1280	titre 1920	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-2017	1/8e	1/160	titre 240	Positif	Négatif	1/1280
BRU-2022-2032	1/8e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2043	1/16e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2058	1/32e	1/2560e	titre 3840	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-2101	1/4e	NON FAIT	/	Positif	Positif	1/1280e
BRU-2022-2126	1/4e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2022-2134	1/4e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/1280e
BRU-2022-2200	1/2e	1/160e	titre 240	Positif	Positif	1/640
BRU-2022-2262	1/2e	1/320e	titre 480	Négatif	Positif	1/1280e

Tableau 6. Cas de brucellose confirmés par sérologies uniquement durant l'année 2022.

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2022-1949	1/8e	1/640	titre 960	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-1959	1/8e	1/320	titre 480	Positif	Négatif	1/5120e
BRU-2022-2115	1/16e	NON FAIT	/	Négatif	Positif	1/2560e
BRU-2022-2258	1/16e	1/640e	titre 960	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2022-2259	1/8e	1/640e	titre 960	Positif	Positif	1/2560e
BRU-2022-2270	1/16e	1/640e	titre 960	Négatif	Positif	1/5120e

Tableau 7. Résultats des sérologies pour les cas de brucellose chronique ancienne durant l'année 2022.

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2022-2104	1/2e	NON FAIT	/	Négatif	Positif	1/640
BRU-2022-2027	1/16e	1/320	titre 480	Négatif	Douteux	1/5120e
BRU-2022-2158	1/4e	1/40e	titre 60	Négatif	Négatif	1/320e

NB: Les numéros BRU-2022-2104 et BRU-2022-2158 correspondent au même patient.

Finalement, 36 sérologies (10.5%), issues de 35 patients, ont été considérées comme faussement positives du fait de réactions croisées, très fréquentes avec ces sérologies, et d'un tableau épidémiologique ne correspondant pas du tout avec une brucellose (Tableau 8). Enfin, pour six patients, les résultats sérologiques ne permettaient aucune conclusion sur la présomption d'une brucellose (cas douteux) (Tableau 9).

Tableau 8. Résultats des sérologies correspondant à des fausses-positivités durant l'année 2022.

No CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2022-1964	Pur	1/160	titre 240	Négatif	Négatif	1/320
BRU2022-1968	Pur	1/80	titre 120	Négatif	Négatif	1/320
BRU2022-1982	1/2	1/80	titre 120	Négatif	Négatif	1/320
BRU2022-1984	1/16	1/640	titre 960	Négatif	Négatif	1/5120E
BRU2022-1988	Pur	1/40	titre 60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-1990	1/2	1/160	titre 240	Positif	Négatif	1/640
BRU2022-1994	1/4	Négatif		Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2012	1/2	1/40	titre 60	Douteux	Négatif	1/320
BRU2022-2013	Pur	1/80	titre 120	Douteux	Négatif	1/320
BRU2022-2014	Pur	1/320	titre 480	Négatif	Négatif	1/1280
BRU2022-2024	Négatif	1/160	titre 240	douteux	Négatif	Négatif
BRU2022-2025	Négatif	1/160	titre 240	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2026	Négatif	1/40	titre 60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2027	1/16	1/320	titre 480	Négatif	Douteux	1/5120E
BRU2022-2028	Négatif	Négatif		Négatif	Positif	Négatif
BRU2022-2040	Négatif	1/40	titre 60	Négatif	Douteux	Négatif
BRU2022-2042	1/4	1/160	titre 240	Négatif	Négatif	1/1280
BRU2022-2063	Pur	1/80	titre 120	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2065	Pur	1/40	titre 60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2080	Négatif	1/320	titre 480	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2097	1/16			Douteux	Négatif	1/1280
BRU2022-2105	1/8			Douteux	Douteux	1/1280
BRU2022-2110	1/4			Douteux	Négatif	1/640
BRU2022-2112	Négatif			Négatif	Positif	Négatif
BRU2022-2154	Négatif	1/20	titre 30	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2186	Négatif	1/40	titre 60	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2022-2212	Négatif	1/320	titre 480	Positif	Négatif	Négatif
BRU2022-2217	Négatif	1/40	titre 60	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2022-2221	Négatif	Négatif		Douteux	Négatif	Négatif
BRU2022-2225	1/2	1/160	titre 240	Négatif	Positif	1/1280
BRU2022-2226	Négatif	Négatif		Douteux	Négatif	Négatif
BRU2022-2229	1/2	1/160	titre 240	Positif	Douteux	1/320
BRU2022-2249	Négatif	Négatif		Négatif	Douteux	Négatif
BRU2022-2251	1/2	1/160	titre 240	Positif	Négatif	1/640
BRU2022-2253	Négatif	1/80	titre 120	Douteux	Négatif	1/320
BRU2022-2261	1/2	Négatif		Négatif	Négatif	Négatif

Tableau 9. Résultats des sérologies douteuses sans possibilité de conclusion durant l'année 2022.

N° CNR	EAT	SAW	IU	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2022-1978	1/4e	1/320	titre 480	Positif	Négatif	1/1280e
BRU-2022-1979	1/4e	1/320	titre 480	Positif	Négatif	1/1280e
BRU-2022-2105	1/8e	NON FAIT	/	Douteux	Douteux	1/1280e
BRU-2022-2110	1/4e	NON FAIT	/	Douteux	Négatif	1/640e
BRU-2022-2196	1/2e	1/160e	titre 240	Positif	Négatif	1/320e
BRU-2022-2225	1/2e	1/160e	titre 240	Négatif	Positif	1/1280e

Activités de séquençage

Le CNR *Brucella* n'a pas d'activité de séquençage génomique en routine à proprement parlé. Les apports du séquençage sont négligeables pour le diagnostic et la prise en charge de la brucellose humaine. Nous avons cessé d'utiliser le séquençage de l'ARNr 16S comme outil de diagnostic en raison de son manque de sensibilité et de spécificité pour *Brucella*. Le nouveau décret du 26 avril 2023 fixant la liste des MOT facilitera grandement le séquençage des génomes de *Brucella* (notre plateforme de séquençage n'ayant pas d'autorisation MOT). Cela nous permettra de séquencer davantage d'isolats cliniques.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

<input type="checkbox"/>	NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/>	* OUI	Plateforme MICRO&BIO, Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière, CHU de Nîmes avec un MiSeq (Illumina) et depuis 2023, un MinIon (Oxford Nanopore).

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

<input type="checkbox"/>	NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/>	* OUI	Plateforme MICRO&BIO, Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière, CHU de Nîmes avec un Ingénieur de Recherche (Dr Madjid Morsli) en bioinformatique. Des collaborations internationales sont également réalisées. Outils informatiques : EpiSeq® (BioMérieux), CLC Genomics Workbench 22.0.2 (Qiagen), SPAdes v3.10.0, CONTIGuator, Genbank database, Easyfig, BLAST Ring Image Generator, PlasmidFinder 2.0, DNAPlotter software, JSpecies WS, Orthofinder v2.2.7, FigTree v1.4.4, PATRIC, PHASTER, ...

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON , est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Nous utilisons le WGS pour caractériser des souches inhabituelles, en particulier les deux isolats de <i>B. amazoniensis</i> de Guyane.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Les différentes analyses utilisées en complément des techniques de spectrométrie de masse et de biologie moléculaire (PCR spécifique et BRUCE-LADDER) sont : les analyses in silico MLST et MLVA, wgMLST, WG SNP, et des analyses phylogénétiques pour *B. amazoniensis*. Ces analyses étant réalisées majoritairement à des fins épidémiologiques.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Non applicable. *Brucella* n'est pas épidémique en France.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Oui, à des fins de surveillance de mécanismes de résistance.

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Les séquençages réalisés par le CNR sont déposés sur la plateforme GenBank (NCBI).

Partage de séquences produites par les CNR

Les séquençages réalisés par la plateforme MICRO&BIO du CHU de Nîmes pour le CNR sont déposés sur le site GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3. Activités de surveillance

Aucun cas n'a été associé à un foyer potentiel en France métropolitaine.

Aucune souche de *Brucella* résistante aux principaux antibiotiques utilisés classiquement pour traiter cette infection n'a été identifiée.

En 2022, 43 cas ont été recensés dont 41 en France métropolitaine. Le majorité de ces cas (39/41) correspondent à des cas importés. Les deux cas autochtones étaient une réactivation d'une ancienne infection à *B. abortus* et une probable contamination d'un chasseur de sanglier. Les deux cas outre-marins concernaient un patient en Guadeloupe ayant consommé des fromages au lait cru provenant du Liban, et un patient infecté par *B. suis* bv1 à Wallis et Futuna (où il existe des foyers de brucellose porcine à *B. suis* bv1).

Deux nouveaux cas de brucellose ont été identifiés en Guyane (CH Cayenne), dus à une nouvelle espèce de *Brucella*, *B. amazoniensis*. Une étude rétrospective a permis d'identifier 5 autres cas humains identiques : 4 au Texas et 1 dans le nord du Brésil (données non publiées à ce jour). Cette espèce est similaire à une autre espèce récemment décrite, *B. nosferati*, isolée à partir de chauves-souris vampires au Costa Rica.

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 autres prélèvements et demander des conseils diagnostiques ou thérapeutiques. De plus, le site internet du CNR (www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/cnr-brucella.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. Nous pouvons donc considérer que le réseau de surveillance est quasi-exhaustif sur le territoire national.

Par ailleurs, nous avons établi un partenariat avec différents CHU (APHP, CHU Tours, CHU Bordeaux) pour la réalisation des analyses sérologiques des brucelloses. Ce type de partenariat va s'étendre à d'autres structures. De plus, une collaboration avec le laboratoire CERBA a été mise en place depuis fin 2022. Elle nous permettra de recevoir l'ensemble des sérums douteux ou positifs identifiés en France (env. 200 sérums par an). Nous souhaitons également initier une telle collaboration avec le laboratoire BIOMNIS EUROFINS. L'objectif est d'obtenir une exhaustivité sur les déclarations de brucellose en France et de pouvoir vérifier le diagnostic posé (surtout sérologique). Enfin, une collaboration avec l'Outre-Mer (CH de Cayenne en Guyane) été signée en 2022 pour évaluer l'importance de la brucellose dans ce département d'outre-mer dont nous venons d'identifier les premiers cas avec notamment une nouvelle espèce, *B. amazoniensis* (voir Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR).

Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Non applicable, la brucellose ne concerne que majoritairement des cas importés et les caractéristiques cliniques recueillies sont très classiques suivant la littérature sur cette pathologie.

Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

La résistance aux antibiotiques chez *Brucella* est extrêmement rare et ne constitue pas un problème pour le traitement des patients. Aucune étude de sensibilité in vitro aux antibiotiques n'est à réaliser dans les laboratoires de microbiologie en France en raison de l'absence de résistance acquise rapportée à ce jour pour les traitements recommandés pour la brucellose (seuls quelques cas exceptionnels décrits dans la littérature) et des difficultés d'interprétation des antibiogrammes (proposition de seuils d'interprétation spécifiques pour *Brucella* définis par l'EUCAST en 2023). Nous ne recommandons ni n'encourageons les laboratoires à effectuer ce type de tests. Il s'agit d'un risque majeur d'infection acquise en laboratoire.

Au sein du laboratoire, annuellement, nous réalisons des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de type Mueller Hinton au sang (MH-F). Les disques d'antibiotiques utilisés sont : doxycycline (disque de 30µg), minocycline (30µg), rifampicine (5µg), gentamicine (10µg), amikacine (30µg), céfotaxime (5µg), ceftriaxone (30µg), imipénème (10µg), sulfaméthoxazole/triméthoprime (1.25/23.75µg), ofloxacine (5µg), ciprofloxacine (5µg), lévofloxacine (5µg), et moxifloxacine (5µg). Ces analyses nous permettent une surveillance de la sensibilité des isolats identifiés en France.

En 2022, aucune souche résistante a été identifiée.

Par ailleurs, nous avons comparé la résistance aux antibiotiques des deux isolats de *B. amazoniensis* avec celle de la souche de référence, *B. melitensis* 16M. Les deux isolats étaient totalement sensibles aux antibiotiques testés (Tableau 10).

Tableau 10. Résultats des antibiogrammes réalisés sur les souches de *B. amazoniensis* en comparaison avec la souche de référence *B. melitensis* 16M.

	RIFACINS	TETRACYCLINS	AMINOGLYCOSIDES		DIAMINOPYRIMIDINE + SULFAMIDE	FLUOROQUINOLONES		β-LACTAMS	
	Rifampicin (RIF5)	Tetracyclin (TET30)	Gentamycin (GM30)	Amikacin (AKN30)	Triméthoprime + Sulfaméthoxazole (SXT25)	Ciprofloxacine (CIP5)	Ofloxacine (OFX5)	Ampicilline (AMP10)	Amoxicilline + Clavulanate (AMC30)
<i>Brucella</i> strain	cut-off: ≥ 18	cut-off: ≥ 15	cut-off: ≥ 17	cut-off: ≥ 16	cut-off: ≥ 14	cut-off: ≥ 24	cut-off: ≥ 22	cut-off: ≥ 15	cut-off: ≥ 19
<i>B. melitensis</i> strain 16M	32	40	30	26	42	32	26	24	38
BRSO-2020-213	28	46	30	26	54	32	30	32	46
BRSO-2021-230	24	46	28	26	48	44	30	36	52

Les valeurs présentées correspondent à des diamètres d'inhibition en mm.

Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Nous continuerons notre collaboration étroite avec le LNR des brucelloses (Maison Alfort) et les principaux acteurs de la surveillance et du contrôle de la brucellose humaine et animale au niveau international (Europe, Etats-Unis, Amérique du Sud, Asie).

Comme indiqué précédemment, nous offrons un soutien aux laboratoires d'analyses médicales, publics et privés, en France pour le diagnostic de la brucellose, la gestion de potentielle contamination de personnels et aux cliniciens pour la prise en charge de leurs patients.

Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Brucellose en Guyane française : investigations sur une nouvelle situation épidémiologique autour de l'Amérique centrale

En collaboration avec des praticiens hospitaliers du CH de Cayenne (Guyane française), le CNR *Brucella* a récemment décrit les 3 premiers cas de brucellose humaine dans ce département d'Outre-Mer [1,2]. Situé sur la côte nord-est de l'Amérique du Sud, il s'étend sur 84 000 km² et compte environ 300 000 habitants. Séparé du Suriname par le fleuve Maroni à l'Ouest et du Brésil par le fleuve Oyapock à l'Est, son territoire est couvert à 95% par la forêt amazonienne. L'extraction illégale d'or est une pratique croissante sur ce territoire, principalement dans les régions profondes de la forêt. Elle est pratiquée majoritairement par des immigrés clandestins en provenance du Brésil. Cette population vulnérable est soumise à un risque élevé d'exposition aux pathogènes zoonotiques.

Les 3 patients atteints de brucellose en Guyane avaient en commun d'être orpailleurs clandestins, et leur histoire suggère qu'ils avaient contracté cette infection sur le territoire Français. Nous avons, par ailleurs, découvert que certains étaient porteurs d'une nouvelle espèce de *Brucella* (nommée *B. amazoniensis* [2]) dont le réservoir animal reste à identifier. Des comparaisons génétiques ont aussi révélé que d'autres anciens cas humains avaient également été causés par *B. amazoniensis* : 4 au Texas et 1 dans le Nord du Brésil (données non publiées).

Sur la même période, une équipe de chercheurs Costa-Ricains a découvert une autre nouvelle espèce de *Brucella* (nommée *B. nosferati*) isolée chez des chauves-souris vampire au Sud du pays [3]. La détection de bactéries dans les glandes salivaires de ces animaux représente un risque élevé de transmission à ses proies (dont l'Homme). Nous nous étions donc rapprochés de nos homologues pour comparer les séquences de *B. amazoniensis* et de *B. nosferati*. Ceci a révélé que les deux espèces sont génétiquement très proches mais distinctes, ce qui suppose l'existence d'un hôte intermédiaire.

4. Alertes

Cette contribution ne fait pas partie des attributions du CNR-LE.

Cependant, toute confirmation ou tout diagnostic d'un cas de brucellose dans notre CNR a fait et fera l'objet d'un signalement à Santé Publique France permettant d'assurer la diffusion de l'alerte et de l'information si nécessaire.

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 depuis 2015, 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.

Aucun événement ayant nécessité une analyse par la CNR n'est survenu en France métropolitaine.

Nous avons enquêté sur deux cas de brucellose chez des orpailleurs clandestins en Guyane. L'analyse des souches a montré qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce de *Brucella*. Ces souches sont également apparentées à une autre série de souches récemment identifiées chez des chauves-souris vampires en Amérique centrale. Nous travaillons avec les autorités sanitaires et vétérinaires locales pour déterminer l'incidence de la brucellose humaine dans le département et identifier les éventuels réservoirs animaux.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le CNR-LE a une activité importante de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant la prévention, le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Environ 300 appels téléphoniques sont reçus par an. La prise en charge des personnels de laboratoire exposés à une brucellose est devenue la principale source d'appel téléphonique. Les numéros de portable du Pr Lavigne et du Dr O'Callaghan sont à la disposition de tous les centres permettant une prise en charge la plus efficace et précoce possible.

Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2022, le Dr O'Callaghan et le Pr Lavigne ont participé au groupe de travail mis en place par le Haut Conseil de la Santé Publique pour donner un avis relatif à la conduite à tenir vis-à-vis de personnes exposées à des animaux contaminés par *B. canis*. Ils ont également révisé la fiche Brucellose de la base de données EFICAT « Exposition fortuite à un agent infectieux et conduite à tenir en milieu de travail » proposée par le Département d'Études et Assistance Médicales de l'INRS. Enfin, le Pr Lavigne a écrit le chapitre *Brucella* spp. pour la 7^{ème} version du référentiel en microbiologie médicale (REMIC 7).

En septembre 2022, lors du congrès international sur la brucellose, le Dr O'Callaghan a participé à l'organisation et l'animation de deux workshops. Le premier avait pour but de valider le 'Stepwise Approach for the Progressive Control of Brucellosis (SAPCB) as a One Health resource to assist countries in preventing, controlling, and eliminating brucellosis in people and animals' développé par le Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), et le U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Le deuxième avait pour objectif de discuter le 'Brucellosis Vaccine Prize' mis en place par le Global Alliance for Livestock Veterinary Medicines (GALVmed) et son rôle dans le contrôle de la brucellose caprine et, par conséquent, humaine.

Enfin, le Pr Lavigne a participé au lancement d'un Groupe de Suivi (GS) de la Brucellose en lien avec la Plateforme ESA (Epidémiosurveillance Santé Animale) élargi au secteur de la santé humaine.

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

Une information sur France Info a été récemment réalisée sur la découverte de *B. amazoniensis* en Guyane. Un article récapitulatif est disponible sur le lien : <https://la1ere.francetvinfo.fr/guyane/une-nouvelle-bacterie-decouverte-en-guyane-annonce-la-lettre-recherche-du-centre-hospitalier-de-cayenne-1380546.html>.

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

La brucellose en Guyane

Le CNR *Brucella* est promoteur de plusieurs projets visant à explorer la présence et les liens entre deux pathogènes émergents : *B. amazoniensis* et *B. nosferati*. Ils s'inscrivent dans une démarche globale visant à améliorer la compréhension, la gestion et la prise en charge de la brucellose dans cette région du monde. Comme pour les autres zoonoses, une approche One Health, impliquant professionnels de la santé, scientifiques, vétérinaires et agents de terrain, sera indispensable.

1) **Santé humaine** : Le premier volet est d'évaluer la séroprévalence de la brucellose chez les habitants de Guyane française. Cette approche, qui est déjà initiée, se fera de façon transversale et rétrospective sur plusieurs collections de sérums déjà collectées chez différentes populations:

- pour le projet BRUCeORP : chez des orpailleurs du plateau Amazonien, dans le cadre de deux études (ORPAL-2 et ORPAL-3) promues par le Centre Hospitalier de Cayenne et dont les recueils d'échantillons ont été réalisés en 2019 et 2022, respectivement ;

- pour le projet BRUCeGUY : chez des volontaires tout venant de la population générale (sur tout le territoire de Guyane) dans le cadre de l'étude EpiCovid, promue par l'Institut Pasteur de la Guyane et dont le recueil d'échantillons est terminé depuis 2021.

La séropositivité sera établie à l'aide de quatre tests : l'agglutination au Rose Bengale (ou épreuve de l'antigène tamponné, EAT), la microagglutination par la technique BrucellaCapt® et deux tests ELISA permettant les dosages d'IgM et IgG, à l'aide des kits commerciaux utilisés en routine au CNR.

Ces études indiqueront si des populations autochtones de Guyane sont également exposées à cette zoonose. Elles pourraient également permettre de circonscrire une zone où la transmission zoonotique peut avoir lieu.

2) **Réservoir animal** : L'identification du réservoir animal de *B. amazoniensis* est essentielle. Notre hypothèse de travail est que ce réservoir est présent au sein de la faune sauvage de la forêt amazonienne. La découverte de *B. nosferati*, qui est génétiquement proche de *B. amazoniensis*, chez des chauves-souris vampires au Costa Rica, incite à considérer ces chiroptères comme potentiel transmetteur en Guyane française. La transmission à l'Homme pourrait être soit directe, soit par un hôte intermédiaire qui pourrait être un mammifère que les orpailleurs clandestins déclarent chasser.

Le second volet vise donc à identifier des animaux exposés à *Brucella* au sein de la faune de Guyane française. Pour cela, le projet BAMAR vient d'être lancé, en collaboration avec l'Institut Pasteur de la Guyane, le zoo de Guyane et le Parc Amazonien de Guyane. Il consistera à cribler plusieurs échantillothèques déjà disponibles, notamment la collection JAGUARS (Joindre l'Amazonie et la Guyane : Animaux, Ressources et Sciences). Les échantillons positifs seront soumis à des analyses poussées pour déterminer s'ils contiennent l'espèce *B. amazoniensis* ou *B. nosferati*. Le but est de découvrir l'animal qui pourrait jouer un rôle de réservoir pour la brucellose

humaine à *B. amazoniensis*. Ce projet exploratoire a reçu un soutien financier du Centre d'Etude de la Biodiversité Amazonienne (CEBA).

3) **Nouvel outil de détection** : Nous souhaitons mettre au point une technique de détection rapide des *Brucella* basée sur l'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP). La LAMP est une nouvelle méthode d'amplification de séquences d'ADN cibles à température constante, grâce à 4 à 6 amorces et la Bst, une polymérase capable d'ouvrir la double hélice d'ADN [7]. Elle est aussi sensible qu'une PCR en temps réel, mais elle est beaucoup plus simple, rapide et abordable. Son principal avantage est qu'elle ne nécessite pas de thermocycleur ni d'équipement d'imagerie sur gel. Ainsi, la réaction peut être effectuée en moins d'une heure à l'aide d'un simple bloc chauffant. Elle est donc déployable pour des études sur le terrain.

Survie de *Brucella* dans les produits laitiers

L'éradication de la brucellose animale est l'approche clé pour réduire les infections humaines. Dans les pays endémiques, cette éradication passe par la vaccination du bétail. Les vaccins actuels peuvent se retrouver dans le lait, qui est une source d'infections humaines. Nous étudions la base génétique de la survie de *Brucella* dans le lait et les produits laitiers, avec pour objectif final de produire des souches vaccinales plus sûres.

Nouveau traitement pour la brucellose

Nous continuons notre étude sur le mécanisme d'action du Géfitinib (inhibiteur de la tyrosine kinase ciblant EGFR) avec des expériences en modèle souris en collaboration avec le Dr Renée Tsois (UC Davis, USA) et des analyses sur les effets de cette molécule sur les voies de signalisation lors de l'infection par *Brucella*.

Étude de la virulence de *Brucella*.

Nous avons continué nos études sur la virulence de *Brucella* au sein de l'unité VBIC (INSERM U1047). *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.

* **Systemes de Sécrétion.** 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) (Riquelme et al., 2023).

* **Survie et multiplication dans les cellules placentaires humaines.** Nous étudions, par ailleurs, l'importance de différents facteurs de l'hôte dans la vie intracellulaire des *Brucella*. En outre, 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.

Une thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier sur les thématiques du CNR a été soutenues en 2022:

Sonia Vection – “Infection des cellules placentaires par *Brucella* : Rôle de la protéine multifonctionnelle CD98hc.”

Publications Internationales

Pereira CR, Kato RB, Araújo FA, da Silva AL, dos Santos RG, de Jesus Sousa T, Neia RC, da Silva SB, Williamson CHD, Gillece J, Lage AP, O'Callaghan D, Pickard DJ, Ramos RTJ, de Carvalho Azevedo VA, Foster JT, Dorneles EMS. Genomic investigation of antimicrobial resistance in *Brucella abortus* strains isolated from cattle in Brazil. *Gene Reports* 2023; 31, 101777.

Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, Foster JT, Oliveira ICR, Filho JSSB, Lage AP, Azevedo VAC, Dorneles EMS. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Immuno Method*, in press.

Melzani A, Boutrou M, Sainte-Rose V, About F, Douine M, Michaud C, Nacher M, Gaillet M, Blanchet D, Lavigne JP, Demar M, O'Callaghan D, Djossou F, Keriel A, Epelboin L. Case Report: Acute Brucellosis Due to *Brucella suis* in a Brazilian Gold Miner Diagnosed in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2023 May 30:tpmd220228. doi: 10.4269/ajtmh.22-0228. Epub ahead of print. PMID: 37253440.

About F, Pastre T, Boutrou M, Martinez AY, Melzani A, Peugny S, Michaud C, Zouaoui S, Carage T, Rose VS, Demar M, Lavigne JP, Djossou F, O'Callaghan D, Epelboin L, Keriel A. Novel Species of *Brucella* Causing Human Brucellosis, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2023 Feb;29(2):333-340. doi: 10.3201/eid2902.220725. PMID: 36692350; PMCID: PMC9881788.

Riquelme E, Omarova S, Ize B, O'Callaghan D. Analysis of the *Brucella suis* Twin Arginine Translocation System and Its Substrates Shows That It Is Essential for Viability. *Infect Immun.* 2023 Jan 24;91(1):e0045922. doi: 10.1128/iai.00459-22. Epub 2022 Nov 30. PMID: 36448838;

Pereira CR, de Jesus Sousa T, Lima da Silva A, Gonçalves Dos Santos R, Minharro S, Costa Custódio DA, Pickard DJ, O'Callaghan D, Foster JT, de Castro Soares S, Juca Ramos RT, Góes-Neto A, Matiuzzi da Costa M, Lage AP, Azevedo V, Seles Dorneles EM. First report and whole-genome sequencing of *Pseudochrobactrum saccharolyticum* in Latin America. *Microbes Infect.* 2023 Jan-Feb;25(1-2):105018. doi: 10.1016/j.micinf.2022.105018. Epub 2022 Aug 5. PMID: 35940401.

Vection S, O'Callaghan D, Keriel A. CD98hc in host-pathogen interactions: roles of the multifunctional host protein during infections. *FEMS Microbiol Rev.* 2022 Sep 2;46(5):fuac023. doi: 10.1093/femsre/fuac023. PMID: 35595511.

Communication Nationale

Fernandez A., Vection S., O'Callaghan D., Keriel A

Poster: How does Gefitinib inhibits *Brucella* infections?
Journées Infectiopole 2022, Marseille

Communications Internationales

About F, Pastre T, Boutrou M, Melzani A, Yahiaoui Martinez A, Lavigne J-P, O'Callaghan D, Epelboin L. and Keriel A.

Brucellosis on the Guiana Shield: emergence of a new *Brucella* species
Brucellosis 2022 International Research Conference, Guilianova-Teramo, Italy.

Fernandez A., Vection S., O'Callaghan D., Keriel A

Poster: How does Gefitinib inhibits *Brucella* infections?
Brucellosis 2022 International Research Conference, Guilianova-Teramo, Italy.

Conférence internationale sur invitation

O'Callaghan D. Keynote Presentation: The ever expanding *Brucella* genus.
Brucellosis 2022 International Research Conference, Guilianova-Teramo, Italy.
Conference Internationals

Conférence nationale sur invitation

Lavigne JP. Actualités sur la brucellose. MICROBES 2022 17^{ème} Congrès nationale de la SFM, Montpellier.

Webinar REMICS SFM

Lavigne JP. Où en sommes-nous de la brucellose en France en 2022 ? Le REMIC's (Webinar de la SFM) – 12 Mai 2022 - <https://www.sfm-microbiologie.org/replay-le-remics-brucella/>

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, 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 à la surveillance et au contrôle de la brucellose humaine et animale. Tous les cas de brucellose humaine avec un lien possible avec des animaux en France sont ainsi déclarés au LNR.

Nous travaillons actuellement avec le LNR et la DGA pour caractériser *B. amazonensis*, la nouvelle espèce identifiée en Guyane, et pour développer de nouveaux tests de diagnostic.

Nous travaillons avec le CH de Cayenne, l'Institut Pasteur de la Guyane, le zoo de Guyane et le Parc Amazonien de Guyane pour étudier l'incidence de la brucellose humaine en Guyane et pour identifier les réservoirs animaux de *B. amazonensis*.

Enfin, le Pr Lavigne fait partie du Groupe de Suivi (GS) de la brucellose en lien avec la Plateforme ESA (Epidémiosurveillance de la Santé Animale). Ce groupe reconstitué en 2022 a élargi son champ d'activité à l'ensemble de ces valences en incluant le secteur de la santé humaine. Les objectifs du groupe pour les années à venir sont :

- Améliorer l'efficacité de la surveillance événementielle chez les ruminants.
- Établir la stratégie de surveillance la plus efficace sur le volet domestique et le volet sauvage (synergie entre les différents dispositifs existants).
- Sensibiliser la filière canine peu soumise aux contrôles officiels hormis dans le cadre du bien-être animal, produire des recommandations à l'attention des vétérinaires, des éleveurs et des particuliers pour la prévention de l'aspect zoonotique et créer une communication à l'attention du grand public.
- Proposer la stratégie d'analyses de laboratoire la plus efficace (quel test pour quelle espèce dans quel contexte).
- Assurer une valorisation des résultats de la surveillance pour en améliorer son efficacité.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

- **Le réseau de partenaires (cliniciens, laboratoires de biologie médicale) au niveau national :**

Nous continuerons à renforcer nos interactions avec le LNR et les principaux acteurs de la surveillance et du contrôle de la brucellose humaine et animale au niveau international (Europe, Etats-Unis, Amérique du Sud, Asie). Par ailleurs, nous avons établi un partenariat avec différents CHU (APHP, CHU Tours, CHU Bordeaux) pour la réalisation des analyses sérologiques des brucelloses. Ce type de partenariat va s'étendre à d'autres structures. De plus, une collaboration avec le laboratoire CERBA est en cours de rédaction et devrait être mise en place en 2023. Elle nous permettra de recevoir l'ensemble des sérums douteux ou positifs identifiés en France (env. 200 sérums par an). Nous souhaitons également initier une telle collaboration avec le laboratoire BIOMNIS EUROFINIS. Des discussions ont eu lieu en ce sens. L'objectif est d'obtenir une exhaustivité sur les déclarations de brucellose en France et de pouvoir vérifier les diagnostics posés (notamment par la sérologie). Enfin, une collaboration avec l'Outre-Mer (CH de Cayenne, Guyane) vient d'être signée en 2022 pour évaluer l'importance de la brucellose dans ce Département dont nous venons d'identifier les premiers cas avec notamment une nouvelle espèce, *B. amazoniensis*.

- **Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents :**

En collaboration avec le LNR, nous allons développer des protocoles de PCR HRM (High Resolution Melt) ou à courbe de fusion à haute-résolution permettant de distinguer des amplicons variant d'un minimum d'une base. Cette technique aura pour but d'identifier les espèces de *Brucella* atypiques et récemment découvertes. Nous mettons en place également une nouvelle technique basée sur la technologie de type LAMP pour la détection de *Brucella*.

- **Le mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections :**

Notre collection de souches est conservée dans un congélateur à -80°C dans notre laboratoire NSB3 au sein de l'unité VBIC accréditée pour détenir des MOTs. La mise à disposition de ces souches de collection ou des échantillons d'ADN est possible sur les bases de collaborations et en fonction de l'intérêt scientifique du projet. Toutefois, cette mise à disposition est extrêmement compliquée et coûteuse en raison de la réglementation des MOT en France, et des réglementations similaires dans de nombreux pays (comme par exemple Select Agent aux États-Unis).

La sérothèque du CNR-LE est conservée au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes. La mise à disposition des sérums à des fins de recherche scientifique, notamment pour l'amélioration des outils de diagnostic est possible sur les bases de collaborations et en fonction de l'intérêt scientifique du projet.

- **Les travaux d'évaluations de techniques vers d'autres laboratoires :**

Notre projet de tester le Fluorescence Polarisation Assay (FPA) commercialisé par EllieLab (Germantown, WI, USA) a été mis en attente en raison de l'indisponibilité des techniciens de EllieLab. Ce test rapide, en un seul tube, permet la détection d'anticorps dans l'échantillon. Il a été utilisé avec beaucoup de succès pour la brucellose bovine. Nous avons repris contact avec le Dr Miladin Kostovic (EllieLab ; <https://ellielab.com/>) qui nous a demandé de l'aider à améliorer un test FPA qu'ils avaient développé pour le diagnostic humain. Cette équipe nous a également proposé de valider un nouvel OPS iELISA.

▪ **Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR :**

-Détermination de la prévalence de la brucellose en Guyane. La découverte d'une nouvelle espèce de *Brucella* chez deux patients travaillant dans la forêt amazonienne de Guyane suggère que la brucellose pourrait être une maladie négligée et sous-diagnostiquée dans cette région. Le CHU de Nîmes (Dr Keriél, Pr Lavigne) ont établi une collaboration scientifique avec le CH de Cayenne (Dr Maylis Douine) dans un projet d'évaluation rétrospective de la séroprévalence de la brucellose dans une population d'orpailleurs.

-Détermination du réservoir animal de la brucellose en Guyane. Suivant le partenariat établi ci-avant, nous allons travailler avec le LNR *Brucella* (Maison-Alfort) et les autorités vétérinaires locales pour tenter d'identifier ce réservoir de cette nouvelle espèce de *Brucella* (dans le respect du protocole de Nagoya).

-Recherche fondamentale sur la virulence de *Brucella*. Ces travaux menés depuis des années au sein de notre unité VBIC vont se poursuivre afin de mieux comprendre la virulence de cette bactérie, son rôle dans les complications obstétricales et la caractérisation des nouveaux isolats et espèces.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Missions du CNR

La brucellose humaine. La brucellose est une zoonose due aux bactéries du genre *Brucella*. Maladie professionnelle et à déclaration obligatoire en France et dans de nombreux pays, elle demeure d'importance car elle est répandue dans le Monde entier. L'homme peut se contaminer soit directement par voie cutanéomuqueuse au contact d'animaux infectés (chasseurs, ou lors d'une maladie professionnelle affectant vétérinaires, agriculteurs, éleveurs, ouvriers d'abattoir,...), soit indirectement par voie digestive (consommation de lait ou de fromage) ou par inhalation de poussière ou d'aérosol de litière. Les contaminations de laboratoire représentent une des sources non négligeables d'infection. En France, la majorité des cas sont importée de pays endémiques. La brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une bactériémie non spécifique avec fièvre, permanente ou ondulante, des suees nocturnes, des myalgies et des arthralgies. En l'absence de diagnostic ou de traitement adéquat, la plupart des patients évoluent vers une phase subaiguë, avec une bactériémie intermittente et des localisations secondaires pouvant atteindre divers organes (articulations, os, foie, rate, cœur, organes génitaux, plus rarement le cerveau). Les formes chroniques se définissent par une évolution prolongée, avec ou sans découverte d'un foyer infectieux focalisé. Des rechutes sont possibles en raison de la persistance de foyers tissulaires.

Le genre *Brucella*. Le genre *Brucella* a été divisé en 12 espèces selon des caractères phénotypiques dont quatre sont pathogènes pour l'homme : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* biovar (bv) 1, 2, 3 et 4 et *B. canis* (Tableau 11). D'exceptionnels cas d'infections avec des souches de *Brucella* récemment découvertes telles que *B. ceti* ou des souches de *Brucella* atypiques (comme *B. inopinata*, *B. inopinata*-like ou *B. amazoniensis*) ont été décrits.

Diagnostic bactériologique. Le diagnostic présomptif de la brucellose chez l'homme se fait sur la base d'un tableau clinique souvent peu évocateur associé à un titre sérologique élevé ou à une séro-conversion. Du fait de la mauvaise valeur prédictive de la sérologie, en zone de faible prévalence notamment, le diagnostic de certitude nécessite, le plus souvent, l'isolement de la bactérie (à partir d'hémocultures, ou de cultures de LCR ou de biopsies lésionnelles) et son identification par spectrométrie de masse ou sa détection par méthode moléculaire dans le même type de prélèvements. L'identification complète du genre *Brucella*, des espèces et des différents biovars est difficile voire impossible en laboratoire de diagnostic de routine, du fait de la nécessité de techniques spécifiques dédiées pour la caractérisation de ces bactéries, mais aussi de la dangerosité pour le personnel technique de la manipulation de ces bactéries (qui représentent la cause la plus fréquente d'infection contractée au laboratoire de bactériologie).

Épidémiologie de la brucellose animale et humaine. La compréhension de l'épidémiologie de la brucellose animale est essentielle pour limiter les contaminations humaines. Les espèces animales les plus touchées par les pathogènes humains majeurs (*B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*) sont les ruminants et les suidés domestiques. Dans certains pays, le chien est un réservoir de *B. canis*. Les ruminants et suidés sauvages peuvent être des réservoirs de contamination des animaux domestiques.

***Brucella* non zoonotiques.** Depuis les années 1990, de nouvelles espèces de *Brucella* ont été isolées chez de nouveaux hôtes (Tableau 11). A l'exception de rares cas d'infections de mammifères marins par *Brucella*, il n'y a aucune évidence que ces espèces représentent un réel

problème de Santé humaine. Plus récemment, deux isolats atypiques ont été isolés dans des infections humaines. Ils présentaient des caractéristiques différentes des souches de *Brucella* « classiques » avec notamment une croissance de la culture rapide et, pour un des deux isolats, un antigène-O qui n'induisait pas des anticorps détectables par les tests sérologiques disponibles. Aucun réservoir de ces deux isolats n'a été identifié mais très récemment, d'autres isolats atypiques à croissance rapide ont été isolés chez des grenouilles. En 2019, nous avons identifié et décrit un premier cas d'infection humaine avec une *Brucella* atypique présente chez les grenouilles (voir bilan scientifique).

Tableau 11. Classification dans le genre *Brucella*: espèces et biovars

	Espèces	Biovars	Hôtes préférentiels	Potentiel zoonotique
Pathogènes pour l'Homme	<u><i>B. melitensis</i></u>	1-3	Caprins, Ovins	Haut
	<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Bovins	Haut
	<i>B. suis</i>	1,3,4	Porcins, Rennes	Haut
		2	Porcins, Léporidés	Faible
		5	Rongeurs sauvages Chauves-souris	Aucun
	<i>B. canis</i>		Chiens	Modéré
Pathogènes pour les animaux	<i>B. ovis</i>		Ovins	Aucun
	<i>B. neotomae</i>		Rats du désert	Rares cas
	<i>B. microti</i>		Campagnols, renards	Non rapporté
	<i>B. papionis</i>		Babouins	Non rapporté
	<i>B. ceti</i>		Cétacés	Rare
	<i>B. pinnipedialis</i>		Pinnipèdes, Dauphins	Rare
	<i>B. vulpes</i>		Renards	Non rapporté
	<i>B. amazoniensis</i>		Inconnus	3 cas (voir ci-dessus)
	<i>B. nosferatu</i>		Chauves-souris vampire	Non rapporté
Pathogènes atypiques	<i>B. inopinata</i>		Homme	1 cas, 1 isolat
	<i>B. inopinata-like</i> BO2		Homme	1 cas, 1 isolat
	NFXXX		Rongeurs sauvages	Non rapporté
	Souches de la grenouille		Grenouille	1 cas, 1 isolat
	Reptile		Caméléon	Non rapporté

La brucellose en France. L'éradication de la brucellose chez les animaux domestiques dans les années 70 et 80 a entraîné une réduction considérable de l'incidence de la maladie (< 0,1/100 000 habitants, < 50 cas déclarés par an) (Figure 2).

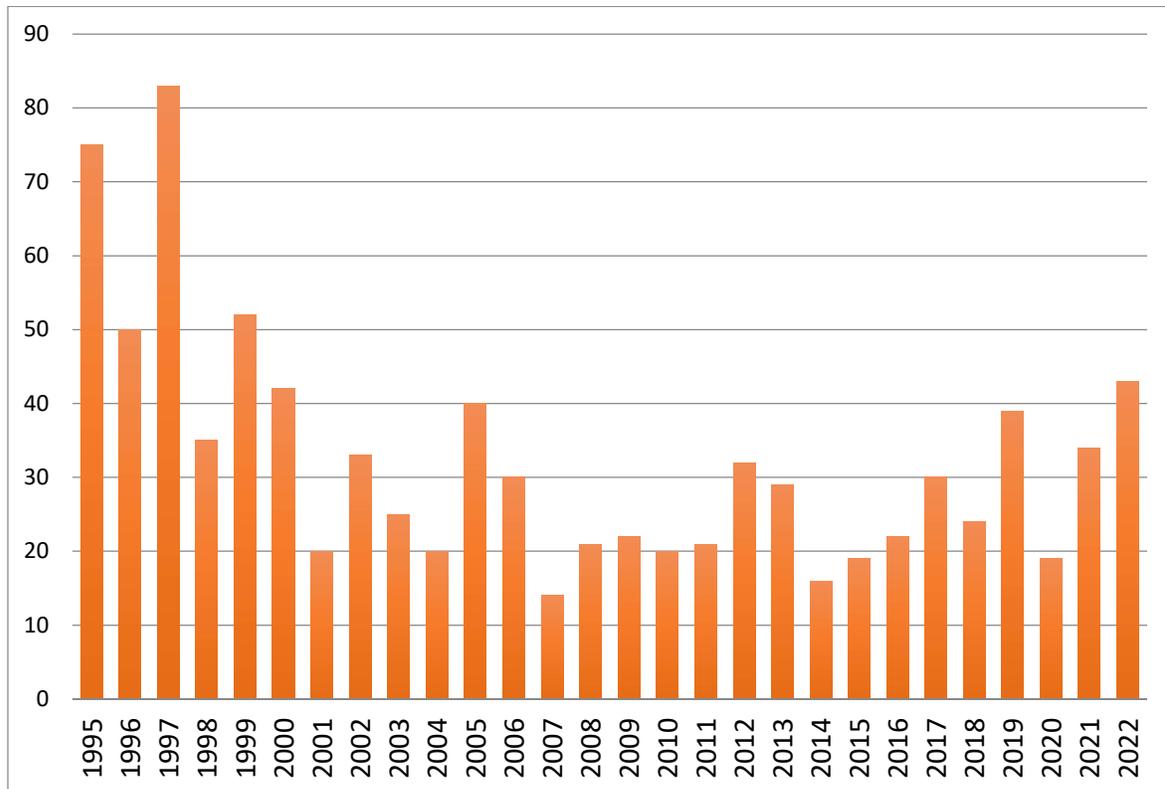


Figure 2. Nombre de cas de brucellose diagnostiqués en France annuellement (1995-2022)

La France métropolitaine est officiellement indemne de brucellose chez les bovins depuis 2005. Les derniers cas de brucellose chez les ovins et caprins ont été diagnostiqués en 2003. Une surveillance est maintenue chez ces espèces afin de détecter précocement les réémergences. Ainsi, il existe des contaminations occasionnelles de vaches par *B. melitensis* provenant de bouquetins dans les Alpes. En revanche, *B. suis* bv2 reste endémique en Europe et notamment France chez les sangliers et les lièvres. Cette bactérie est réputée peu pathogène pour l'Homme mais provoque des infections occasionnelles chez les chasseurs, généralement chez des personnes présentant d'autres comorbidités. En 2019, nous avons identifié le troisième cas de brucellose avec une souche atypique de la famille *B. inopinata*-like. La source de l'infection n'est pas connue, mais le souche était identique à une souche isolée d'une Grenouille PacMan. Le patient était en contact avec des reptiles et amphibiens exotiques. Vu le phénotype atypique de cette souche, il est possible que d'autres cas humains aient été mal diagnostiqués. Avec les nouvelles bases de données Maldi-TOF (deux distributeurs en France : Brucker et BioMérieux), ces souches sont désormais identifiées comme *Brucella*.

Brucella est un pathogène de classe III, considéré comme un agent potentiel du bioterrorisme. En France, toutes les *Brucella* excepté *B. ovis* sont classées comme des MOTs. Seuls les laboratoires autorisés par l'ANSM peuvent donc détenir et manipuler ces bactéries et leurs matériaux génétiques (ARN/ARN >500bp). Leur transport est strictement règlementé.

Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

La coordination scientifique du CNR Laboratoire Expert *Brucella* est assurée par Dr David O'Callaghan.

La coordination biologique et médicale est réalisée par le Pr Jean-Philippe Lavigne.

Les effectifs du Laboratoire Expert *Brucella* sont issus du Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière du Pr Jean-Philippe Lavigne, du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales du Pr Albert Sotto au CHU de Nîmes et de l'unité VBIC (Virulence Bactérienne et Infections Chroniques), INSERM U1047, dirigée par le Dr David O'Callaghan.

-les emplois affectés au CNR comprennent :

i) au niveau technique : un technicien de laboratoire (Théo Pastre) (1,0 ETP) pour assurer l'ensemble des analyses dévolues au CNR (réalisation de l'ensemencement de prélèvement, culture bactérienne, identification et antibiogramme, diagnostic sérologique des brucelloses et diagnostic et caractérisation moléculaire des prélèvements et des souches bactériennes envoyées) ; un deuxième technicien de laboratoire (Ludovic Desmier) (0,1 ETP) (affecté dans la routine du Service de Microbiologie du CHU de Nîmes et notamment sur la plateforme MICRO&BIO sur le plateau de génomique microbienne), pour réaliser les séquençages génomiques du CNR.

ii) au niveau biologique : 0,3 ETP de médecin biologiste (Pr Jean-Philippe Lavigne) et 0,1 ETP de pharmacien biologiste (Dr Chloé Magnan) pour assurer l'interprétation, la validation des résultats des analyses, la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs, la gestion des cas exposés et les conseils cliniques et thérapeutiques. La secrétaire du Service de Microbiologie (Marion Diaz) participe à l'envoi des rapports d'expertise et à la réception des communications téléphoniques (0,1 ETP).

iii) au niveau médical : 0,15 ETP de médecins cliniciens infectiologues (Pr Albert Sotto et Dr Paul Loubet) pour assurer les consultations sur site lors de demandes d'expertise médicale, les conseils cliniques et thérapeutiques.

iv) au niveau recherche : 0,5 ETP de temps de chercheur (Dr David O'Callaghan et Dr Anne Kériel) associés à des post-doctorats et des doctorants (non listés dans ce document) pour réaliser des travaux de recherche fondamentale sur la virulence et la génétique de *Brucella*, développer de nouveaux tests diagnostiques et participer à l'étude de tous les isolats de *Brucella* atypiques identifiés par le CNR.

Les biologistes et les chercheurs élaboreront annuellement les comptes rendus d'activité adressés à Santé Publique France.

Tableau 12. Liste des personnels dévolus aux activités du CNR Laboratoire Expert *Brucella*

Nom	Appartenance	ETP	Rôle
David O'CALLAGHAN	DR2 INSERM	0,2	Responsable Scientifique
Jean-Philippe LAVIGNE	PU-PH, UM, CHU Nîmes	0,3	Responsable Biologique et Médical Médecin biologiste
Paul LOUBET	PH CHU Nîmes	0,1	Médecin Infectiologue
Chloé MAGNAN	AHU CHU Nîmes	0,1	Pharmacien biologiste
Albert SOTTO	PU-PH, UM, CHU Nîmes	0,05	Médecin Infectiologue

Anne KERIEL	CRCN INSERM	0,3	Recherche fondamentale
Théo PASTRE	Technicien de laboratoire, CHU Nîmes	1	Sérologie, Bactériologie classique, Diagnostic moléculaire, Accréditation, Gestion des stocks
Ludovic DESMIER	Technicien de laboratoire, CHU Nîmes	0,1	Technicien de la Plateforme MICRO&BIO, plateau de Génomique Microbienne
Marion DIAZ	Secrétaire (agent de saisie), CHU Nîmes	0,1	Rendu des résultats, Réception des communications téléphoniques

Locaux et équipements

-L'activité de CNR-LE *Brucella* est réalisée sur le campus Hospitalo-Universitaire de Nîmes dans le service de Microbiologie et Hygiène du CHU de Nîmes et au sein de l'unité VBIC (U1047) à l'UFR de Médecine Montpellier-Nîmes, site de Nîmes. Les plans des différents locaux sont présentés en Annexe 4. Les laboratoires s'étendent sur une surface approximative de 500 m² (CHU) et 700 m² (VBIC). L'accès aux 2 laboratoires est contrôlé par badge magnétique.

-Nous disposons actuellement des équipements suivants :

i) Au CHU : Le Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière comprend, à ce jour, 7 unités fonctionnelles (UF) : UF de Bactériologie, UF de Virologie, UF de Parasitologie-Mycologie, UF d'Hygiène microbiologique, UF EOH, UF EMH. La dernière UF correspond à celle du CNR. Les locaux sont séparés en locaux techniques, administratifs (bureaux, secrétariat) et de services (réserve, laverie, vestiaires).

Le service est entièrement équipé pour le diagnostic des infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires en ayant différents secteurs dédiés dont un pour la culture, une plateforme de biologie moléculaire microbiologique, un secteur de sérologies microbiennes et une unité Risque Emergent Microbiologique (secteur dédié notamment aux infections respiratoires aiguës et le LBMR BHRé). Un laboratoire au norme NSB3 (dédié essentiellement aux mycobactéries) est disponible. Chaque UF est organisée dans un laboratoire NSB2 équipés de plusieurs PSM, de différentes étuves (30°C, 37°C, sous CO₂).

Les principaux équipements d'un laboratoire de Microbiologie sont disponibles : Ensemenceur automatique, automate d'hémocultures, automate de cytologie urinaire, colorateur automatique de Gram, spectrométrie de masse (Vitek® MS (bioMérieux)), antibiogramme semi-automatisé (Vitek 2), lecteur d'antibiogramme en diffusion (SIRScan). Un Point of Care (PoC) est présent à l'accueil des prélèvements avec des automates de PCR rapides (identification de pathogènes ou approche syndromique) et des tests de diagnostic rapide. Pour la biologie moléculaire, une plateforme dédiée est complètement équipée avec des extracteurs automatiques d'ADN et ARN dont une plateforme automatisée d'extraction et de préparation des plaques PCR (Perkin Elmer), de plusieurs thermocycleurs classiques et en temps réel (dont un système automatisé et intégré Panther), une plateforme de séquençage génomique microbiologique dotée d'un automate MiSeq (Illumina) et d'un Minlon (Oxford Nanopore).

Le secteur de sérologie est divisé en une partie complètement automatisée (utilisant les automates Vidas, Liaison XL, Alinity i) et une partie dédiée au sérologie manuelle. L'ensemble des équipements pour la réalisation des sérologies *Brucella* sont disponibles : ELISA, microscope à

fluorescence, chambre noire. Notre Laboratoire est accrédité selon la norme NF15189 depuis le 1er janvier 2015 (Accréditation N°8-3367) avec un périmètre comprenant la culture bactérienne, l'identification et l'antibiogramme, la biologie moléculaire et la sérologie. La sérothèque du CNR est conservée au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes (certifié ISO 9001 et ISO 20387 depuis le 11 février 2021). Le raccordement métrologique de nos différentes enceintes (froides et chaudes) est assuré par les enregistreurs SPY RF et le logiciel Sirius qualifiés selon l'étalonnage déterminé par le référent métrologie du service. Ils permettent un suivi, des enregistrements et des alertes en cas de problèmes. L'ensemble des autres équipements (pipettes, centrifugeuses, balances...) sont également suivis métrologiquement. Les accès au service, au BSL2, au NSB3 sont contrôlés par badge magnétique personnel.

ii) A l'unité VBIC-U1047 : sont disponibles : un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3), équipé de 3 PSM de type II, de deux étuves bactériologiques, de deux étuves bactériologiques avec agitation et d'une étuve à CO₂ (pour la culture cellulaire), d'un électroporateur, d'un microscope inversé, d'un réfrigérateur et de congélateurs à -20°C et -80°C sécurisés. L'accès au laboratoire NSB3 est également contrôlé par un badge magnétique personnel.

- trois laboratoires NSB2 : deux dédiés à la bactériologie avec 5 PSM de type II, des étuves bactériologiques (statique et avec agitation) et une étuve à CO₂ ; et un dédié à la culture cellulaire avec 2 PSM de type II, une étuve à CO₂ et un microscope inversé.

Pour les techniques de biochimie et biologie cellulaire, le laboratoire est équipé d'agitateurs de plaque, d'un lecteur multi-plaques (Thermo), d'un lumino/fluorimètre (Bethhold Mithras), d'un microscope à fluorescence (Leica) contenant un prisme de normarski, 5 filtres différents et une caméra CCD Roper Coolsnap Fx, un microscope confocal (Olympus Fv10i) et un FACS (Myltenyi MACS Quant). Pour l'analyse d'image, un poste avec une licence IMARIS (Oxford Instrument) est disponible.

- de nombreux équipements de biologie moléculaire : des thermocycleurs, un appareil de PCR en temps réel (Light Cycler 480 Roche), un extracteur automatique d'ADN/ARN, un électroporateur nucléofacteur (Nucleofector). Un lecteur infrarouge (Odyssey, Licor) pour Southern, northern et western Blots est également disponible.

Collections de matériel biologique

La sérothèque du CNR-LE est conservée au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes (certifié ISO 9001 et ISO 20387 depuis le 11 février 2021) depuis cette année. Le CNR-LE peut être amené à utiliser les prélèvements reçus à des fins de recherche scientifique, notamment pour l'amélioration des outils de diagnostic dont il a la charge, ainsi que les connaissances sur la bactérie responsable de la brucellose. Conformément au Code de la Santé publique (article 1211-2), le patient peut s'opposer à la requalification de ses prélèvements au moment du recueil. Un recueil de non opposition du patient ou de son représentant légal est noté dans la Fiche de demande des examens permettant l'utilisation secondaire des échantillons biologiques reçus.

Démarche qualité du laboratoire

Notre Laboratoire est accrédité selon la norme NF15189 depuis le 1^{er} janvier 2015 (Accréditation N°8-3367) avec un périmètre comprenant la culture bactérienne, l'identification et l'antibiogramme, la biologie moléculaire et la sérologie.

Les documents décrivant la politique qualité du CHU de Nîmes et l'accréditation du Pôle des Biologies sont en Annexe 6.

Une démarche d'accréditation spécifique du CNR-LE a été engagée en collaboration avec la Direction de la Qualité et de la Gestion des Risques du CHU de Nîmes grâce à l'aide de deux Ingénieurs Qualité (Mme Laure Navarro, Mme Anaïs Bertrand).

▪ Démarche qualité selon la norme ISO15189

Pour permettre d'accélérer la démarche qualité du CNR-LE, un stage de Master 2 (Violaine Grandjean) dans le cadre du Master Biotin (Université de Montpellier) a été réalisé lors de l'année universitaire 2020-2021 et avait pour but de continuer la Démarche d'accréditation du CNR-LE. Un audit interne préparatoire à cette démarche a été réalisé en 2021 par nos deux Ingénieurs du CHU (Figure 3).

N° Action	Date de création de l'action	Origine de l'action (E, RMM, Audit, Certif Dating, Patient traceur, Enquête de satisfaction, Décision du Bureau de pôle, Visite de conformité...)	Thème ou Nom de la thématique HAS (critères) ou Nom du référentiel	Constat(s) (Décrire la situation non-conforme)	Analyse des causes (Pourquoi la situation est-elle non conforme ?)	Action(s) définie(s)	Pilote(s)
8	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Absence MO/procédure analytique sur les examens réalisés	Méthode	Définir un MO/procédure comprenant les dispositions analytiques	Technicien CNR + biologiste référent
9	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Absence de dossier de validation/vérification de méthode ou données non formalisées dans le ELAB0258 ou ELAB029	Méthode	Définir une procédure comprenant les dispositions Analytique Utilisation des dossiers de validation/vérification types ELAB 028 ou ELAB 029	Technicien CNR + biologiste référent
10	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Utilisation d'un CIQ sans traçabilité Absence de dispositions concernant le passage des CIQ, la repasse...)	Méthode	Définir une procédure comprenant les dispositions Analytiques en matière de passage et validation du CIQ Application des dispositions polaires PLAB005 Gestion des contrôles de qualité d'une méthode qualitative ou quantitative	Technicien CNR + biologiste référent
11	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Absences de dispositions concernant les actions à faire en cas de CQ non conforme	Méthode	Définir une procédure comprenant les dispositions Analytiques en matière CQ NC Application des dispositions polaires PLAB005 Gestion des contrôles de qualité d'une méthode qualitative ou quantitative + ELAB033 Déclaration des CIQ Non conformes avec impact	Technicien CNR + biologiste référent
12	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Absence de dispositions concernant la gestion des EEQ ou comparaison interlabo	Méthode	Réaliser une comparaison inter-labo (si possible) Application des dispositions polaires ELAB035 Suivi des EEQ et des incertitudes	Technicien CNR + biologiste référent
13	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.5 Analytique 5,6 Garantie de qualité des résultats PROCESSUS ANALYTIQUE	Feuille de paillasse non codifiée et manque de renseignements (N°lot du kit utilisé, initiales TK...)	Méthode	Modification et codification de la feuille de paillasse	Technicien CNR + biologiste référent
14	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.7 Post-Analytique; 5.8 Compte rendu résultats; 5.9 Diffusion des résultats PROCESSUS POST ANALYTIQUE	Pas de dispositions concernant la conservation des échantillons avant et après analyses	Méthode	Définition des dispositions Intégrer ces dispositions au SLAB024 Pré-traitement et conservation des échantillons	Technicien CNR + biologiste référent
15	07/05/2021	AUDIT	ISO 15189 Chapitres 5.7 Post-Analytique; 5.8 Compte rendu résultats; 5.9 Diffusion des résultats PROCESSUS POST ANALYTIQUE	Saisie manuelle des résultats lors de la validation non contrôlée	Méthode	Intégrer cet examen dans le SL pour saisie manuel par le technicien et contrôle par le biologiste lors de la validation	Référent informatique

Figure 3. Rapport d'audit préparatoire réalisé en 2021.

La Démarche qualité a consisté en :

-la **construction** de l'ensemble de la **documentation** des processus pré-analytique, analytique et post-analytique du CNR-LE, et leur rédaction (Tableau 13),

- la **mise à jour complète du site web** du CNR-LE en rapport avec les exigences réglementaires (processus pré-analytique) (Figure 4), avec notamment la présence d'une fiche de demande dématérialisée, les modalités d'envoi et la Fiche de Déclaration Obligatoire (formulaire cerfa 12215*02). Ce site permet de contacter le CNR (une adresse e-mail est disponible : CNR.brucella@chu-nimes.fr) et informe les différents lecteurs sur l'épidémiologie, la clinique, le diagnostic et le traitement de la brucellose. Les rapports d'activité du CNR depuis 2017 sont également disponibles sur le site.



Figure 4. Page de garde du site web de CNR Brucella (www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/accueil.html)

-la mise à jour de l'ensemble des **documents du processus analytique** notamment un dossier de validation de méthode pour l'utilisation de la dilution du test au Rose Bengale (EAT). La gestion des contrôles de qualité (CQ) et la validation de nouvelles méthodes ont aussi été évaluées.

Le CNR-LE participe annuellement à un contrôle de qualité externe (EEQ) pour la sérologie (recherche d'anticorps IgG, IgM, anticorps totaux contre *Brucella*) réalisé par LABQUALITY. Le dernier a été réalisé en Mars 2022 et a validé la conformité de nos résultats.

-la mise à jour du **processus post-analytique** avec notamment la diffusion des résultats via l'application « BlueFiles » afin de préserver la confidentialité des patients lors de cet envoi au clinicien/laboratoire prescripteur par un courrier électronique sécurisé. Le CNR a également 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 gérés principalement par le Pr. LAVIGNE et le Dr O'Callaghan. Ces activités sont tracées pour permettre une exhaustivité de l'activité du CNR-LE. Enfin, le CNR-LE informe Santé Publique France de tout nouveau cas diagnostiqué.

Tableau 13. État des lieux de la documentation de CNR *Brucella*.

Documents créés	Documents du Pôle	Titre
Processus pré-analytique		
ICNR-001		Conditions péanalytiques et envoi au CNR
ECNR-001		Feuille de renseignements
ECNR-002		Feuille de réception
SCNR-002		<i>liste des non conformités préanalytiques du CNR</i>
ICNR-002		Réception des prélèvements et souches au CNR
SCNR-004		Manuel de mise à jour du Mini-site du CNR
SCNR-006		Liste du personnel habilité MOT
Processus analytique		
SCNR-003		<i>cartographie du processus de réalisation du CNR</i>
ICNR-003		Diagnostic de brucellose à partir d'une souche bactérienne
ICNR-004		Diagnostic moléculaire de brucellose sur un prélèvement
ICNR-005		Sérodiagnostic de la brucellose
MOCNR-001		Repiquage d'une souche <i>Brucella</i> ou d'une colonie bactérienne suspectée <i>Brucella</i>
MOCNR-002		Mise en culture de <i>Brucella</i> à partir de prélèvements
MOCNR-003		Inactivation bactérienne par chauffage
MOCNR-004		Identification du genre <i>Brucella</i> par MALDI-TOF MS
	MOBAC042 – V 1	<i>Gestion de la souche controle E. coli du Vitek MS</i>
	MOBAC043 – V 1	<i>Utilisation Vitek MS Biomerieux</i>
	MOBAC044 – V 2	<i>Utilisation de MYLA Biomerieux</i>
MOCNR-005		Extraction d'ADN génomique bactérien sur kit Dneasy Ultraclean Microbial kit-Qiagen
MOCNR-021		Automate Qiacube QIAGEN
MOCNR-006		Extraction d'ADN génomique bactérien de tissu x (en développement)
MOCNR-007		Extraction d'ADN génomique bactérien de tissu y (en développement)
MOCNR-008		Extraction d'ADN génomique bactérien de tissu z (en développement)
MOCNR-009		Identification de genre par qPCR
MOCNR-020		Thermocycleur Lightcycler 480 II ROCHE
MOCNR-010		Détermination d'espèce par PCR Bruce Ladder (1): <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i>
MOCNR-011		Détermination d'espèce par PCR Suis Ladder: biovars de <i>B. suis</i> et <i>B. canis</i>
MOCNR-012		Détermination d'espèce par PCR Bruce Ladder (2): <i>autres Brucella</i>
MOCNR-019		Thermocycleur Biometra Trio
MOCNR-013		Sérodiagnostic Brucellose: Epreuve à l'Antigène Tamponné
MOCNR-014		Sérodiagnostic Brucellose: Sérodiagnostic d'Agglutination Wright
MOCNR-015		Sérodiagnostic Brucellose: Brucellacapt®
MOCNR-016		Sérodiagnostic Brucellose: ELISA IgG et ELISA IgM
	MOVIR011	<i>Lecteur de densité optique Multiskan FC</i>
ICNR-006		Gestion des nouveaux lots de kit EAT pour sérodiagnostic de la brucellose
ECNR-006		Gestion des essais d'acceptation des nouveaux lots <i>Brucella</i> Rose Bengale BIO-RAD kit et CQ
ICNR-007		Gestion des souches bactériennes Contrôle Positif: préparation, utilisation, stockage
ICNR-009		Gestion de la comparaison interlaboratoire
ECNR-008		Enregistrement des résultats EAT des Laboratoires correspondants
Processus post-analytique		
ECNR-003		Feuille de résultat du diagnostic direct et moléculaire à partir de souches reçues ou issues de
ECNR-004		Feuille de résultat du diagnostic moléculaire sur biopsie ou LCR
ECNR-005		Feuille de résultat du diagnostic indirect sur serum ou LCR
MOCNR-017		Sérothèque <i>Brucella</i>
MOCNR-018		Souchothèques du CNR
	ELAB-147	<i>Shéma de boîte 81 positions</i>
ECNR-007		Compte rendu
	PLAB-017	<i>Post-analytique et rendu des résultats</i>
	<i>à faire évoluer</i>	5.2.4 Diffusion patient : pas de diffusion vers les patients par le CNR
		5.2.5 Particularités du CNR: diffusion téléphonique/papier au laboratoire/médecin prescripteur
		5.5 Conservation des échantillons: pour le CNR, ICNR-008
ICNR-008		Conservation des échantillons du CNR
SCNR-005		Déclaration Obligatoire

-la gestion des problèmes **d'hygiène et environnement** respectant les mesures mises en place au sein du laboratoire. Cette démarche vise à améliorer les façons de travailler en interne en apportant plus de vigilance et de rigueur au quotidien. La démarche a été mise en place en collaboration avec l'Assistant de Prévention (AP) et les agents chargés de l'Hygiène & sécurité.

-la **traçabilité des résultats**. L'utilisation de cahiers de laboratoire numérotés et contresignés est de rigueur au sein de l'unité VBIC. Ils permettent la traçabilité des études entreprises et le maintien dans l'équipe des compétences et du savoir-faire acquis. Au sein du CHU, l'ensemble des demandes va intégrer le logiciel métier du laboratoire (GLIMS) en 2023 à l'occasion d'un changement de version (V.10) permettant une traçabilité et un respect total de la confidentialité des données.

-l'**organisation de l'espace de travail**. Elle découle de la démarche hygiène & sécurité : Optimiser et sécuriser les postes de travail, élimination et tri des déchets, nettoyage et rangement, inspection régulière de l'état de fonctionnement des appareils. Un responsable des déchets a été désigné au sein de l'unité. L'AP de l'unité donne à l'arrivée d'une nouvelle personne dans l'unité un carnet du nouvel arrivant avec notamment les règles d'hygiène et sécurité.

-l'**utilisation des instruments scientifiques** est contrôlée (métrologie) et tracée (cahier d'utilisation) avec notamment le fonctionnement et les performances de chaque appareil afin de garantir les données recueillies (pipettes, réfrigérateurs, congélateurs etc.).

-la **formation** du personnel du CNR-LE est réalisée (ex. système d'eau ultra pure, conducteurs d'autoclave, etc.) et tracée.

La demande d'accréditation du CNR-LE sera normalement évaluée lors de la venue des experts-visiteurs la dernière semaine du mois de septembre 2023 au CHU de Nîmes.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Liste des techniques de référence

-Diagnostic indirect : sérologie bactérienne

Nous avons mis en place les techniques sérologiques manuelles qui font actuellement référence dans le diagnostic indirect de la brucellose humaine :

- le test d'agglutination sur lame au Rose Bengale (RB) ou Épreuve Antigène Tamponné (EAT) avec dilution de sérum.
- un test d'immuno-capture permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella*
- deux tests ELISA permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella* de type IgM et/ou IgG (par immunocapture).

La stratégie sérologique est basée préférentiellement sur le titre du Rose Bengale, dont le seuil de positivité est estimé $\geq 1/8$. Pour confirmer ce diagnostic, nous utilisons la détection d'IgM et IgG par ELISA et immunocapture. Les dosages d'Ig permettent de dater l'épisode (brucellose débutante : IgM positif, IgG négatif ; brucellose aiguë : IgM positif, IgG positif ; brucellose subaiguë : IgM négatif, IgG positif).

-Diagnostic direct : Technique de bactériologie classique

Les méthodes classiques de culture, d'identification et de typage des *Brucella* sont complexes, longues et ne sont pas sans risque pour le manipulateur. Les souches suspectes de *Brucella* reçues au CNR sont identifiées par spectrométrie de masse (Maldi-TOF) en utilisant la base de données que nous avons générée en partenariat avec la société bioMérieux. Une confirmation par des tests de biologie moléculaire sera réalisée ensuite. L'ensemble de ces outils sont utilisés en routine par le CNR-LE.

Le service demandeur aura donc dans la journée suivant la réception de la souche l'identification du genre *Brucella*, élément capital pour la mise en place du traitement antibiotique.

-Diagnostic direct : Techniques moléculaires

Les outils de biologie moléculaire sont devenus la référence actuellement pour le diagnostic de *Brucella*. La recherche de *Brucella* sera réalisée après extraction de l'ADN bactérien des différents prélèvements reçus (sang, LCR, biopsies...) par PCR en temps réel en utilisant plusieurs cibles : **séquence IS711/6501, bcsp31 et per** (Bounaadja L et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. *Veterinary Microbiology* 2009, 137, 156-164).

Nous n'utilisons plus la séquence du gène codant pour le 16S rRNA comme outil d'identification de *Brucella* car cette technique est plus chronophage (résultat >48h), susceptible de contaminations, et peut donner des résultats faussement positifs en raison des nombreuses séquences du gène codant pour le 16S rRNA incorrectement référencées dans la base de données NCBI. Nous avons également remplacé la nested-PCR ciblant la séquence d'insertion IS711 spécifique de *Brucella* par une qPCR utilisant une sonde taqMan.

Liste des techniques disponible pour l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

La résistance aux antibiotiques chez *Brucella* est extrêmement rare et ne constitue pas un problème pour le traitement des patients.

Aucune étude de sensibilité in vitro aux antibiotiques n'est à réaliser dans les laboratoires de microbiologie en France en raison de l'absence de résistance acquise rapportée à ce jour pour les traitements recommandés pour la brucellose (seuls quelques cas exceptionnels décrits dans la littérature) et des difficultés d'interprétation des antibiogrammes (proposition de seuils d'interprétation spécifiques pour *Brucella* définis par l'EUCAST en 2023). Nous ne recommandons ni n'encourageons les laboratoires à effectuer ce type de tests. Il s'agit d'un risque majeur d'infection acquise en laboratoire.

Au sein du laboratoire, annuellement, nous réalisons des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de type Mueller Hinton au sang (MH-F). Les disques d'antibiotiques utilisés sont : doxycycline (disque de 30µg), minocycline (30µg), rifampicine (5µg), gentamicine (10µg), amikacine (30µg), céfotaxime (5µg), ceftriaxone (30µg), imipénème (10µg), sulfaméthoxazole/triméthoprime (1.25/23.75µg), ofloxacine (5µg), ciprofloxacine (5µg), lévofloxacine (5µg), et moxifloxacine (5µg). Ces analyses nous permettent une surveillance de la sensibilité des isolats identifiés en France.

Liste des techniques disponibles pour le typage (Espèce/biovar) et séquençage génomique :

Dans la prise en charge de la brucellose humaine, l'identification de l'espèce bactérienne n'est pas nécessaire (les traitements étant identiques). Toutefois à des fins épidémiologiques, il est important de déterminer l'origine des souches responsables des cas humains de brucellose. Actuellement les outils d'identification couramment utilisés en bactériologie ne permettent l'identification que du genre (en particulier la spectrométrie de masse).

Les **techniques moléculaires** mises en place au CNR sont les seules qui permettent une différenciation des espèces et/ou biovars du genre *Brucella*. Elles comprennent :

- la PCR multiplex Bruce-ladder modifiée (adaptée de García-Yoldi et al., 2006) pour l'identification des différentes espèces et la différenciation des souches vaccinales vétérinaires de leurs homologues sauvages (*B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 et *B. abortus* RB51),
- la PCR multiplex Suis-ladder (adaptée de López-Goñi et al., 2011) pour la différenciation des biovars de *B. suis*,
- la PCR Ectoïne, développée par notre équipe, pour l'identification des souches atypiques *B. inopinata*-like (Rouzic et al., 2021).

Liste des techniques recommandées par le CNR

Diagnostic indirect : sérologie bactérienne

Pour le criblage :

- le test d'agglutination sur lame au Rose Bengale (RB) ou Épreuve Antigène Tamponné (EAT)
- un test d'immuno-capture permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella*.

Pour étayer le diagnostic :

- deux tests ELISA permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella* de type IgM et/ou IgG (par immunocapture).

Deux techniques sont recommandées pour le criblage en accord avec la nomenclature NABM. Toutefois, la VPN du test au Rose Bengale est telle (VPN>99%) que la négativité de ce test permettrait à lui seul d'exclure une brucellose.

Diagnostic direct : Technique de bactériologie classique

Les méthodes classiques de culture, d'identification et de typage des *Brucella* sont complexes, longues et ne sont pas sans risque pour le manipulateur.

Dès qu'une souche est identifiée (généralement par Maldi TOF), nous recommandons de ne plus la manipuler et de l'envoyer au CNR pour confirmation et caractérisation.

La performance des automates d'hémocultures permet d'obtenir des cultures en moins de 5 jours ne nécessitant pas une prolongation systématique des incubations des flacons prélevés chez les patients. Toutefois, il est rappelé qu'il est essentiel d'être vigilant sur le bon remplissage de ces flacons d'hémocultures (40 mL minimum) pour permettre un diagnostic fiable et performant.

La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques chez *Brucella* est extrêmement rare et ne constitue pas un problème pour le traitement des patients. Nous ne recommandons ni n'encourageons les laboratoires à effectuer des tests de sensibilité aux antibiotiques pour les isolats de *Brucella*. Il s'agit d'un risque majeur d'infection acquise en laboratoire.