

Rapport annuel d'activité

2018

**Centre de national de référence
Brucella**

**Année d'exercice
2017**

Résumé analytique

En 2017, 30 cas de brucellose ont été notifiés par le CNR à Santé Publique France. L'ancien CNR (ANSES, Maisons Alfort) a assuré la gestion des souches/prélèvements jusqu'à Juin 2017, ensuite le CHU de Nîmes a pris en charge la gestion de ces souches/prélèvements.

Le CNR a traité 65 prélèvements ou souches en 2017 ; 35 par Maisons Alfort ; 30 par le CHU de Nîmes. Le CNR a traité, 212 sérums ou LCR en 2017, pour sérodiagnostic ou confirmation.

Au total, en France métropolitaine pour l'année 2017, 31 cas ont été confirmés par le CNR, dont 27 par identification/isolement de la souche, 1 par PCR et 2 par sérologie uniquement. Le CNR a confirmé en sérologie 7 des 27 cas pour lesquels la souche a été identifiée comme *Brucella*.

La PCR multiplex « Bruce Ladder » a montré que toutes les souches appartiennent à l'espèce *B. melitensis*, à l'exception d'une souche isolée chez un patient de Guyane ayant été en contact avec des porcs au Brésil et qui appartient à l'espèce *B. suis*.

Les 30 patients se répartissaient entre 16 hommes et 13 femmes, 1 cas non renseigné. La moyenne d'âge était de 50 ans [5 - 79]. La distribution ne varie pas notablement de celle observée précédemment avec, comme particularité, un frère et une sœur de 8 et 5 ans dépistés après un voyage en Algérie.

Aucun cluster n'a été identifié en 2017 et un seul cas de contamination en laboratoire n'a été rapporté ; tous les autres cas de brucellose confirmés au CNR étaient des cas importés.

Les pays (ou régions) présumés de contamination (voyage, séjour habituel ou lien familial étroit dans un pays d'endémie/enzootie) étaient :

- Pour les cas où *B. melitensis* a été isolé : la Chine (1), la Turquie (1), l'Algérie (9), le Liban (1), la Tunisie (6), l'Inde (1), l'Ethiopie (1), le Koweït (1)
- Pour le cas où *B. suis* a été isolé : Brésil (1)

In 2017, 31 cases of brucellosis were reported by the CNR to Santé Publique France. To assure a smooth transfer of responsibilities from the previous CNR (ANSES, Maisons Alfort) to the CHU Nîmes, isolation and identification of bacterial strains was performed by ANSES until June 2017. After this date, the CNR in Nîmes took full responsibility for the work.

The CNR performed bacteriological analysis on 65 samples or strains in 2017: 35 by ANSES; 30 by the CHU Nîmes. Brucellosis serology was performed on a total of 212 sera or CSF for diagnosis or confirmation.

In total, in mainland France for the year 2017, 31 cases were confirmed by the CNR; 27 cases by identification / isolation of the strain, 1 by PCR and 3 by serology only. The CNR serologically confirmed 7 out of 27 cases for which the strain was identified as *Brucella*.

Bruce Ladder Multiplex PCR showed that all of the strains except 1 were *B. melitensis*. *B. suis* was isolated from one patient in French Guiana (Cayenne) who had contact with pigs in Brazil. One particularity was confirmation of brucellosis in two siblings (8 and 5 years old) on their return from a trip to Algeria. The age and sex distribution (17 men and 13 women, 1 ?), average age 50 years [5 - 79] is similar to that in previous years.

No cluster was identified in 2017 and only one case of laboratory contamination was reported all other cases of brucellosis confirmed at CNR were imported cases

All the cases were imported. Countries (or regions) suspected of being the site of contamination (travel or visiting family/friends in an endemic / enzootic country)

- *B. melitensis*: China (1), Algeria (9), Lebanon (1), Tunisia (6), India (1), Ethiopia (1) , Kuwait (1)

- *B. suis*: Brazil (1)

1 Missions et organisation du CNR

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

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

En 2017, les effectifs du CNR des *Brucella* étaient les suivants : 1.40 ETP (équivalent temps plein). M Ludovic DESMIER a été recruté comme technicien par le CHU de Nimes pour les activités de diagnostic et de recherche du CNR. Les Dr. O'CALLAGHAN et Pr. LAVIGNE sont impliqués au quotidien dans cette activité pour la réalisation du diagnostic sérologique, la validation des résultats techniques, l'interprétation des tests diagnostiques et la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs. Les Drs Anne KERIEL, Christine FELIX sont également impliquées dans les activités de recherche fondamentale du CNR.

Le Pr. SOTTO (PU-PH Maladies Infectieuses et Tropicales) et le Pr. LAVIGNE fournissent des conseils thérapeutiques et médicaux. Ils effectuent également le recueil des renseignements cliniques et épidémiologiques, et l'élaboration des comptes rendus adressés à Santé Publique France

L'organigramme

Directeur	David O'CALLAGHAN (DR2 INSERM)
Co-directeur	Jean-Philippe LAVIGNE (PU-PH Bactériologie).
Conseil clinique	Albert SOTTO (PU-PH Maladies Infectieuses et Tropicales)
MALDI-TOF, Recherche fondamentale	Anne KERIEL (CR INSERM),
Recherche fondamentale	Christine FELIX (IE UM)
Technicien Diagnostique	Ludovic DESMIER (Tech CHU-Nimes)

2 Activités d'expertise

Le CNR a, en 2017, apporté son appui aux laboratoires d'analyse et de biologie médicale et aux laboratoires hospitaliers pour l'isolement et l'identification présomptive des *Brucella*. Il est, à ce titre, le destinataire (*a priori* exclusif) des souches suspectées d'appartenir au genre *Brucella* par les laboratoires. Lorsque des souches parviennent, par erreur, au LNR *Brucella* (ANSES Maisons Alfort), celui-ci les envoient systématiquement au CNR de Nîmes dans les meilleurs délais. Le CNR met également en œuvre, le cas échéant, des outils moléculaires de détection (PCR), lorsque, en particulier, les tentatives d'isolement par les méthodes bactériologiques classiques n'ont pas donné de résultat malgré une forte suspicion (selon le tableau clinique et/ou épidémiologique). Il est à ce titre le destinataire des prélèvements destinés à la recherche directe de *Brucella* ou de leurs acides nucléiques et également du sérodiagnostic.

2.1 Évolutions des techniques

Le CNR *Brucella* utilise la PCR 16S pour la détection de *Brucella* dans les prélèvements. Le gène 16S code la sous unité 16S de l'ARN ribosomal, il est essentiellement utilisé en biologie moléculaire en raison de sa structure très conservée dans toutes les bactéries, augmentant ainsi la fiabilité de l'identification. Nous adoptons une approche large spectre, en ciblant le gène ARN 16S commun à toutes les bactéries, puis séquençons et comparons aux banques de donnée pour identifier la bactérie en cause.

Le CNR a mise en place au sein du laboratoire une PCR multiplex nommée <<Bruce Ladder>> permettant, après extraction de l'ADN bactérien, la caractérisation de l'espèce de *Brucella* (Lopez-Goni et al. J Clin Microbiol 2008).

Le CNR s'est équipé d'un automate permettant le dosage immunologique des anticorps anti-*Brucella* par chimiluminescence (Virclia, Orgentec).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Nous sommes en train d'évaluer le système Virclia (Orgentec) et le comparer avec le système 'Brucella Capt'. A présent, les résultats sont très encourageants.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

N/A

2.4 Collections de matériel biologique

Souches	16 isolats
Sera/LCR	810

2.5 Activités d'expertise

Méthode directe

Souches et prélèvements reçus

En 2017, 30 cas de brucellose ont été déclarés et validés par Santé Publique France 29 en métropole, 1 en Guyane. Ce nombre est à peu près stable depuis plus de 10 ans (Fig. 1 et Table 1).

Table 1 Cas de brucellose déclarés annuellement en France entre 1995 et 2017

Année		2002 - 2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nombre de cas de brucellose*		72**	40	30	14	21	22	20	21***	32***	29***	16***	19***	22***	30
Cas confirmés par isolement de <i>Brucella</i> (identifiées et typées au CNR) ou PCR (CNR)	Isolement	59	38	23	11	15	22	18	24	23	20	12	17***	21	27
	PCR unique ment	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	1
Cas confirmés par sérologie uniquement		ND	2	7	3	5	0	2	0	6	8	2	1	2	2

* L'année de DO est parfois postérieure à l'année d'isolement. Dans ce cas, c'est la notification du cas par le CNR qui permet à Santé Publique France de demander la DO non faite initialement.

**1^{er} juin 2002 au 31 mai 2004.

*** Différences liées au décalage entre déclaration du cas à Santé Publique France et date du prélèvement ayant conduit à une analyse positive au CNR

L'activité 2017 a été marquée par une légère hausse du nombre de cas par rapport à 2016 mais ce chiffre reste stable par rapport à la moyenne sur les 5 dernières années (24 cas par an en moyenne entre 2011 et 2016).

Le CNR a eu à traiter 65 prélèvements (confirmation de souche, diagnostic direct) concernant 60 patients en 2017, provenant majoritairement de France métropolitaine. Au total, ces dossiers ont concerné 33 souches et 32 envois de prélèvements.

Trente souches appartenant au genre *Brucella* ont été reçues ou isolées au CNR en 2017 de 27 patients différents. Toutes ces souches sauf une, ont été confirmées comme appartenant à l'espèce *B. melitensis*. Une souche été identifié comme *B. suis*.

Parmi les 30 souches qui ont été identifiées, 27 souches ont été isolées sur des hémocultures, une souche sur liquide articulaire, une souche issue d'une prothèse de hanche, une souche isolée d'une spondylodiscite.

Table 2 Souches reçues et isolées au CNR des *Brucella*

N°DossierCNR*	DateRéceptionCNR	Nom	Age	sejourpaysRisques	SourceIsolementouPrélèvement	Identification	SérumAnalysé	confirmationparSérologie
17-11/17	02/01/17		70	Turquie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-401/613	03/02/17		48	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-491/792	10/02/17		62	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
16-690/1138	24/02/17		53	Liban	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-946/1784	15/03/17		37	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-1183/2231	28/03/17		57	Koweït	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-1375/2686	11/04/17		68	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-1620/3124	28/04/17		8	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-1620/3125	28/04/17		5	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-1887/3536	16/05/17		79	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-2066/4067	30/05/17		77	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-2286/4484	12/06/17		75	Algérie	spondylodiscite	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
17-2621/5438	30/06/17	Z	30	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
17-2676/5482	05/07/17		31	Chine	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-001	26/05/17		-	Inde	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-004	01/08/17		29	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-005	04/08/17	Be	74	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-006	04/08/17	Be	74	-	Hanche	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-009	09/08/17		53	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-011	23/08/17		34	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2017-013	06/09/17		33	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-015	08/09/17		70	Ethiopie	LiquideArticulaire	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-016	12/09/17		26	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-019	17/10/17	Z	30	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2017-020	17/10/17		31	Chine	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-022	07/11/17		30	Brésil	Hémoculture	<i>Brucella suis</i>	Non	-
BRSO-2017-024	30/11/17		54	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-026	01/12/17		56	-	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-028	14/12/17		70	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-
BRSO-2017-030	15/12/17		73	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	-

* La nomenclature d'attribution du numéro de dossier a changé lorsque le CHU de Nîmes a repris l'activité en juin 2017

Table 3 Origines géographiques probables de contamination des cas pour lesquels des souches de *Brucella* ont été identifiées ou des PCR positives ont été obtenues au CNR (2002-2017)

Origines probables des cas traités au CNR	Année																
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Contamination liée à un pays étranger																	
Péninsule Ibérique	8	5	-	12	3	1	2	3	2	4	3	-	-	1	-		
Italie	2	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-		
Chypre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-		
Balkans/Turquie	1	5	4	7	3	2	8	5	3	4	5	7	2	2	6	1	
Caucasus (Arménie, Azerbaïdjan)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-		
Maghreb	2	6	5	7	9	4	4	11	7	7	8	7	5	4	9	15	
Proche/Moyen/Orient	-	2	1	3	2	-	-	1	1	4	-	-	2	4	2	2	
Asie (Inde et/ou Golfe/persique)	2	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	1	
Asie Centrale (Kazakhstan)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		
Asie (Chine)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	
Afrique (hors Maghreb)	1	2	1	-	-	1	-	-	1	1	4	-	-	2	1	1	
Amérique du Sud (Pérou, Argentine)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	
Mexique	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
USA	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Contamination en zone d'endémie (B. suis 1) (Polynésie Française-Wallis-Futuna)	1	2	2	1	1	1	1	-	-	-	3	1	-	1	-		
Polynésie (B. canis)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-		
Contamination en France métropolitaine																	
Contamination de laboratoire	-	1	-	5	3	-	-	1	2	-	1	1	3	-	-	1	
Contamination B. suis (exposition sangliers ou lièvres)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	2		
Rechute de contamination France (B. abortus ou B. melitensis)	2	1	1	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-	-	1		
Non renseigné	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	
Total	19	24	16	38	23	12	18	22	18	24	28	20	12	18	22	29	

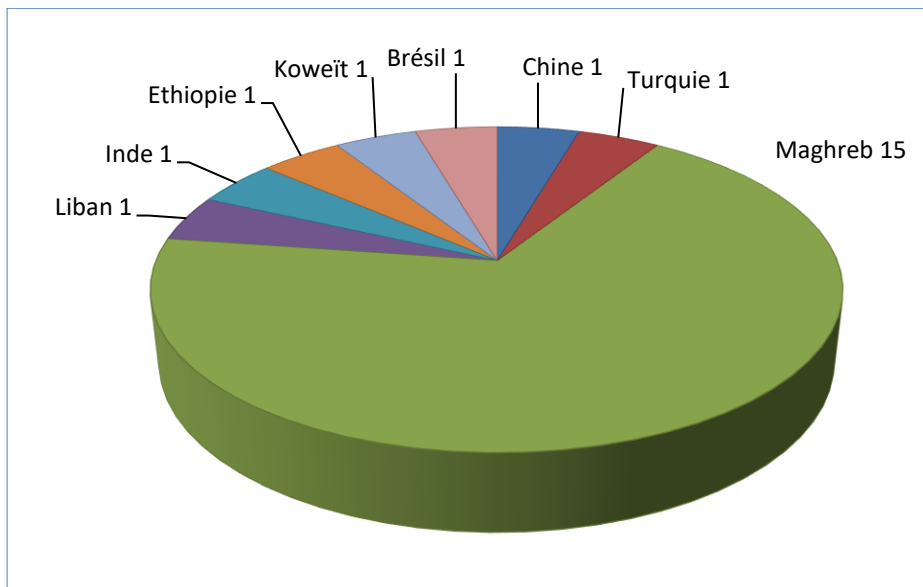


Fig 2 Pays en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France pour l'année 2017

Les cas de brucellose confirmés au CNR sont des cas importés à l'exception d'un (contamination de personnel de laboratoire). On constate de façon générale que les pays du Maghreb figurent parmi les principales régions en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France. On peut expliquer cela par la présence d'une forte communauté Franco-Maghrébine en France qui voyage dans les pays d'endémie/enzootie.

Méthode indirecte

En 2017, le CNR a expertisé 212 échantillons de sérum (164 patients). Notre objectif principal était d'investiguer les suspicions de brucellose non confirmées par culture.

2 patients ont été identifiés comme infecté par *Brucella* sur la base du tableau clinique et/ou de la sérologie uniquement, représentant 3 sérologies (Table 4). Parmi ces 2 patients, 1 cas de technicien de laboratoire contaminé durant sa fonction.

Table 4 Cas de brucellose confirmé par sérologie uniquement

N°dossier CNR	date réception	date prélèvement	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellapt
BRU-2017-638	12/05/17	05/05/17	A	1/16	-	1+	3+	1/2560
BRU-2017-662	15/06/17	11/05/17	A	1/16	1/1280	1+	3+	1/2560
BRU-2017-771	13/11/17	08/11/17	N	1/8	1/80	+(5,1)	+(12,3)	1/5120

EAT : résultat du Rose Bengale exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; *SAW* : résultat de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; *IgG*, *IgM* : Résultat de la quantification des IgG et IgM par chemiluminescence ; *Brucellapt* : résultat de l'immunocapture (exprimé en dilution).

8 sérologies positives ont été confirmées par isolement/confirmation d'une souche de *Brucella*, représentant 7 cas de brucellose (Table 5).

Table 5 Résultats de sérologie pour les cas de brucellose avec isolement/confirmation de *Brucella* par méthode directe.

N°dossier CNR sérologie	Date réception	Date prélèvement	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellapt	N°dossier souche	Résultat identification
BRU-2017-585	01/01/17	02/01/17		1/8	1/640(1960)	2+	4+	1/1280	17-11-17	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-591	31/01/17	02/02/17		1/8	1/1280(1920)	4+	1+	1/2560	17-401/613	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-614	24/03/17	07/03/17		1/16	1/1280	4+	1+	1/5160	17-946/1784	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-623	13/04/17	08/04/17		1/32	>1/2560	4+	1+	1/2560	BRSO-2017-011	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-641	10/05/17	26/04/17		>1/32	>1/2560	4+	2+	>1/5160	17-1620/3124	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-640	10/05/17	26/04/17		>1/32	>1/2560	4+	2+	>1/5160	17-1620/3125	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-664	22/06/17	21/06/17	Z	1/16	>1/2560	4+	Neg	1/2560	BRSO-2017-019	<i>Brucella melitensis</i>
BRU-2017-672	05/07/17	30/06/17	Z	1/16	1/2560	3+	1+	1/1280	BRSO-2017-020	<i>Brucella melitensis</i>

EAT : résultat du Rose Bengale exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; *SAW* : résultat de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; *IgG*, *IgM* : Résultat de la quantification des IgG et IgM par chemiluminescence ; *Brucellapt* : résultat de l'immunocapture (exprimé en dilution).

8 sérologies représentant 5 cas sont restées douteuses (Table 6):

Table 6 Cas douteux

N°dossier CNR	date réception	date prélèvement	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2017-588	20/01/17	19/01/17		1/2	1/160	negatif	douteux	negatif
BRU-2017-643	19/05/17	16/05/17	Li	1/16	-	3+	1+	1/2560
BRU-2017-654	03/06/17	24/05/17		Pur	1/320	negatif	douteux	1/320
BRU-2017-667	21/06/17	03/06/17	Li	1/16	1/640	4+	1+	1/1280
BRU-2017-752	29/09/17	27/03/17	Lo	1/4	1/640	positif(7,5)	positif(2,3)	1/320
BRU-2017-753	29/09/17	18/09/17	Lo	pur	1/80	negatif	douteux(1,0)	negatif
BRU-2017-763	10/10/17	23/10/17	Da	1/8	1/640	positif(6,6)	positif(4,1)	1/640
BRU-2017-779	16/11/17	30/10/17	Da	pur	1/80	positif(4,3)	positif(8,3)	1/320

EAT : résultat du Rose Bengale exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultat de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; IgG, IgM : Résultat de la quantification des IgG et IgM par chemiluminescence ; Brucellacapt : résultat de l'immunocapture (exprimé en dilution).

25 sérologies représentant 21 patients ont vu leurs résultats sérologiques considérés comme « faux positifs » (Table 7):

Table 7 Cas « faux positifs »

N°dossier CNR	date réception	date prélèvement	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2017-584	01/01/17	20/12/16		1/2	1/80	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-586	05/01/17	17/12/16		negatif	1/160	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-587	12/01/17	06/01/17		negatif	1/80	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-589	25/01/17	21/01/17	Ca	pur	1/320	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-590	01/02/17	23/01/17		negatif	1/20	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-594	14/02/17	13/02/17	Ca	negatif	1/80	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-595	10/02/17	13/09/17		pur	1/320	negatif	negatif	1/320
BRU-2017-606	27/02/17	22/02/17		1/4	1/640	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-607	10/03/17	28/02/17		1/2	1/320	douteux	douteux	1/320
BRU-2017-610	16/03/17	15/03/17		pur	1/320	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-616	28/03/17	23/03/17		negatif	1/320	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-629	19/04/17	08/04/17		negatif	1/320	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-632	27/04/17	24/04/17		negatif	1/320	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-644	19/05/17	17/05/17		pur	ND	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-651	01/06/17	10/05/17		negatif	1/160	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-679	13/07/17	28/06/17		negatif	1/40	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-684	27/07/17	24/07/17		1/2	ND	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-707	09/08/17	11/07/17		1/2	1/160	douteux	negatif	1/640
BRU-2017-711	23/08/17	26/07/17	Ga	negatif	1/20	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-712	23/08/17	18/08/17	Ga	negatif	1/20	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-735	08/09/17	11/08/17		pur	1/160	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-765	23/10/17	24/10/17		negatif	1/20	negatif	negatif	negatif
BRU-2017-777	15/11/17	28/08/17		pur	1/80	negatif	negatif	1/320
BRU-2017-785	20/11/17	11/07/17	Tr	1/2	1/160	negatif	negatif	1/640
BRU-2017-786	20/11/17	26/07/17	Tr	1/2	1/160	negatif	negatif	1/640

EAT : résultat du Rose Bengale exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; SAW : résultat de la séroagglutination de Wright exprimé en dilution (dilution la plus élevée pour laquelle une agglutination est observée) ; IgG, IgM : Résultat de la quantification des IgG et IgM par chemiluminescence ; Brucellacapt : résultat de l'immunocapture (exprimé en dilution).

168 sérologies représentant 129 patients ont un résultat négatif.

2.6 Activités de séquençage

Le CNR *Brucella* n'a pas d'activité de séquençage génomique en routine. Les apports du séquençage sont négligeables pour le diagnostic et prise en charge de la brucellose humaine. Cependant, vu la grande conservation des séquences génomiques des *Brucella*, le séquençage génomique sera un outil précieux pour des études épidémiologiques en cas de cluster

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

- Non, seulement commercial

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

- Si OUI :

- Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; Interne
- Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...

Open source, PATRIC

- Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

- Si NON, est-ce prévu et à quelle échéance ? Pas encore. Seulement pour des études épidémiologiques en cas de cluster.

- Si OUI, pour quelles activités :

- Investigations d'épidémies ?
- Surveillance ?

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

- Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année

- Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

- Nombres de séquences réalisées dans l'année
- Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...

- Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastaq files) :

- Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales)
- Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans métadonnées associées

3 Activités de surveillance

3.1 Description du réseau de partenaires

- Description des partenaires ;

France métropolitaine et DOM (laboratoires hospitaliers principalement où se pratique la quasi-totalité des hémocultures et des prélèvements).

A priori tous les laboratoires disposent *via* le site Santé Publique France de l'information nécessaire pour contacter le CNR afin d'envoyer les souches et de demander des conseils. Le nombre de souches et de sérums reçus correspond au nombre de DO validées au niveau de Santé Publique France. On peut donc considérer que le réseau est quasi-exhaustif.

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

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

L'activité 2017 a été marquée par une légère hausse du nombre de cas par rapport à 2016. Cependant ce chiffre reste stable par rapport à la moyenne sur les 5 dernières années (24 cas par an en moyenne entre 2011 et 2016).

Les 30 patients se répartissaient entre 15 hommes et 13 femmes. La moyenne d'âge était de 50 ans [5 - 79]. Les cas de brucellose confirmés au CNR sont des cas importés à l'exception d'un cas car il s'agit d'une contamination de personnel de laboratoire.

On constate de façon générale que les pays du Maghreb figurent parmi les principales régions en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France. On peut expliquer cela par la présence d'une forte communauté Franco-Maghrébine en France qui séjourne ou ont un lien familial étroit dans les pays d'endémie/enzootie.

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

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

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

ND

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

ND

4 Alerte

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

1. un phénomène épidémique : les cas de brucellose en France sont habituellement sporadiques, en lien épidémiologique avec un pays d'endémie,
2. 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 pays indemne de brucellose bovine, ovine et caprine, la confirmation d'un cas autochtone impliquerait une action sanitaire vétérinaire immédiate,
3. la survenue de cas groupés de pneumonies à *Brucella* spp. pourrait enfin évoquer une action

malveillante.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Un nouveau site web (<http://www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/cnr-brucella.html>) a été mis en place. Nous avons également une nouvelle adresse E-mail (CNR.brucella@chu-nimes.fr), avec redirection automatique des messages reçu sur l'ancienne adresse (cnr.brucella@anses.fr). Afin de favoriser les communications entre le CNR et le LNR, l'équipe du LNR reçoivent les communications adressées au CNR.

Le CNR a une activité de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Les communications sont par E-mail sur l'adresse générique ou par téléphone. Nous recevons plusieurs questions chaque semaine.

En terme de formation, les Pr. Sotto et Lavigne donnent des cours magistraux en maladies infectieuses (et en particulier sur la brucellose) à la faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.

Enfin, J.P. Lavigne et A. Sotto ont conjointement participé à la rédaction du nouveau chapitre « *Brucella* » du POPI et du REMIC.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Le CNR répond à toute demande de conseil dans ses domaines de compétence.

Plusieurs fiches ont été établies en collaboration avec Santé Publique France et servent de base à l'information des laboratoires qui déclarent les cas de brucellose à Santé Publique France ou qui demandent une expertise diagnostique concernant cette maladie. Une fiche d'accompagnement des souches et autres prélèvements lors d'envoi au CNR a été établie. Ces documents ont été mis à jour pour tenir compte des évolutions du CNR et de la modification de la réglementation concernant les MOT. Le CNR, dispose d'une équipe de scientifiques et technicien, qui assure une permanence téléphonique 5 jours sur 7.

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

ND

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

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

Caractérisation de souches atypiques de *Brucella*

La gamme d'hôtes naturels des *Brucella* inclus désormais des poissons et des amphibiens. En collaboration avec l'Université du Texas, nous avons effectué la caractérisation génétique et phénotypique approfondie d'une souche isolée sur une grenouille et initialement identifiée comme *Ochrobactrum anthropi*. Cette souche appartient au groupe de *Brucella* dites « atypiques », qui inclut également les isolats cliniques de l'espèce *Brucella inopinata* (souches BO1 - infection d'implant mammaire - et BO2 - infection pulmonaire -). Comme pour BO2, cette souche semble posséder un LPS atypique, composé de rhamnose, probablement à l'origine de l'absence de réaction des tests classiquement utilisés en laboratoires de microbiologie pour identifier les *Brucella*. Une autre découverte majeure de cette étude est la motilité bactérienne démontrée pour plusieurs souches atypiques de *Brucella*, ce qui est remarquable pour ce genre bactérien.

Virulence de *Brucella*

Brucella est un pathogène intracellulaire facultatif, qui survie 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.

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, comme le système Tat (Twin Arginin Translocator).

Nous étudions par ailleurs l'importance de plusieurs facteurs de l'hôte dans la vie intracellulaire des *Brucella*. Nous étudions en outre le rôle du transporteur d'acides aminés CD98hc dans l'infection des trophoblastes, des cellules placentaires dans lesquelles la multiplication des *Brucella* pourrait être corrélée aux complications observées pendant la grossesse chez les femmes infectées (voir le § « Résultat de recherche non encore publiés »).

Identification des *Brucella* par MALDI-TOF MS

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a remplacé les méthodes classiques d'identification bactérienne dans la plupart des laboratoires de bactériologie. Un partenariat, signé avec l'industriel bioMérieux, avait pour objectif de permettre à ces appareils d'identifier des *Brucella*. Ce projet est essentiel car de nombreux cas d'exposition de personnels de laboratoire ont été rapportés après que des brucelloses aient été non diagnostiquées à cause de l'impossibilité des spectromètres MALDI-TOF d'identifier ce genre bactérien.

Dans une première partie de cette étude, publiée en 2016, nous avons mis au point un protocole d'inactivation des *Brucella* compatible avec le MALDI-TOF MS, afin d'éviter la contamination des personnels amenés à manipuler de telles souches. La deuxième partie du projet (décrite dans le § « Résultat de recherche non encore publiés ») a consisté à implémenter la base de données MALDI-TOF pour permettre l'identification des *Brucella*.

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

Publications internationales

Mailles A, Ogielska M, Kemiche F, Garin-Bastuji B, Brieu N, Burnusus Z, Creuwels A, Danjean MP, Guiet P, Nasser V, Tourrand B, Valour F, Maurin M, O'Callaghan D, Mick V, Vaillant V, Jay M, Lavigne JP, DE Valk H. *Brucella suis* biovar 2 infection in humans in France: emerging infection or better recognition? *Epidemiol Infect.* 2017 Oct;145(13):2711-2716.

Soler-Lloréns PE, Quance CR, Lawhon SD, Stuber TP, Edwards JF, Ficht TA, Robbe-Austerman S, O'Callaghan D, Keriel A. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical brucellae. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Sep 28;6:116. eCollection 2016.

Mailles A, Garin-Bastuji B, Lavigne JP, Jay M, Sotto A, Maurin M, Pelloux I, O'Callaghan D, Mick V, Vaillant V, De Valk H. Human brucellosis in France in the 21st century: Results from national surveillance 2004-2013. *Med Mal Infect.* 2016 Dec;46(8):411-418.

Mesureur J, Ranaldi S, Monnin V, Girard V, Arend S, Welker M, O'Callaghan D, Lavigne JP, Keriel A. A Simple and Safe Protocol for Preparing *Brucella* Samples for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. *J Clin Microbiol.* 2016 Feb;54(2):449-52.

(iii) Communications nationales

M. S. Hielpos, K B. Garcia Mendez, V Arce-Gorvel, J-P Gorvel, D O'Callaghan and A Keriél. *Brucella* infection impairs human trophoblasts functions (Infectiopole annual meeting, Marseille, July 2017).

García-Méndez KB, Arce-Gorvel V, Gorvel JP, O'Callaghan D and Keriél A. « *Infection of human placental cells by Brucella strains that caused abortions in baboons* » (Infectiopole annual meeting, Marseille, July 2016 and Ecole doctorale CBS2 annual meeting, 2016).

Soutenance de thèse de Karellen Garcia Mendez intitulée "Infection of human placental cells by *Brucella*" le 14/06/2017

(iv) *Communications internationales,*

Hielpos MS, García-Méndez KB Arce-Gorvel V, Gorvel JP, O'Callaghan D, Keriél A. *Brucella* infection impairs human trophoblasts functions. 70 th Annual Brucellosis Research Conference. Chicago, USA. December 2017.

P.F. Soler Llorens, C.R. Quance, S. Lawhon, T.P. Stuber, J. Edwards, T.A. Ficht, S.R. Austerman, D. O'Callaghan and A. Keriél. Characterization of an atypical *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Shows Characteristics Departing from Classical Brucellae. (7th Congress of European Microbiologists -FEMS-, Valencia, Spain,9-13 July, 2017)

García-Méndez KB, P.F. Soler Llorens, Arce-Gorvel V, Gorvel JP, O'Callaghan D and Keriél A. Infection of human trophoblasts by *Brucella papionis* : intracellular trafficking and consequences on trophoblasts functions (International Brucellosis Research Conference, New Delhi, Inde, 17-19 Nov 2016).

Keriél A *Characterization of an atypical Brucella spp. isolate from a Pac-Man Frog (Ceratophrys ornata) reveals characteristics departing from Classical Brucellae*" (International Brucellosis Research Conference, New Delhi, Inde, 17-19 Nov 2016).

(v) *Conférences sur invitations.*

Keriél A. *Brucella* infection impairs human trophoblasts functions" Université de Namur (Belgique) 19/12/2017

Keriél A Implémentation de la base de données pour permettre l'identification des *Brucella* Paris, le 23/11/2017 (invitation de bioMérieux, dans le cadre de la Réunion des utilisateurs du VITEK® Solution).

Keriél A *Préparation d'échantillons pour l'analyse des Brucella et autres pathogènes bactériens par MALDI-TOF MS* » (séminaire « Spectrométrie de masse pour l'identification des agents pathogènes animaux/zoonotiques » organisé par la commission de normalisation AFNOR/U47A "Santé animale" le 05/04/2016 ; invitée par Pascal BOIREAU, président de la Commission AFNOR U47a et Directeur du Laboratoire de santé Animale ANSES à Maisons-Alfort).

O'Callaghan D. Host factors in *Brucella*-cell interactions. CAHEC Qingdao China. 28/8/2017

O'Callaghan D. Vaccination against *Brucella* . CAHEC Qingdao China. 29/8/2017

O'Callaghan D. Genome analysis and evolution of *Brucella*. CAHEC Qingdao China. 29/8/2017

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

Le CNR est en étroite collaboration avec le Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort (Laboratoire National de Référence de *Brucella*). Les deux parties collaborent dans le domaine de l'information, de la formation, de la recherche et de l'appui scientifique et technique.

Cette collaboration avec le LNR, qui est également Laboratoire Européen de référence de la brucellose animale, contribue ainsi la surveillance et le contrôle de la brucellose humaine et animale.

A titre d'exemple, en 2017 nous avons reçu Mme Marion HOLZAPFEL (LNR *Brucella*, ANSES, Maisons Alfort) pendant 8 semaines afin de lui former en techniques d'analyse de virulence bactérienne.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Activités d'expertise

-le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer ;

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

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

La brucellose est présumée endémique en plusieurs pays d'Afrique, cependant les données du terrain sont très limitées. Nous aidons une équipe Nigérian à mettre en place une étude épidémiologique de la brucellose dans le nord-ouest de ce pays.

-les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu ;

Notre équipe a constitué la base de données de *Brucella* pour le système Vitek MS. Cette base devrait être disponible pour tous les centres possédant cet appareil prochainement. Nous allons continuer d'évaluer l'apport du MALDI-TOF MS dans l'identification de *Brucella* en particulier au niveau de l'espèce. Par ailleurs, nous allons approfondir l'utilisation du NGS dans le diagnostic et l'épidémiologie des brucelloses. Les progrès technologiques de ces dernières années permettent d'envisager de façon simple et peu coûteuse le séquençage des génomes bactériens. Cette technologie deviendra à moyen terme plus

rapide et plus économique pour générer *in silico* des données obtenues par PCR, MLST, et MLVA. Nous allons travailler avec nos collaborateurs bio-informaticiens (R Wattam, VBI et J Foster, UAz, USA) afin de créer les outils nécessaires pour une utilisation diagnostique. Cependant, *Brucella* et son ADN génomique sont classés en MOT et le transport de l'ADN sur la plateforme de séquençage nécessite une autorisation spécifique de l'ANSM, rendant l'accès au NGS plus compliqué et coûteux.

A présent nous n'avons pas de moyen par biologie moléculaire de distinguer entre les trois biovars de *B. melitensis*. Les techniques de bactériologie classique sont difficiles, compliqués et pas toujours fiables. Notre priorité est de développer des techniques basées sur les séquences génomiques.

Les techniques sérologiques et de biologie moléculaires évoluent sans cesse. Nous évaluerons les différents coffrets qui seront mis sur le marché français (voir européen) afin d'établir les sensibilités, spécificités de ces techniques.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions qui nous sont dévolues en tant que CNR sont :

1 Apporter une expertise microbiologique :

Contribuer au développement de nouvelles techniques diagnostiques, à leur évaluation et à leur diffusion,
Apporter son expertise aux laboratoires de biologie médicale pour le diagnostic des brucelloses (isolement, détermination de l'espèce, confirmation du diagnostic sérologique),

Collaborer avec des laboratoires experts en santé animale (échange d'informations, échanges de souches, comparaison des caractéristiques des souches d'origine humaine, alimentaire et animale, développement d'études en commun, etc.).

2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec Santé Publique France :

En développant un réseau de laboratoires collaborateurs sur l'ensemble du territoire,

En signalant à Santé Publique France les cas identifiés au CNR,

En contribuant à l'investigation des cas groupés,

En collaborant avec les réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

3 Contribuer à l'alerte :

En signalant à Santé Publique France tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), introduction de souches habituellement non présentes en France, etc.

4 Contribuer aux travaux du réseau national des laboratoires Biotox :

Apporter son expertise spécifique au service des instances concernées de santé publique, de défense et de sécurité nationale ;

Contribuer avec les instances chargées de leur pilotage, à l'animation du réseau des laboratoires Biotox ;

Contribuer à la mise en place d'une collection nationale de souches des agents de la menace pour les besoins de la biodéfense.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

En 2017, les effectifs du CNR des *Brucella* étaient les suivants : 1.40 ETP (équivalent temps plein). M Ludovic DESMIER a été recruté comme technicien par le CHU de Nimes pour les activités de diagnostic et recherche du CNR. Les Dr. O'CALLAGHAN et Pr. LAVIGNE sont impliqués au quotidien dans cette activité pour la réalisation du diagnostic sérologique, la validation des résultats techniques, l'interprétation des tests diagnostiques et la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs. Les Drs Anne KERIEL, Christine FELIX ainsi que plusieurs post docs et étudiants en thèse sont également impliqués dans les activités de recherche fondamentale du CNR.

Le Pr. SOTTO (PU-PH Maladies Infectieuses et Tropicales) et le Pr. LAVIGNE fournissent des conseils thérapeutiques et médicaux. Ils effectuent également le recueil des renseignements cliniques et épidémiologiques, et l'élaboration des comptes rendus adressés à Santé Publique France

Organigramme

Directeur: Dr David O'Callaghan

Co-Directeur - Responsable médical & biologique: Pr Jean-Philippe Lavigne

Responsable médical: Pr Albert Sotto

Responsables recherche: Dr David O'Callaghan, Dr Anne Keriél, Dr Christine Félix

Technicien: Ludovic Desmier

L'activité de CNR-*Brucella* est réalisée au sein de l'INSERM U1047 à l'UFR de Médecine Montpellier-Nîmes sur le campus du Groupe Hospitalo-Universitaire Carémeau à Nîmes. Ce laboratoire s'étend sur une surface approximative de 700 m². L'accès au laboratoire est contrôlé par badge magnétique. Nous disposons actuellement des équipements suivants :

- un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3), équipé de 3 PSM type II, de deux étuves bactériologiques (une étuve bactériologique avec agitation et une étuve à CO₂ permettant la culture des micro-organismes de classe 3), 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 badge magnétique.

- deux laboratoires NSB2, avec 3 PSM type II, des étuves bactériologiques (statique et avec agitation) et une étuve à CO2 et un microscope inversé,

Un laboratoire BSB2 culture cellule avec 2 PSM type II et une étuve à CO2

-Pour les techniques de sérologie, le laboratoire est équipé d'agitateurs de plaque, d'un automate Virclia permettant le dosage immunologique des anticorps anti-*Brucella* par chimiluminescence, d'un lumino/fluorimètre (Bethhold Mithras), d'un secteur de sérologie équipé d'un microscope à fluorescence (Leica) contenant un prisme de normarski, 5 filtres différents et une camera CCD Roper Coolsnap Fx

- de nombreux équipements de biologie moléculaire : 1 extracteur d'ADN Quiacube (Qiagen) 4 thermocycleurs, un appareil de PCR en temps réel (Light Cycler 480 Roche), un système de bioanalyseur (Agilent) pour l'utilisation de la technologie Diversilab®, un spectromètre de masse MALDI-TOF (VITEK MS, bioMérieux) mis à disposition par bioMérieux, Un lecteur Infrarouge (Odyssey, Licor) pour Southern, Northern et Western Blots est également disponible.

- des outils d'imagerie cellulaire : un cytomètre en flux (MACSQuant VYB, Myltenyi) équipé des lasers 405, 561 et 488nm et d'un robot passeur de microplaque, un microscope à fluorescence (Leica) et un microscope confocal (Fluoview FV10i, Olympus).

1.3 Collection de matériel biologique

○ Souchothèque

Le CNR dispose d'une grande collection de *Brucella*, dont toutes les souches de référence ATCC ainsi que les souches atypiques (*B. inopinata* BO1, *B. inopinata*-like BO2, *B. microti*, *B. papionis* et des isolats provenant de rongeurs australiens et de batraciens). Nous avons également une collection de souches provenant de mammifères marins, et plusieurs isolats cliniques et vétérinaires. Cette collection a été déclarée annuellement à l'ANSM depuis 2012 et régulièrement contrôlée dans le cadre de l'application relative *micro-organismes et toxines hautement pathogènes*.

. La collection CNR pour l'année 2017 se compose de 16 souches. Les souches sont stocké à -80°C et en Back up à -20°C en bouillon glycérolé (conservation supérieure à 30 ans).

○ Sérothèque

Actuellement, nous disposons de 810 sérums/LCR humains. La sérothèque a vu son nombre augmenter de 212 sérum pour l'année 2017. La sérothèque est actuellement conservée à -20°C dans notre unité INSERM 1047.

1.5 Démarche qualité

Le laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes (dirigé par le Pr Lavigne) suit la démarche d'accréditation des Laboratoires (ISO15189) menée au sein du CHU. L'ensemble des procédures

analytiques sont établies et validées. Les CIQ sont déterminées et colligées pour chaque sérum testé. Une métrologie du réfrigérateur et du congélateur est établie. La traçabilité de la réception au rendu de résultat est également mise en place.

L'U1047, suite au dépôt d'une demande d'autorisation auprès de l'ANSM conformément au nouveau dispositif réglementaire relatif aux microorganismes et toxines hautement pathogènes, a fait l'objet en Janvier 2013 d'une inspection de l'ANSM en matière de sécurité et sûreté biologiques (« Microorganismes et Toxines »). Le laboratoire a reçu les autorisations ADE-023932012-5 et AMO-032762013-8.

En Novembre 2017, l'ANSM est venu inspecter l'Unité de recherche Virulence bactérienne et maladies infectieuses, INSERM 1047-CNR *Brucella*, afin d'apprécier le respect des disposition législatives et réglementaire relative aux activités et aux produits mentionnés à l'article L.5311-1 du code de la santé publique, dont l'emploi serait de nature à présenter un risque pour la santé publique. Le laboratoire a reçu les autorisations ADE-02396585, ADE-087212017-2 et AMO-5858254-8.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Techniques diagnostiques

*Sérologie

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 en tube de Wright (**W**),
- le test d'agglutination sur lame au Rose Bengale (**RB**) et,
- deux tests permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella* de type IgM et/ou IgG (immuno-chromatographie et immuno-capture).

La stratégie sérologique est basée préférentiellement sur le titre du Rose Bengale (RB), dont le seuil de positivité est estimé $\geq 1/4$. Pour confirmer ce diagnostic, nous utilisons la détection d'IgM et IgG par immunochromatographie et immunocapture. Les dosages d'Ig permettent de parfaitement dater l'épisode (brucellose débutante : IgM positif, IgG négatif ; brucellose aiguë : IgM positif, IgG positif ; brucellose subaiguë : IgM négatif, IgG positif).

*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 outils de biologie moléculaire sont devenus la référence actuellement pour l'aide au diagnostic.

Spectrométrie de Masse

Les souches suspectes de *Brucella* reçues au CNR seront identifiées par MALDI-TOF en utilisant la base de données RUO BioMérieux. Une confirmation par des tests d'agglutination avec des anticorps spécifiques et de la biologie moléculaire est réalisée ensuite.

*Recherche de *Brucella* par PCR en temps réel. Elle sera réalisée selon différentes techniques :

16S rRNA Amplification et séquençage de 16S rRNA

Cible : séquence IS711 / 6501, *bcs*p31 et *per*

Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B, 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs*p31 and *per* target genes. *Veterinary Microbiology*, **137**:156-164.

Bruce-ladder modifiée (García-Yoldi *et al.*, 2006 ; López-Goñi *et al.*, 2011) 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) ;

Suis-ladder, pour la différenciation des biovars de *B. suis* ;

Analyse de VNTR (MLVA - Le Flèche *et al.*, 2006), panels 1 et 2 permettant une analyse épidémiologique des souches (cas humains/foyers ou cas animaux ; cas humains reliés).

Actuellement, il n'existe aucun marqueur stable ni validé permettant d'identifier des souches variantes au sein du même biovar de *Brucella abortus*, *melitensis* ou *suis*.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sérologie

- le test d'agglutination en tube de Wright (W),
- le test d'agglutination sur lame au Rose Bengale (RB)

Bactériologie

- la manipulation de *Brucella* doit être minimisée et réservée au CNR/LNR.