

Rapport annuel d'activité

2019

**Centre de national de référence
*Brucella***

**Année d'exercice
2018**

Résumé analytique

En 2018, 25 cas de brucellose ont été notifiés par le CNR à Santé Publique France. Le CNR a traité 47 prélèvements ou souches bactériennes durant l'année et a traité 198 sérums ou LCR, pour sérodiagnostic ou confirmation.

Au total, en France métropolitaine pour l'année 2018, 25 cas ont été confirmés par le CNR, dont 23 par identification/isolement de la souche, 1 par PCR et 1 par sérologie uniquement. Le CNR a confirmé, par sérologie, 6 des 23 cas pour lesquels la souche a été identifiée comme appartenant au genre *Brucella*.

La PCR multiplexe « Bruce Ladder » a montré que toutes les souches identifiées appartenaient à l'espèce *B. melitensis*, à l'exception d'une souche appartenant à l'espèce *B. abortus*. Cette dernière souche a été isolée chez un patient vivant en France métropolitaine et dont la profession était éleveur bovin. Il s'agissait certainement d'une réactivation d'une Brucellose contractée ultérieurement.

Parmi les 25 patients ayant une brucellose, il y avait 15 hommes et 10 femmes. La médiane d'âge était de 50 ans [3 - 85]. La distribution ne varie pas notablement par rapport à celle observée précédemment. Aucun cluster n'a été identifié en 2018 et un cas de contamination en laboratoire a été rapporté ; tous les autres cas de brucellose, diagnostiqués ou confirmés au CNR, étaient des cas importés sauf pour le patient éleveur ayant une réactivation d'une ancienne Brucellose à *B. abortus*)

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 isolée : l'Algérie (9), l'Asie /Tibet (2), la Tunisie (2), l'Arabie Saoudite (1), l'Egypte (1), le Koweït (1), et le Liban (1).^[1]

[1]

In 2018, 25 cases of brucellosis were reported by the CNR to Santé Publique France.

In 2018, the CNR performed bacteriological analysis on 47 samples or strains in 2018. Brucellosis serology was performed on a total of 198 sera or CSF for diagnosis or confirmation. In total, in mainland France for the year 2018, 25 cases were confirmed by the CNR; 23 cases by identification / isolation of the strain, 1 by PCR and 1 by serology only. The CNR serologically confirmed 6 out of 23 cases for which the strain was identified as belonging to the genre *Brucella*.

“Bruce Ladder” Multiplex PCR showed that all of the strains except 1 were *B. melitensis*. The exception was a *B. abortus* strain, isolated from a retired cattle farmer living in metropolitan France. This is certainly a reactivation of a brucellosis contracted in the past.

The age and sex distribution (15 men and 10 women and a median age: 50 years [3 - 85]) is similar to that observed in previous years.

No cluster was identified in 2018 and only one case of laboratory contamination was reported. All other cases of brucellosis, diagnosed or confirmed at CNR, were imported cases, except for the case of reactivation of an old *B. abortus* brucellosis in a breeder.

Countries (or regions) suspected of being the site of contamination (travel or visiting family/friends in an endemic / enzootic country):

- *B. melitensis*: Algeria (9), Asia/Tibet (2), Tunisia (2), Egypt (1), Kuwait (1), Lebanon (1) and Saudi Arabia (1).

1 Missions et organisation du CNR

Depuis Janvier 2017, le service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière 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 2018, les effectifs du CNR des *Brucella* étaient les suivants : 1.40 ETP (équivalent temps plein). M Ludovic DESMIER, technicien de laboratoire au CHU de Nîmes, assure les activités de diagnostic et de recherche du CNR. Le Dr. O'CALLAGHAN et le Pr. LAVIGNE sont impliqués au quotidien dans cette activité pour la réalisation du diagnostic sérologique, la validation des résultats techniques, l'interprétation des tests diagnostiques, et la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs. En addition, les Drs David O'CALLAGHAN, Anne KERIEL, Soledad HIELPOS et Flavia HAUSENAUR ainsi que deux doctorantes, sont impliquées dans les activités de recherche du CNR.

Le Pr. SOTTO (PU-PH Maladies Infectieuses et Tropicales) et le Pr. LAVIGNE fournissent des conseils thérapeutiques et médicaux dans la prise en charge des patients et la surveillance des personnels de laboratoires. Le Pr. SOTTO reçoit en consultation les patients suspects de brucellose adressés par des confrères. Les Pr. SOTTO et LAVIGNE effectuent également le recueil des renseignements cliniques et épidémiologiques, et l'élaboration des comptes rendus adressés à Santé Publique France.

L'organigramme

Directeur	David O'CALLAGHAN (DR2 INSERM)
Co-directeur	Jean-Philippe LAVIGNE (PU-PH Bactériologie)
Conseil clinique	Albert SOTTO (PU-PH Maladies infectieuses et tropicales)
Recherche fondamentale	Anne KERIEL (CR INSERM) Christine FELIX (IE UM) jusqu'à Mai 2018 Soledad HIELPOS (post-doctorante) jusqu'à Janv. 2019 Flavia HAUSENAUR (post-doctorante) depuis Nov. 2018 Elia RIQUELME (doctorante) Sonia VECTION (doctorante) depuis Oct. 2018
Technicien de Laboratoire	Ludovic DESMIER (Tech CHU Nîmes)

2 Activités d'expertise

Le CNR a, en 2018, apporté son appui aux laboratoires d'analyse et de biologie médicale et aux laboratoires hospitaliers pour l'isolement et l'identification présomptive des *Brucella*. Il est, à ce titre, le destinataire exclusif des souches suspectées d'appartenir au genre *Brucella* par les laboratoires. Le CNR met également en œuvre, le cas échéant, des outils moléculaires de détection (PCR), lorsque, en particulier, les tentatives d'isolement par les méthodes bactériologiques classiques n'ont pas donné de résultat malgré une forte suspicion (selon le tableau clinique et/ou épidémiologique). Il est également, à ce titre, le destinataire des prélèvements destinés à la recherche directe de *Brucella* ou de leurs acides nucléiques et du sérodiagnostic. Dans le cadre de l'accréditation COFRAC des laboratoires, le service de Microbiologie du CHU de Nîmes est accrédité selon la NF EN ISO15189. Dans le champ de cette accréditation, sont inclus, l'identification bactérienne de souches (par MALDI-TOF), la biologie moléculaire et la sérologie.

2.1 Évolutions des techniques

Identification de *Brucella* dans les prélèvements biologiques (Sang, Plasma, sérum, LCR, biopsie, ...)

Le CNR *Brucella* utilise le séquençage du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (16S rRNA) pour la détection de *Brucella* dans les prélèvements biologiques. Nous adoptons une approche large spectre, en ciblant le gène 16S ARNr commun à toutes les bactéries, pour l'amplification par PCR. Les amplicons sont ensuite séquencés et leur séquence comparée avec les séquences de GenBank par BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Le CNR a mis en place au sein du laboratoire une PCR multiplexe, 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).^[1] 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

Notre CNR évalue actuellement le système Virclia (Orgentec). Il est comparé avec les autres techniques de diagnostic sérologique de *Brucella*. L'avantage de cet appareillage est son marquage CE, une automatisation des analyses, une reproductibilité des résultats et une traçabilité complète des lots de réactifs et des analyses. Son inconvénient, propre aux techniques de sérologie *Brucella*, est sa spécificité. De plus, notre CNR évalue l'intérêt diagnostique de l'utilisation de la dilution du test au Rose Bengale dans la brucellose (Diaz R et al., PLoS Negl Trop Dis 2011). L'ensemble des résultats sera analysé en fin d'année 2019.

Par ailleurs, notre CNR a mis en place une base de données des spectres obtenus pour l'identification de *Brucella* sp. par la technique du MALDI-TOF en 2017. Nous avons pu, en 2018, éprouver la fiabilité et l'exhaustivité de cette base de données pour les souches reçues pour identification. Toute identification de souches envoyées au CNR a été réalisée en parallèle par spectrométrie de masse et biologie moléculaire. Dans 100% des cas, les souches identifiées par

MALDI-TOF comme appartenant au genre *Brucella* étaient bien classées. De même, toutes les souches n'appartenant au genre *Brucella* ont été confirmées par PCR 16S rDNA comme n'appartenant pas à ce genre. Cette base de données a fait partie de la dernière mise à jour du Vitek MS® (bioMérieux, Marcy l'Etoile).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

N/A

2.4 Collections de matériel biologique

Le CNR dispose, depuis 2017, de 38 isolats bactériens comprenant 36 souches de *Brucella melitensis*, 1 souche de *Brucella suis*, et 1 souche de *Brucella abortus*. Le CNR a vu son nombre de souches augmenter de 23 au cours de l'année 2018. Cette collection est stockée dans un congélateur à -80°C dans l'enceinte du CNR.

Le CNR dispose de 1008 sérums ou Liquides céphalo-rachidiens (LCR). Le CNR a expertisé 198 sérum/LCR en 2018, pour sérodiagnostic ou confirmation. Cette collection est stockée dans un congélateur à -20°C dans l'enceinte du CNR.

2.5 Activités d'expertise

Méthodes d'identification directes

Souches et prélèvements reçus

En 2018, 25 cas de brucellose ont été déclarés et validés par Santé Publique France ; tous les cas ont été déclarés en France métropolitaine. Ce nombre est à peu près stable depuis plus de 10 ans (**Tableau 1** et **Figure 1**).

L'activité 2018 a été marquée par une légère baisse du nombre de cas par rapport à 2017 mais ce chiffre reste stable par rapport à la moyenne sur les 5 dernières années (24 cas par an en moyenne entre 2011 et 2017).

Le CNR a eu à traiter 51 prélèvements (confirmation de souches bactériennes, diagnostic direct) concernant 51 patients en 2018, provenant majoritairement de France métropolitaine. Au total, ces dossiers ont concerné 24 souches bactériennes et 27 prélèvements.

Vingt-trois souches appartenant au genre *Brucella* ont été définitivement identifiées au CNR sur

l'année isolées chez 23 patients différents (**Tableau 2**). Toutes ces souches ont été confirmées comme appartenant à l'espèce *B. melitensis* (n=22, 96%), à l'exception d'une seule souche de *B. abortus* (4%).

Parmi les 23 souches qui ont été identifiées comme appartenant au genre *Brucella*, 20 souches (87%) ont été isolées dans des flacons d'hémocultures, 2 dans des liquides articulaires (10%), et 1 issue d'une biopsie de genou (sur tuméfaction) (3%).

Une biopsie osseuse a permis la mise en évidence par PCR d'une possible infection par *Brucella* sp. La culture bactérienne n'a pas permis d'isoler cette bactérie. Le diagnostic a été retenu sur les données épidémiocliniques du patient.

Figure 1. Cas de brucellose déclarés annuellement en France entre 1995 et 2018

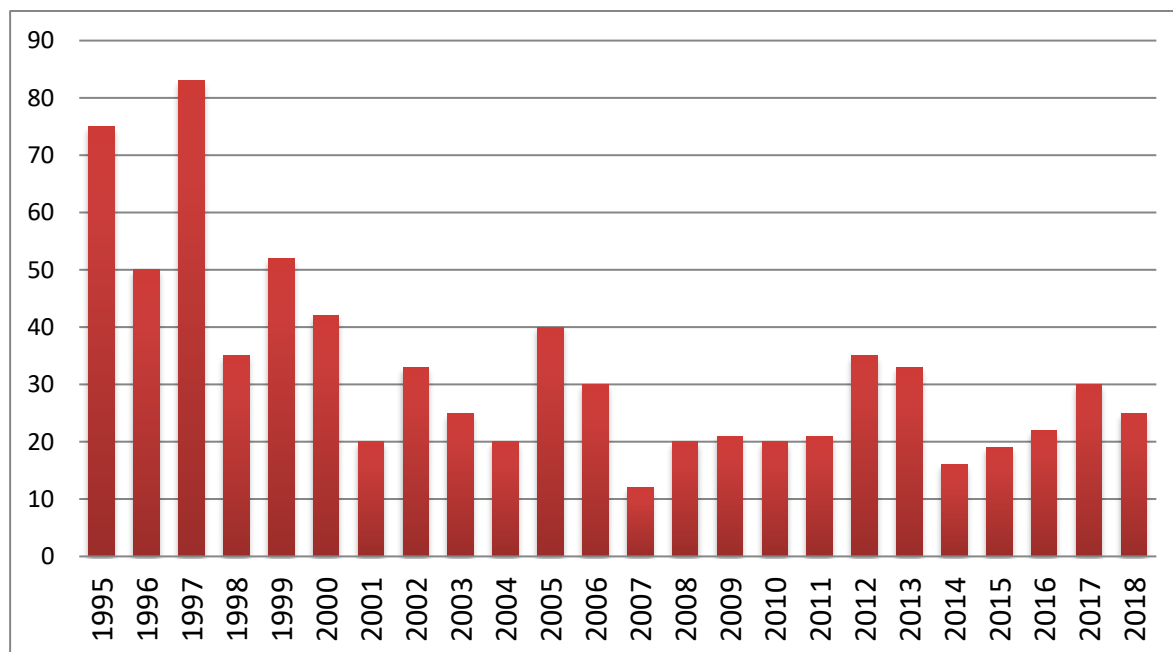


Tableau 1. Bilan des cas de brucellose confirmés au CNR et à Santé Publique France depuis 2002

	2002-2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
Nombre de cas de brucellose*	72**	40	30	14	21	22	20	21***	32***	29***	16***	19***	22***	30	25	
Cas confirmés par isolement de <i>Brucella</i> (identifiées et typées au CNR) ou PCR	Isolation	59	38	23	11	15	22	18	24	23	20	12	17	21	27	23
	PCR uniquement	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	1	1
Cas confirmés par sérologie uniquement au CNR	ND	2	7	3	5	0	2	0	6	8	2	1	2	1	1	

*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

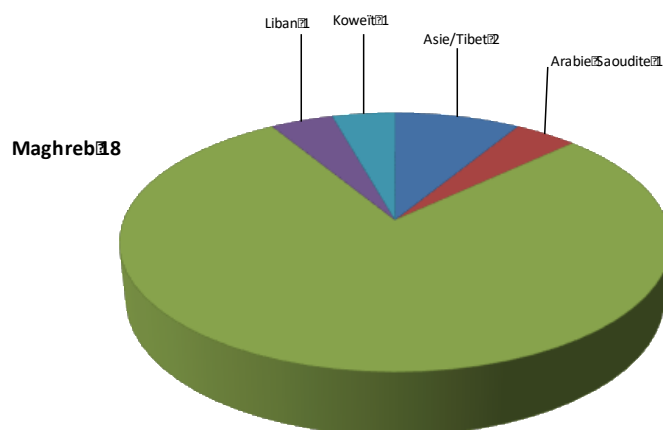
Tableau 2. Souches reçues et isolées au CNR des *Brucella*

N°DossierCNR *	Date de réceptionCNR	Nom	Age	sejourpaysàrisques	Source d'isolement du prélèvement	Identification	Sérum analysé	confirmation par sérologie
BRSO-2018-036	08/02/2018		1944	Tunisie	Liquide Articulaire	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-037	03/03/2018		1959	tour du monde/Asie	Osseux	<i>Brucella</i> sp.	Non	Non
BRSO-2018-043	18/04/2018		1991	Egypte	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-045	30/04/2018		1939	France	Biopsie de genou	<i>Brucella abortus</i>	Non	Non
BRSO-2018-048	15/05/2018		2006	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-049	23/05/2018		1966	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-050	22/05/2018		1938	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-051	11/06/2018		1952	Koweït	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-055	13/07/2018		1977	Tunisie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-056	03/08/2018		1963	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-057	25/07/2018		1994	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-063	20/09/2018		1988	Tibet	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-064	04/10/2018		2015	Arabie Saoudite	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-065	05/10/2018		1990	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-066	11/10/2018		1989	France	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-068	15/10/2018		1956	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-070	10/11/2018		1942	Algérie	Liquide Articulaire	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-073	23/11/2018		1957	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-074	27/11/2018		2005	Liban	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-075	28/11/2018		1933	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-77	11/12/2018		1950	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-78	13/12/2018		1986	Maghreb	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Oui	Oui
BRSO-2018-80	27/12/2018		1948	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non
BRSO-2018-81	16/01/2019		1939	Algérie	Hémoculture	<i>Brucella melitensis</i>	Non	Non

Tableau 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 (2002-2018)

Origines probables des cas traités au CNR	Année																
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Contamination en 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	-
Caucase (Arménie, Azerbaïdjan)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
Maghreb	2	6	5	7	9	4	4	11	7	7	8	7	5	4	9	15	17
Proche et Moyen Orient	-	2	1	3	2	-	-	1	1	4	-	-	2	4	2	2	1
Asie (Inde et Golfe Persique)	2	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	1	2
Asie Centrale (Kazakhstan)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Asie (Chine)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	2
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 (Polynésie Française-Wallis-et-Futuna)																	
Polynésie (<i>B. canis</i>)	1	2	2	1	1	1	1	-	-	-	3	1	-	1	-	-	-
Contamination en France métropolitaine																	
Contamination de laboratoire	-	1	-	5	3	-	-	1	2	-	1	1	3	-	-	1	1
Contamination (<i>B. suis</i> 2 (exposition sangliers de l'évres)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	2	-	-
Rechute de contamination France (<i>B. abortus</i> ou <i>B. melitensis</i>)	2	1	1	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-	-	1	-	1
Non renseigné	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-
Total	19	24	16	38	23	12	18	22	18	24	28	20	12	18	22	29	24

Figure 2. Pays en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France pour l'année 2018



Les cas de brucellose confirmés au CNR sont des cas importés (n=22, 96%) à l'exception d'un cas de contamination de personnel de laboratoire. On constate, de façon générale, que les pays du Maghreb représentent la principale région du Monde en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France (n=17, 77%) et plus largement le pourtour du Bassin Méditerranéen (n=18, 82%) (**Figure 2**). On peut expliquer cette constatation par les liens très étroits entre ces pays et la France, la forte communauté Franco-Maghrébine résidant en France et la proximité de ces pays pour des voyages touristiques. Ces pays demeurent toujours des pays d'endémie/enzootie pour la brucellose humaine (en particulier du fait de consommation de lait de chèvre).

Méthodes de diagnostic indirectes

En 2018, le CNR a expertisé 198 échantillons de sérum. Notre objectif principal était d'investiguer les suspicions de brucellose non confirmées par culture.

Un patient a été identifié comme ayant une infection fortement probable par *Brucella* sur la base du tableau clinique, de l'épidémiologie et du résultat des deux sérologies réalisées (**Tableau 4**).

Tableau 4. Cas de brucellose confirmé par sérologie uniquement

N°dossier CNR	Date d'envoi	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2018-954	21/11/18	G	1/4	1/80	Négatif	19.9	1/320
BRU2018-994	29/12/18	G	1/4	1/80	0.4+	18.4	1/320

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) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultat de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultat de la détection des IgM et des IgG par immunocapture (exprimé en dilution).

Six sérologies positives ont été confirmées par l'isolement/confirmation d'une souche de *Brucella* chez les patients, représentant 6 cas de brucellose (**Tableau 5**).

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

N°dossier CNR	Date d'envoi	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellacapt	Souche
BRU2018-849	25/05/18		1/32	>1/2560	5,8	12,5	>1/5120	<i>B. melitensis</i>
BRU2018-855	07/06/18		1/16	1/160	5,7	12,3	>1/5120	<i>B. melitensis</i>
BRU2018-861	22/06/18		>1/32	>1/2560	4,8	8,4	>1/5120	<i>B. melitensis</i>
BRU2018-877	23/07/18		>1/32	>1/2560	10,8	8,0	>1/5120	<i>B. melitensis</i>
BRU2018-977	11/12/18		Pur	1/80	3,9	10,2	1/160	<i>B. melitensis</i>
BRU2018-993	29/12/18		>1/64	>1/2560	3,7	11,7	>1/5120	<i>B. melitensis</i>

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) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultat de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultat de la détection des IgM et des IgG par immunocapture (exprimé en dilution).

Cinq sérologies représentant 5 cas distincts sont restées douteuses (contexte épidémio-clinique non évocateur) (**Tableau 6**).

Tableau 6. Cas de patients ayant un résultat sérologique douteux.

N°dossier CNR	Date d'envoi	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellapt
BRU2018-837	19/04/18		1/16	1280	4,8 +	2,4 +	>1/5120
BRU2018-843	14/05/18		Pur	1/320	2.1 +	3.5 +	1/320
BRU2018-844	14/05/18		1/4	1/640	3.0 +	Négatif	1/640
BRU2018-880	23/07/18		Négatif	1/640	1.9 +	2.3 +	Négatif
BRU2018-928	18/10/18		Pur	1/80	3,3 +	Négatif	Négatif

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) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultat de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellapt : Résultat de la détection des IgM et des IgG par immunocapture (exprimé en dilution).

Par ailleurs, 45 sérologies prélevées chez 37 patients ont vu leurs résultats sérologiques considérés comme des « faux positifs » par réaction croisée (**Tableau 7**).

Tableau 7. Cas de sérologies considérées comme faussement positives.

N°dossier CNR	Date d'envoi	Patient	EAT	SAW	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU2018-800	10/01/18	P	1/4	1/320	4,2+	10.6	1/1280
BRU2018-804	10/01/18	Fe	Pur	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-805	17/01/18	P	1/2	1/320	3.3+	9.5	1/1280
BRU2018-809	18/01/18	R	Pur	1/320	3.1	1.7	1/320
BRU2018-811	01/02/18		Pur	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-812	01/02/18		Négatif	1/320	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-819	17/02/18	L	1/2	1/160	3.4	8.4	1/640
BRU2018-820	17/02/18	L	Pur	1/80	qi	qi	1/320
BRU2018-821	17/02/18		Pur	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-822	21/02/18	Fe	Pur	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-828	30/03/18		1/2	1/80	4,3+	3,6+	1/640
BRU2018-830	18/04/18		Négatif	1/40	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-831	18/04/18	Li	1/4	1/80	Négatif	10.8+	1/320
BRU2018-832	18/04/18	Li	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-834	18/04/18	R	Pur	1/80	1.3	1.6	1/320
BRU2018-838	20/04/18	Ro	Négatif	Négatif	1.1+	Négatif	Négatif
BRU2018-839	20/04/18	Lo	Pur	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-840	25/04/18	G	Pur	1/40	Négatif	Négatif	1/320
BRU2018-841	25/04/18	Ro	Négatif	Négatif	1.1+	Négatif	Négatif
BRU2018-845	14/05/18		Négatif	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-848	14/05/18		Négatif	Négatif	Douteux	Négatif	Négatif
BRU2018-856	07/06/18	G	Pur	1/80	Négatif	Négatif	1/320
BRU2018-859	22/06/18		Négatif	1/160	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-860	22/06/18		Pur	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-874	12/07/18		Négatif	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-876	23/07/18		Négatif	1/640	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-879	23/07/18		Négatif	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-881	23/07/18		Pur	1/40	Négatif	3.9	Négatif
BRU2018-895	12/09/18		Négatif	Négatif	Négatif	1.34	Négatif
BRU2018-898	12/09/18		Pur	1/40	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-907	27/09/18	D	Négatif	1/160	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-909	27/09/18		1/2	1/160	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-923	18/10/18		Négatif	1/320	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-926	18/10/18	D	Négatif	1/40	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-927	18/10/18		Négatif	1/40	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-930	18/10/18		Négatif	1/320	Négatif	Douteux	Négatif
BRU2018-935	26/10/18	Lo	Négatif	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-938	26/10/18		Négatif	1/160	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-947	08/11/18		Négatif	1/80	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-948	08/11/18		Négatif	1/40	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-965	30/11/18		Négatif	1/20	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-966	30/11/18		Pur	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
BRU2018-972	30/11/18		Négatif	Négatif	Négatif	Douteux	Négatif
BRU2018-978	11/12/18		Négatif	Négatif	Négatif	2.5	Négatif
BRU2018-997	29/12/18		1/2	1/160	Douteux	Négatif	Négatif

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) ; Dosage des IgM et des IgG : Résultat de la quantification des IgM et des IgG par chemiluminescence ; Brucellacapt : Résultat de la détection des IgM et des IgG par immunocapture (exprimé en dilution).

Enfin, 140 sérologies effectuées chez 126 patients ont eu un résultat négatif.

2.6 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. Le séquençage réalisé au sein du CNR a concerné le gène codant pour l'ADNr 16S amplifié par PCR. Ce séquençage a été effectué par NGS sur le plateau de Biologie Moléculaire du CHU de Nîmes. Dans le futur, il est probable que, du fait de la grande conservation des séquences génomiques des *Brucella*, le séquençage génomique complet sera un outil précieux pour des études épidémiologiques en cas de cluster ou dans les caractérisations génotypiques des isolats atypiques.

3 Activités de surveillance

3.1 Description du réseau de partenaires

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

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

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

L'activité 2018 a été marquée par une légère baisse du nombre de cas par rapport à 2017. Cependant, ce chiffre reste stable par rapport à la moyenne sur les 5 dernières années (24 cas par an en moyenne entre 2011 et 2017).

Les 25 cas de brucellose concernaient 25 patients dont 15 hommes et 10 femmes. La médiane d'âge était de 50 ans [3-85]. Les cas de brucellose confirmés au CNR étaient majoritairement des cas importés (n=23). Les deux autres cas concernaient une contamination de personnel de laboratoire et un patient éleveur ayant une réactivation d'une ancienne Brucellose à *B. abortus*.

Très majoritairement (74%), les pays du Maghreb et plus largement le pourtour du Bassin Méditerranéen (n=18, 82%) représentent les principales régions en lien épidémiologique avec les cas de brucellose détectés en France. On peut expliquer cette constatation par les liens très étroits entre ces pays et la France, la forte communauté Franco-Maghrébine résidant en France et la proximité de ces pays pour des voyages touristiques. Ces pays demeurent toujours des pays d'endémie/enzootie pour la brucellose humaine (en particulier du fait de consommation de lait de chèvre).

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

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

Cependant, le CNR en effectué en 2018 des antibiogrammes sur les différents isolats cliniques reçus et sur des souches rares de collection (*B. inopinata* et *B. inopinata*-like), afin de surveiller l'absence d'acquisition de résistance aux antibiotiques chez *Brucella* (Tableau 8). Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé (gélose au sang) en utilisant des disques d'antibiotiques. Aucune résistance n'a été identifiée : l'ensemble des isolats français étaient sensibles à la doxycycline, à la rifampicine, aux aminosides, au cotrimoxazole et aux fluoroquinolones.

Tableau 8. Exemples des données d'antibiogrammes sur isolats de *Brucella* sp. isolés en France et sur des souches de référence (mesure du diamètre d'inhibition en mm)

	RIFACINS	TETRACYCLINS	AMINOGLYCOSIDES		DIAMINOPYRIMIDINE + SULFAMIDE	FLUOROQUINOLONES		B-LACTAMS	
	Rifampicin (RAM)	Tetracylin (TET)	Gentamycin (GMI)	Amikacin (AMK)	Trimethoprim + Sulfamethoxazol (SXT)	Ciprofloxacin (CIP)	Ofloxacin (OFX)	Amoxicilin (AMX)	Amoxicilin + Clavulanic
Strain name (description)	cut-off: ≥ 18	cut-off: ≥ 15	cut-off: ≥ 17	cut-off: ≥ 16	cut-off: ≥ 14	cut-off: ≥ 24	cut-off: ≥ 22	cut-off: ≥ 19	cut-off: ≥ 19
BO1 (human, <i>B. inopinata</i> , bIN1091)	32	43	23	22	28	35	32	40	40
BO2 (human, <i>B. inopinata</i> -like, bIN1092)	32	50	24	24	20	24	24	50	42
16M (<i>B. melitensis</i> bv1 reference strain, bIN1000)	40	45	32	32	42	40	32	52	49
BRSO-2019-087 (<i>B. melitensis</i> , clinical strain)	38	55	32	32	34	36	30	54	50

Afin de se préparer éventuellement à l'apparition de rares cas de résistances aux antibiotiques, nous avons mis en place une collaboration avec l'Universidade Fédéral de Lavras (Brazil) et le Sanger Centre (UK) pour le séquençage et l'analyse des génomes de 55 souches de *B. abortus* montrant des résistances isolées au Brésil.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Non applicable

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Non applicable

4 Alerte

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

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

Aucune alerte relevant de ces trois cas évoqués n'a été déclenchée en 2018

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Un site web (<http://www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/cnr-brucella.html>) a été mis en place lors de la création du CNR. Ce site permet de contacter le CNR et informe les différents lecteurs sur l'épidémiologie, la clinique, le diagnostic et le traitement de la brucellose. Nous avons également une adresse e-mail (CNR.brucella@chu-nimes.fr), avec redirection automatique des messages reçus sur l'ancienne adresse de l'ANSES (cnr.brucella@anses.fr), permettant d'être en lien étroit avec les professionnels de Santé en France. Afin de favoriser les communications entre le CNR et le LNR, l'équipe du LNR reçoit les communications adressées au CNR. Elle est tenue informée des cas de brucellose humaine identifiés.

Le CNR a une activité de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Les communications sont réalisées par e-mail sur l'adresse générique ou les adresses professionnelles des médecins du CNR ou par téléphone. L'activité téléphonique représente entre 3 et 10 appels hebdomadaires. Le Pr. LAVIGNE donne son numéro de portable pour être le plus rapidement et le plus facilement joignable par les professionnels de Santé.

En terme de formation, les Pr. SOTTO et LAVIGNE donnent des cours magistraux en maladies infectieuses et microbiologie (et en particulier sur la brucellose) à la Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes. Le Pr. SOTTO est le Président du Collège universitaire des Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT). Il coordonne la rédaction du référentiel de Maladies Infectieuses et Tropicales, PILLY et notamment le chapitre dédié à la brucellose. Le Pr. LAVIGNE a participé à la rédaction du nouveau chapitre « *Brucella* » dans la 6^{ème} Edition du REMIC (Référentiel en microbiologie médicale). Enfin, les Pr. LAVIGNE et SOTTO ont commencé à revoir le chapitre dédié à la brucellose pour l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale (sortie prévue en 2019). Enfin, ils ont participé à la mise en place du groupe de travail qui sous l'égide de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) va proposer des recommandations pour la prise en charge des brucelloses en 2019.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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

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

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

Non applicable

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2018

Etude de la virulence de *Brucella*

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

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).

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.

Diagnostic de la brucellose

Le diagnostic précoce de la brucellose est essentiel pour prévenir les complications, mais il peut être retardé par les difficultés d'identification des isolats de *Brucella*. La plupart des laboratoires d'analyses, privés ou publics, utilisent maintenant la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification rapide des bactéries. Cependant, les instruments sur le marché ne pouvaient pas identifier les isolats de *Brucella* en raison de l'absence de base de données validée (VITEK MS, BioMérieux) ou de la difficulté d'accès à cette base de données (MALDI Biotyper, Bruker). En partenariat avec la société bioMérieux, nous avons développé un protocole d'inactivation compatible avec le VITEK MS® (Mesureur et al., 2016). Nous avons ensuite généré des centaines de spectres couvrant ce genre bactérien et construit une base de données permettant une identification précise des *Brucella* spp. au niveau de l'espèce (Mesureur et al., 2018). Cette base de données, récemment agréée par la FDA et la CE, est disponible depuis le début de l'année 2019 pour tous les utilisateurs de Vitek MS dans le monde entier. Cette base facilitera grandement le diagnostic de la brucellose et pourrait permettre de prévenir les infections de personnels de laboratoire.

6.2 Liste des publications et communications de l'année 2018.

Liste des publications

García-Méndez KB, Hielpos SM, Soler-Llorens PF, Arce-Gorvel V, Hale C, Gorvel JP, *O'Callaghan D, Kerié A*. Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionis* modifies essential physiological functions of human trophoblasts. *Cell Microbiol.* 2019 Feb 28:e13019. doi: 10.1111/cmi.13019. PMID: 30817085

Holzappel M, Girault G, **Kerié A**, Ponsart C, **O'Callaghan D**, Mick V. Comparative genomics and in vitro infection of field clonal isolates of *Brucella melitensis* Biovar 3 did not identify signature of host adaptation. *Front Microbiol.* 2018 Oct 22;9:2505. doi: 10.3389/fmicb.2018.02505. eCollection 2018. PMID: 30405566

Mesureur J, Arend S, Cellière B, Courault P, Cotte-Pattat PJ, Totty H, Deol P, Mick V, Girard V, Touchberry J, Burrowes V, **Lavigne JP, O'Callaghan D**, Monnin V, **Kerié A**. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Oct 18;12(10):e0006874. doi: 10.1371/journal.pntd.0006874. eCollection 2018 Oct. PMID: 30335748

Lavigne JP, Maurin M. *Brucella* spp. In : REMIC, Société Française de Microbiologie, Référentiel en Microbiologie Médicale, Ed. Paris, 2018 : 513-518.

Communications

M. Soledad Hielpos, D. O'Callaghan and A. Kerié. Cell to cell transmission of *Brucella* in trophoblasts. Infectiopolé annual meeting, Marseille (France), July 2018.

E. Riquelme, C. Felix, A. Vergunst and D. O'Callaghan. An 'open channel conformation' VirB10 deregulates intracellular trafficking and virulence of *Brucella suis*. Young Microbiologists Symposium on microbe signalling, organisation and pathogenesis. Belfast (UK), August 2018.

E. Riquelme, C. Felix, A. Vergunst and **D. O'Callaghan**. An 'open channel conformation' VirB10 deregulates intracellular trafficking and virulence of *Brucella suis*. Current Trends in Biomedecine, Baeza (Spain), November 2018.

E. Riquelme, B. Ize and D. O'Callaghan Analysing the role of the twin arginine system in *Brucella* infection. Current Trends in Biomedecine, Baeza (Spain), November 2018.

E. Riquelme, C. Felix, A. Vergunst and **D. O'Callaghan**. An 'open channel conformation' VirB10 deregulates intracellular trafficking and virulence of *Brucella suis*. Brucellosis Research Conference, Chicago (USA), December 2018.

D. O'Callaghan. Analysing the role of the twin arginine system in *Brucella* infection, University of Chicago (USA), December 2018.

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

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

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

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

Enfin, cette collaboration est étendue au champ de la recherche scientifique. En 2018, cela a permis l'obtention de deux publications scientifiques en commun (Messeur et al., 2018 ; Holzapfel et al., 2018).

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Pour cette année, plusieurs programmes d'activité sont prévus :

-Activités d'expertise : nous finaliserons cette année l'évaluation de l'automate VIRCLIA® (Orgentec) pour la détection des IgM et des IgG par chimiluminescence et l'intérêt diagnostique de l'utilisation de la dilution du test au Rose Bengale dans la brucellose (Diaz R et al., PLoS Negl Trop Dis 2011).

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

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

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

*La brucellose est présumée endémique dans plusieurs pays d'Afrique. Cependant, les données du terrain sont très limitées. Nous aidons une équipe Nigérienne à mettre en place une étude épidémiologique de la brucellose dans le nord-ouest de ce pays et prévoyons d'accueillir au laboratoire le directeur de cette équipe (Dr Keneth OKON) en 2019-2020 sur un contrat financé par l'IHU Méditerranée Infection.

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

*Notre équipe a constitué la base de données de *Brucella* pour le système Vitek MS® (BioMérieux). Cette base est accessible à tous les centres possédant cet appareil depuis le début d'année 2019. 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 (AR. Wattam (Virginia Bioinformatics Institute, Blacksburg, USA) et JT. Foster (Center for Microbial Genetics & Genomics, Flagstaff, 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 difficile et coûteux.

*Actuellement, il n'existe aucun moyen de biologie moléculaire permettant de distinguer les trois biovars de *B. melitensis*. Les techniques de bactériologie classique sont compliquées et peu fiables. Notre priorité est de développer des techniques basées sur les séquences génomiques, beaucoup plus intéressantes comme outil épidémiologique.

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

-Activités de recherche : L'ensemble des activités de recherche menées par l'équipe 'Brucella' de l'unité INSERM 1047 continueront d'être développées durant l'année avec toujours un focus sur la relation hôte-pathogène et les effecteurs du système de sécrétion de Type IV.

-Conseil et expertises : Les Pr. LAVIGNE et SOTTO vont revoir le chapitre dédié à la brucellose pour l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Ils vont également participer à la rédaction des recommandations pour la prise en charge des brucelloses sous l'égide de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF).

-Communication : L'équipe du CNR va débiter la préparation du Congrès international sur la Brucellose (73th Annual Brucellosis Research Conference) qui aura lieu à Nîmes en 2020.

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 service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière 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 2018, les effectifs du CNR des *Brucella* étaient les suivants : 1.40 ETP (équivalent temps plein). M Ludovic DESMIER, technicien de laboratoire au CHU de Nîmes, assure les activités de diagnostic et de recherche du CNR. Le Dr. O'CALLAGHAN et le Pr. LAVIGNE sont impliqués au quotidien dans cette activité pour la réalisation du diagnostic sérologique, la validation des résultats techniques, l'interprétation des tests diagnostiques, et la communication de ces résultats aux services cliniques et/ou aux laboratoires expéditeurs. Les Drs Anne KERIEL, Soledad HIELPOS et Flavia HAUSENAUR ainsi que deux doctorantes, sont 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 dans la prise en charge des patients et la surveillance des personnels de laboratoires. Le Pr. SOTTO reçoit en consultation les patients suspects de brucellose adressés par des confrères. Les Pr. SOTTO et LAVIGNE effectuent également le recueil des renseignements cliniques et épidémiologiques, et l'élaboration des comptes rendus adressés à Santé Publique France.

L'organigramme

Directeur	David O'CALLAGHAN (DR2 INSERM)
Co-directeur	Jean-Philippe LAVIGNE (PU-PH Bactériologie)
Conseil clinique	Albert SOTTO (PU-PH Maladies infectieuses et tropicales)
Recherche fondamentale	Anne KERIEL (CR INSERM) Christine FELIX (IE UM) jusqu'à Mai 2018 Soledad HIELPOS (post-doctorante) jusqu'à Janv. 2019 Flavia HAUSENAUR (post-doctorante) depuis Nov. 2018 Elia RIQUELME (doctorante) Sonia VECTION (doctorante) depuis Oct. 2018
Technicien diagnostique	Ludovic Desmier (Tech CHU-Nîmes)

1.3 Locaux et équipements

L'activité du 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 NSB2 dédié à la culture cellulaire 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® (Orgentec) permettant le dosage immunologique des anticorps anti-*Brucella* par chimiluminescence, d'un lumino/fluorimètre (Mithras, Berthold Technologies), d'un secteur de sérologie équipé d'un microscope à fluorescence (Leica) contenant un prisme de normarski, 5 filtres différents et une caméra CCD Roper Coolsnap Fx, d'un lecteur de plaque (ThermoScientific),
- de nombreux équipements de biologie moléculaire : 1 extracteur d'ADN QiaCube (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),
- d'un accès au plateau technique de Biologie Moléculaire du CHU de Nîmes pour la réalisation de séquençage par technique NGS (QIAGEN).

1.4 Collection de matériel biologique

o Souchothèque

Le CNR dispose d'une large collection de *Brucella* sp., 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 (MOT) hautement pathogènes.

La collection du CNR pour l'année 2018 est constituée de 38 souches. Les souches ont été

conservées en bouillon glycérolé (conservation supérieure à 30 ans) et stockées dans un congélateur dédié à -80°C et en Back up dans un congélateur à -20°C.

o Sérothèque

La sérothèque du CNR *Brucella* comprend 1 008 sérums/LCR d'origine humaine. Cette sérothèque a vu son nombre augmenter de 198 sérums/LCR pour l'année 2018. L'ensemble des prélèvements (sérum et LCR) est conservé dans un congélateur dédié à -20°C dans notre CNR.

1.5 Démarche qualité

Le service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière du CHU de Nîmes (dirigé par le Pr. LAVIGNE) suit la démarche d'accréditation des Laboratoires (NF EN ISO15189) menée au sein du CHU. Dans le cadre de cette accréditation COFRAC des laboratoires, le service de Microbiologie est accrédité pour un certain nombre d'analyse (plus de 70% de la microbiologie à ce jour). Dans le champ de cette accréditation, sont inclus, l'identification bactérienne de souches (par MALDI-TOF), la biologie moléculaire et la sérologie.

L'ensemble des procédures analytiques développées par le CNR sont établies et validées. Les CIQ sont déterminées et colligées pour chaque sérum testé. Une métrologie du réfrigérateur et des congélateurs est établie. La traçabilité de la réception au rendu de résultat est également mise en place.

L'Unité 1047 INSERM, suite au dépôt d'une demande d'autorisation de MOT auprès de l'ANSM (conformément au dispositif réglementaire relatif aux microorganismes et toxines hautement pathogènes), a fait l'objet 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 dispositions législatives et réglementaires 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),
- trois tests permettant de détecter les anticorps spécifiques anti-*Brucella* de type IgM et/ou IgG (immuno-chromatographie, chimiluminescence et immunocapture).

La stratégie sérologique est basée préférentiellement sur le titre du Rose Bengale (RB), dont le seuil de positivité est estimé $\geq 1/4$. Cette stratégie, publiée par Diaz R et al. (PLoS Negl Trop Dis) en 2011, permet d'éliminer un certain nombre de faux positifs. Une évaluation sur plus de 1000 sérums sera effectuée en fin d'année 2019 pour évaluer la sensibilité et la spécificité de cette approche. Pour confirmer ce diagnostic, nous utilisons la détection d'IgM et IgG par immuno-chromatographie, chimiluminescence 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). Les performances de la technologie par chimiluminescence seront définitivement évaluées à la fin de l'année 2019.

*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.

Actuellement, le CNR des *Brucella* reçoit soit des souches bactériennes suspectes ou des prélèvements (hémocultures, biopsies, ...). Après ensemencement sur gélose au sang (Columbia) ou chocolat, les colonies suspectes sont identifiées au genre par spectrométrie de Masse (Vitek MS[®], BioMérieux) en utilisant la base de données SARAMIS v4.15 (RUO). Une confirmation par des tests d'agglutination avec des anticorps spécifiques et de la biologie moléculaire est réalisée ensuite pour le diagnostic d'espèce.

*Recherche de *Brucella* par PCR en temps réel :

La biologie moléculaire est utilisée :

-pour la détection de *Brucella* sp. dans des prélèvements biologiques divers (sang, LCR, biopsies,...),

-pour le diagnostic d'espèce des souches bactériennes envoyées au CNR.

Elle sera réalisée selon différentes techniques :

-pour la détection de *Brucella* sp. par :

*Amplification du gène codant pour 16S rRNA et séquençage de l'amplicon ciblé.

*Amplification de différents gènes d'intérêt plus spécifique au genre *Brucella* : séquence IS711 / 6501, *bcs31* et *per* (Bounaadja L et al., Vet Microbiol. 2009).

-pour le diagnostic d'espèce par :

*La technique du Bruce-ladder modifiée (García-Yoldi et al., 2006 ; López-Goñi et al., 2011). Cette technique, mise en place par notre laboratoire, permet l'identification des différentes espèces, la différenciation des souches vaccinales vétérinaires de leurs homologues sauvages (*B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 et *B. abortus* RB51), la différenciation des biovars de *B. suis*.

*L'analyse de VNTR (MLVA - Le Flèche et al., 2006), en utilisant les panels 1 et 2, permet une analyse épidémiologique des souches (cas humains/foyers ou cas animaux ; cas humains reliés).

Actuellement, il n'existe aucun marqueur stable ou 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 sur lame au Rose Bengale (RB) +++ : est le test de criblage le plus performant.

- le test d'agglutination en tube de Wright (W) : est le test recommandé par l'OMS.

Bactériologie

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

Elle doit se faire dans un laboratoire NSB3.

-Aucun Antibiogramme ne doit être réalisé en dehors du CNR +++.

Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

3.1 Permanence du CNR

- Horaires de fonctionnement du CNR : 9h-17h du Lundi au Vendredi
- En dehors de ces horaires, veuillez contacter le Pr. LAVIGNE au 06 03 11 28 09, Chef du service de Microbiologie du CHU de Nîmes.

3.2 Autorisations MOT

Le Dr. David O'CALLAGHAN est autorisé par l'ANSM à effectuer des opérations sur les MOT pour les activités du CNR.

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

Le Pr. Jean-Philippe LAVIGNE, Chef du service de Microbiologie du CHU de Nîmes, Médecin Biologiste, est autorisé à exercer la biologie médicale.

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

Nous avons récemment démontré que, lors de l'infection des trophoblastes humains par *Brucella*, plusieurs fonctions trophoblastiques essentielles au bon développement du placenta étaient altérées (Garcia Mendez et al., 2018). Nous avons également observé une transmission de l'infection entre deux types de trophoblastes humains et ce, même en présence d'antibiotiques dans le milieu extracellulaire.

Nos récents travaux ont démontré l'implication de vésicules extra-cellulaires (VEC) dans la transmission de l'infection par *Brucella* entre différents types de cellules humaines. Ce mécanisme totalement inédit pourrait participer à la propagation de l'infection au sein des organes (dont le placenta) ou de l'organisme entier.

3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année 2018, y compris en termes de mise à disposition des budgets MIGAC ou Santé publique France

Aucune difficulté particulière n'a été rencontrée en 2018.

3.6 Autres remarques à destination du comité des CNR

Les *Brucella* sont classés MOT et leur détention, leur manipulation et leur transport nécessitent des autorisations délivrées par l'ANSM. Cela pose des problèmes pour le transport des souches identifiées comme *Brucella* par les laboratoires de diagnostic. Outre le temps perdu avec la paperasse et l'attente des autorisations, plusieurs laboratoires ont refusé d'envoyer des souches à cause du coût du transport (500-1000 euros). S'il est clair que les *Brucella* sont des pathogènes de classe 3 et doivent être traités avec précaution, il n'en est pas de même avec les acides nucléiques, or il est demandé de les traiter comme des souches. Même les ADNs issus de prélèvements dont les PCR sont positives nécessitent une autorisation, alors qu'ils ne présentent aucun risque en matière de biosécurité ou de biosureté. Nous attendons actuellement l'autorisation d'envoyer de l'ADN génomique aux États-Unis pour le séquençage génomique de souches. Cet envoi est bloqué depuis 2 mois car nous ne pouvons pas donner le nom de l'employé du transporteur qui présentera le colis au bureau de la douane. Ces règles sont particulières à la France ; dans n'importe quel autre pays, nous pourrions envoyer l'ADN par la poste. Cette situation n'est pas acceptable et complique l'avancée de nos travaux scientifiques.