

CNR Corynébactéries du complexe diphtheriae

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

Responsable : Sylvain BRISSE

Responsables adjointes : Edgar BADELL-OCANDO et Julie TOUBIANA

Unité de Recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes

Institut Pasteur

REMERCIEMENTS

Les membres du CNR remercient les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale qui ont envoyé des prélèvements ou échantillons à analyser, ainsi que leurs informations associées, rendant possible la surveillance de la diphtérie en France métropolitaine et d'Outre-Mer, en clinique humaine et vétérinaire.

Le CNR remercie également Mélanie Hennart, Virginie Passet, Annie Landier, Nathalie Armatys, Nora Zidane, Sébastien Bridel et Chiara Crestani (Unité BEBP, Institut Pasteur) pour leur contribution à l'analyse des séquences génomiques et des antibiogrammes.

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence à ce présent rapport (E. Badell-Orcando, J.Toubiana & S. Brisse. 2023. Rapport d'Activité du Centre national de Référence des Corynébactéries du complexe diphtheriae – Institut Pasteur, Paris, France). Les données issues des tableaux et figures présentées dans ce rapport ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

Résumé analytique et faits marquants 2022

Le CNR analyse en urgence les souches de *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* et autres espèces proches, potentiellement porteuses du gène de la toxine diphtérique. En 2022, le CNR a reçu 458 échantillons. Des isolats de *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*) ont été détectés dans 49 cas d'infections humaines et 7 cas d'infections chez des chevaux. Parmi les 49 isolats d'origine humaine, 20 correspondent à des souches isolées chez des migrants d'origine afghane (4 groupes génétiques également observés ailleurs en Europe). Une patiente infectée par un *C. diphtheriae tox+* est décédée. 198 *C. ulcerans tox+* ont été détectés, majoritairement issus de prélèvements animaux (chiens, chats, rats et chevaux). 35% des *C. diphtheriae tox+* ont été isolés en Outre-Mer, tandis que *C. ulcerans* est isolé majoritairement en Métropole.

Le CNR alerte systématiquement SpF et les ARS concernées en cas de détection du gène de la toxine diphtérique. En 2022, 254 alertes ont été réalisées, dont 56 correspondent à des prélèvements chez l'homme.

L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que, même si les souches analysées en 2022 restent largement sensibles aux antibiotiques utilisés en première intention, quelques souches résistantes à ces agents et/ou multirésistantes, émergent. Des seuils critiques ont été définis pour la première fois pour les agents de la diphtérie (EUCAST version 13, Janvier 2023, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints), en collaboration avec le CNR.

Le CNR a réalisé plusieurs études contribuant à une meilleure surveillance de la diphtérie et sa compréhension, incluant une étude en Nouvelle-Calédonie, une série de cas d'infections animales, et l'analyse de la réémergence de la diphtérie en France et en Europe.

Executive summary with year 2022 highlights

*The NRC conducts emergency analyses of strains of *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* and related species, which are potential carriers of the diphtheria toxin gene. In 2022, the NRC received 458 samples. *C. diphtheriae* isolates carrying the *tox* gene (*tox+*) were detected in 49 cases of human infection and 7 cases of infection in horses. Of the 49 human isolates, 20 corresponded to strains isolated from migrants of Afghan origin (4 genetic groups also observed elsewhere in Europe). One patient infected with *C. diphtheriae tox+* died. 198 *tox+**

**C. ulcerans* were detected, mostly in animal samples (dogs, cats, rats and horses). 35% of *C. diphtheriae tox+* were isolated in French overseas territories, while the majority of *C. ulcerans* were isolated in mainland France.*

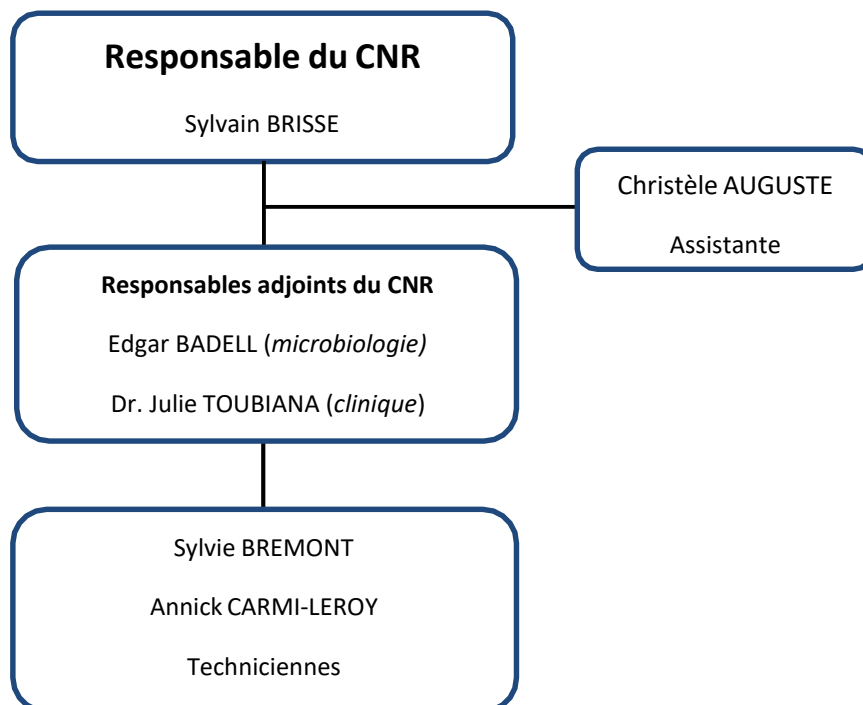
The CNR systematically alerts SpF and the ARS concerned, in the event of detection of the diphtheria toxin gene. In 2022, 254 alerts were issued, 56 of which related to human samples.

Analysis of antimicrobial resistance shows that, although the strains analyzed in 2022 remain largely susceptible to the antibiotics used as first-line treatment, some strains are emerging that are resistant to these agents and/or are multi-resistant. Critical thresholds have been defined for the first time for diphtheria agents (EUCAST version 13, January 2023, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints), in collaboration with the NRC.

The CNR has carried out several studies contributing to the better surveillance and understanding of diphtheria, including a study in New Caledonia, a series of animal infection cases, and analyses of the re-emergence of diphtheria in France and Europe.

1 Missions et organisation du CNR

Organigramme



Mission et Organisation

Face à l'augmentation du volume des analyses depuis plusieurs années, l'équipe technique a été renforcée en juin 2022 par une seconde personne. D'autre part, Isabelle MOULHERAT, assistante de l'Unité BEBP et du CNR depuis 2016, a été remplacée par Christèle AUGUSTE en novembre 2022. Le reste de l'équipe est inchangé.

Démarche Qualité

Le CNR des Corynebactéries du complexe *diphtheriae* réalise ses activités analytiques sous management de la qualité. Le CNR est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 depuis Novembre 2013 (Accréditation Cofrac-Examen médicaux, n°8-2588, liste des sites et la portée disponibles sous www.cofrac.fr). L'attestation d'accréditation est disponible ici <https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>.

Le CNR fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, qui apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

La technique accréditée est :

« Identification des corynébactéries du complexe diphtheriae et détection du gène tox par PCR multiplex en temps réel »

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité (CQE). Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle pour maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

Lors de la pandémie de COVID-19, les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour le maintien et la continuité des missions du CNR.

L'année Qualité 2022 s'est organisée comme suit :

Étapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	27 au 29 juin et du 6 au 9 juillet 2022
Revue qualité	21/04/2022
Revue de direction LREMS	23/06/2022
Audits internes qualité (AIQ) et technique (AIT)	AIQ : 09/11/2022 AIT : 29/11/2022
Nombre d'écarts/non-conformités mineurs (E-NC min)	0
Nombre d'écarts/non-conformités majeurs (E-NC maj)	0

Malgré le contexte sanitaire, le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation COFRAC suite à l'audit en octobre 2020.

Perspectives 2023

Étapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité	30/03/2023
Revue de direction LREMS	04/07/2023
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2023
Audit de surveillance COFRAC	Novembre - décembre 2023

Participation du CNR à un contrôle qualité externe

Pour les corynébactéries du complexe *diphtheriae* il n'existe pas de CQE commercial. De ce fait, nous avons établi un accord pour faire un essai inter-laboratoire (EIL) avec le Laboratoire de Microbiologie à Bruxelles (LMB). Le LMB nous a envoyé 6 échantillons à analyser en décembre 2022. La première étape a consisté à cultiver les échantillons et extraire leur ADN. Nous avons ensuite fait la qPCR qui cible le gène *tox*, et le gène *rpoB* pour l'identification. Nous avons obtenu 100% de résultats corrects. Dans un deuxième temps nous avons fait le test d'Elek qui détecte la production de la toxine diphtérique pour les isolats porteurs du gène *tox* présents dans les échantillons reçus. Nous avons obtenu 100% de résultats corrects. Enfin, nous avons réalisé les tests biochimiques pour déterminer le biovar pour les isolats appartenant à l'espèce *diphtheriae*. Nous avons obtenu des résultats corrects pour tous les isolats analysés.

En conclusion, tous les résultats des échantillons du CQE que nous avons analysés pour l'année 2022 sont conformes aux résultats attendus.

En parallèle, nous avons envoyé 6 échantillons à analyser au laboratoire en Belgique. Ce laboratoire a obtenu 100% de résultats conformes. Ceci constitue aussi une confirmation, indirecte, de l'exactitude et de la qualité de nos analyses.

2 Activités d'expertise

Chiffres clés :

En 2022, 49 cas d'infections humaines et 7 cas d'infections chez des chevaux, dus à des souches de *C. diphtheriae* porteuses du gène *tox* (*tox+*), ont été détectés. Parmi les 49 cas d'infections humaines dus à des souches de *C. diphtheriae tox+*, 20 correspondaient à des souches isolées dans le contexte d'une épidémie détectée dans plusieurs pays d'Europe chez des individus migrants originaires majoritairement d'Afghanistan. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 85 fois chez l'homme et 20 fois chez des animaux (chat, chiens et chevaux). De plus, 198 *C. ulcerans tox+* ont été identifiés, dont 7 chez l'homme, tandis que *C. ulcerans tox-* a été isolé 42 fois.

2.1 Evolution des techniques

Suite à l'arrêt de la production du kit commercial utilisé pour faire la PCR en temps réel (qPCR) utilisée pour la détection du gène *tox* et l'identification des espèces *diphtheriae* ou *ulcerans* (au sens large), la technique a dû être validée à nouveau en 2022 pour conformité à l'accréditation à la norme ISO 15189.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Il n'existe aucune trousse de diagnostic diphtérie sur le marché.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous avons transféré notre mode opératoire (qPCR *tox* et espèces) vers d'autres laboratoires demandeurs en 2022 (CHU de Besançon ; Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours).

2.4 Collections de matériel biologique

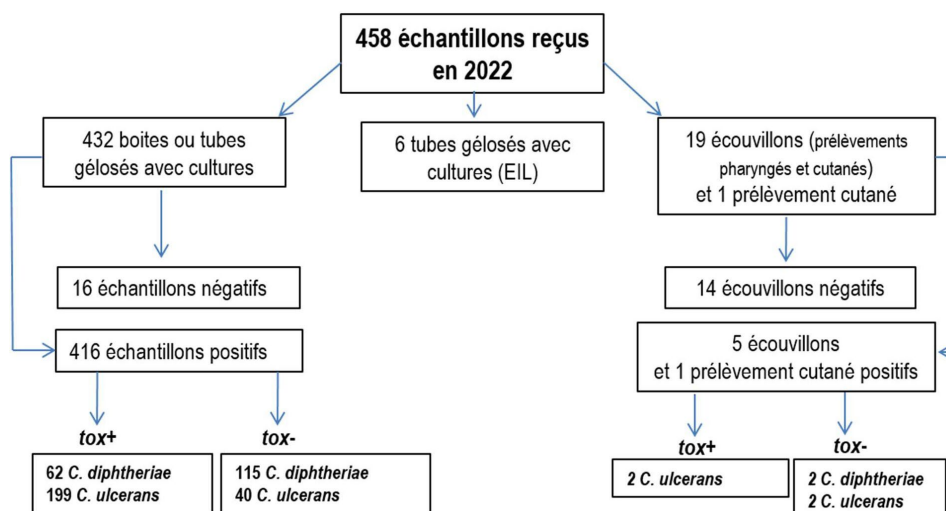
Notre collection s'est enrichie de 422 nouveaux isolats, provenant essentiellement des laboratoires hospitaliers de France métropolitaine, Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Guyane et des laboratoires de biologie médicale vétérinaire.

2.5 Activités d'expertises

En 2022 nous avons reçu 458 échantillons ou souches à analyser (Figure ci-dessous) :

- Des souches pour lesquelles nous avons recherché le gène *tox*, identifié l'espèce, vérifié la pureté, et que nous avons purifiées si les cultures reçues étaient poly-microbiennes
- Des prélèvements (tissus ou écouvillons) que nous avons mis en culture et/ou sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée
- Six souches correspondaient à un échange inter-laboratoire dans le cadre de l'accréditation ISO 15189

Figure : Nombre d'échantillons analysés par le CNR en 2022



Un échantillon est considéré positif en cas de détection d'ADN de *Corynebactéries* appartenant au complexe *diphtheriae*

Tableau : Analyses réalisées au CNR et délai maximum de restitution des résultats

Type d'échantillon	Type d'analyse	Nombre d'analyses	Délai de rendu des résultats
Prélèvements	Réception et mise en culture	20	Non applicable < 2 jours ouvrés
Prélèvements	Analyse du gène <i>tox</i> et détection d'ADN de <i>C. diphtheriae/C. belfantii/C. rouxii</i> ou <i>C. ulcerans/C. pseudotuberculosis</i> par qPCR	20	Typiquement le jour
Isolats bactériens	Réception et mise en culture	432	Non applicable < 2 jours ouvrés
Isolats bactériens	Analyse du gène <i>tox</i> et détection d'ADN de <i>C. diphtheriae/ C. belfantii/C. rouxii</i> ou <i>C. ulcerans/C. pseudotuberculosis</i> par qPCR	432	Typiquement le jour même
Isolats bactériens	Test d'Elek (production de la toxine <i>in-vitro</i>)	109	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Biotypage	136	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Antibiogrammes	300	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Séquençage génomique	300	Non rendu systématiquement

Le délai maximum de restitution des résultats du CNR aux laboratoires est indiqué dans le tableau ci-dessus

2.6 Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M). La technologie Illumina (NextSeq-500) est utilisée ; les banques sont préparées avec le kit Nextera XT.

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Le CNR bénéficie de l'expertise de bio-informaticiens du Hub Bioinformatique et Biostatistique de l'Institut Pasteur, qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes. L'unité BEBP hébergeant le CNR a développé un pipeline d'analyse qui réalise plusieurs étapes en aval (détection du gène <i>tox</i> et ses éventuelles mutations, autres gènes de virulence, MLST et core genome MLST, gènes de résistance). Nous utilisons une combinaison d'outils bioinformatiques en ligne de commande UNIX et en interface graphique. Les outils les plus utilisés sont des scripts développés dans l'unité BEBP et la plateforme BIGSdb (pour le génotypage MLST et cgMLST)

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

NON Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?

OUI

Nous analysons les génotypes des souches après le séquençage génomique à des fins de santé publique : appui à la définition de cas groupés, gènes de résistance aux antibiotiques. Ces analyses ont lieu essentiellement rétrospectivement, permettant de comprendre les liens entre cas, mais jusqu'à présent ne sont pas utilisées pour des actions spécifiques de contrôle des infections, qui ont lieu de toute façon selon les recommandations en vigueur dès qu'un cas est détecté (screening des contacts, antibioprofylaxie).

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

Les génomes sont systématiquement analysés par cgMLST, recherche de gènes de virulence (dont la toxine diphtérique) et gènes de résistance (dont ermX et pbp2m)

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

Toutes les souches sont séquencées, hors exceptions (voir ci-dessous ; 416 en 2022)

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année : 416

La majorité des isolats appartenant au complexe diphtheriae reçus en 2022 ont été séquencés. En général nous séquencions tous les isolats qu'ont pu être cultivés, cependant en 2022 nous avons reçu une quantité importante d'isolats de *C. ulcerans* en provenance d'un centre et, après séquençage d'une partie de ces isolats, nous avons constaté qu'il s'agissait d'une souche clonale. De ce fait nous avons décidé d'analyser seulement certains des isolats reçus (au début, au milieu, et en fin de l'épidémie).

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

Dans les bases de données fermées : Nous déposons dans un premier temps, à des fins d'analyse, toutes les séquences assemblées dans notre plateforme BIGSdb privée. Celles-ci sont rendues publiques ultérieurement depuis cette base de données.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : A l'occasion de publications, les séquences brutes sont déposées au format fastq dans SRA ou ENA, et les assemblages sont déposés dans GenBank ou ENA et également rendus publics sur notre plateforme BIGSdb ; y compris avec certaines données contextuelles.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Nous déposons les séquences brutes au format fastq dans ENA, et les assemblages sont rendus publics dans ENA et notre plateforme BIGSdb (<https://bigbdb.pasteur.fr/diphtheria/>). Elles sont partagées à des fins de santé publique ou avec nos collaborateurs.

3 Activités de surveillance

En 2022, 56 cas d'infection à *C. diphtheriae tox+* ont été rapportés (49 cas cliniques humains et 7 prélèvements vétérinaires). Pour 30 des 35 cas humains détectés en métropole, leur importation a pu être vérifiée. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 83 fois. *C. ulcerans tox+* a été identifié dans 7 cas cliniques humains et dans 191 prélèvements vétérinaires. *C. ulcerans tox-* a été isolé dans 6 cas cliniques humains et 33 cas vétérinaires. *C. pseudotuberculosis tox-* a été détecté 3 fois. Les 2 espèces non toxigènes *C. belfantii* et *C. rouxii* ont été détectées 14 et 12 fois

3.1 Description du réseau de partenaires

Il n'y a pas de réseau de partenaires structuré pour la diphtérie ; la maladie étant à déclaration obligatoire et les isolats faciles à cultiver, tous les laboratoires d'analyse de biologie médicale ou de microbiologie d'hôpital sont susceptibles d'isoler, d'identifier (le plus souvent par MALDI-TOF) et de nous envoyer des isolats. Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignements afin de collecter les informations cliniques pertinentes (y compris présence d'animaux, voyages...). Ces fiches constituent une base importante pour la surveillance de la diphtérie en France.

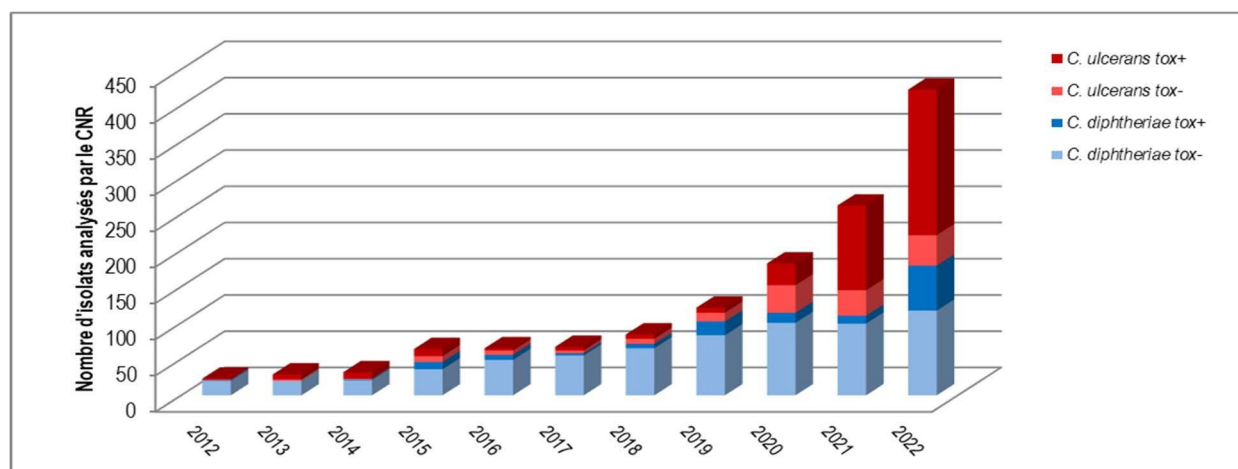
En 2022, 102 correspondants distincts nous ont envoyé des échantillons à analyser ; 98 correspondants en France Métropolitaine et 4 en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants est supérieur aux années précédentes.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Évolution temporelle : La figure ci-dessous montre que le nombre d'isolats analysés en 2022 a très fortement augmenté par rapport aux années précédentes ; on observe une augmentation d'un facteur 20 en 10 ans. Cette tendance à la hausse prolonge en l'amplifiant, celle observée les années précédentes, qui est continue et concerne toutes les catégories (*tox+* ou *tox-*, *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*). Cette année, les souches *tox+* isolées chez l'homme ont nettement augmenté alors qu'elles étaient minoritaires auparavant (pour 2022 : 7 *C. ulcerans tox+*, 49

C. diphtheriae tox+) ; ce phénomène est principalement lié aux cas d'infections chez des migrants, majoritairement d'origines afghane ou syrienne.

Figure : Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2012 et 2022



Origines géographiques : Le tableau ci-dessous résume les origines des cas et les espèces impliquées. On note que les cas ont été détectés en majorité de France métropolitaine.

Tableau : Nombre d'isolats par espèce et origine géographique

	Métropole (humain)	Métropole (animal)	Guyane (humain)	La Réunion (humain)	Mayotte (humain)	Nouvelle Calédonie (humain)	Polynésie (humain)	Total
A. Isolats tox positifs								
<i>C. diphtheriae</i>	35	7	1	4	9	0	0	56
<i>C. ulcerans</i>	7	191	0	0	0	0	0	198
<i>C. belfantii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. rouxii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	42	198	1	4	9	0	0	254
B. Isolats tox négatifs								
<i>C. diphtheriae</i>	44	7	16	1	8	0	0	76
<i>C. ulcerans</i>	6	33	0	0	0	0	0	39
<i>C. belfantii</i>	14	0	0	0	0	0	0	14
<i>C. rouxii</i>	1	11	0	0	0	0	0	12
<i>C. pseudotuberculosis</i>	1	2	0	0	0	0	0	3
Total	66	53	16	1	8	0	0	144
TOTAL (A+B)	108	251	17	5	17	0	0	398

Caractéristiques cliniques : Le tableau suivant résume les caractéristiques cliniques des 118 cas de *C. diphtheriae* et 13 cas *C. ulcerans* humains pour lesquels les données étaient accessibles. A noter, l'âge médian des patients infectés par *C. ulcerans* est très nettement supérieur à celui des cas de *C. diphtheriae*. En revanche, il n'y a pas ou peu de différence d'âge entre les cas *tox*-positifs et *tox*-négatifs, dans chaque espèce. Les hommes sont plus fréquemment infectés que les femmes, sauf par *C. ulcerans tox+*.

Une notion de voyage précédant l'infection à *C. diphtheriae* détectée en métropole, était plus souvent retrouvée chez les cas *tox+* que chez les cas *tox-*.

Les origines des prélèvements cliniques sont peu différentes entre les deux espèces, avec une large majorité de prélèvements cutanés. On retrouve des infections de type non-respiratoire et non-cutanée principalement chez les *tox-* de l'espèce *diphtheriae* et chez les *tox+* de l'espèce *ulcerans*.

Tableau : Caractéristiques cliniques des cas humains 2022

Caractéristiques#	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>	
	<i>tox</i> -positifs (N= 49)	<i>tox</i> -négatifs (N= 69)	<i>tox</i> -positifs (N= 7)	<i>tox</i> -négatifs (N= 6)
Données démographiques				
Age médian en années (IQR)	22 (17 - 26)	30 (15 - 47)	70 (60 - 85)	74 (67 - 78)
Sexe (% homme)	84	62	29	67
Voyage ## (%) (pour souches Métropole)	86 (30/35)	47 (20/43)	NR	NR
Contact avec animaux	NR	NR	1	NR
Origine du prélèvement				
Cutané (%)	71	69	57	100
Respiratoire (%)	24	19	29	0
Autres* (%)	5	12	14	0

* Oreille, sang, etc.
Les *C. rouxii*, *C. belfantii* et *C. pseudotuberculosis* sont décrits dans le texte
Voyage hors Métropole (Outre-Mer ou Étranger)
NR = Non Renseigné

***C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*).** En 2022, le CNR a reçu ou isolé 56 *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox*. 42 isolats ont été obtenus à partir de prélèvements réalisés en France métropolitaine, dans différentes régions (35 humains et 7 vétérinaires). Au moins 86% (30/35) des cas humains sont des cas d'importation confirmés. Parmi les 5 autres cas, pour 3 l'information sur un voyage en dehors de la France métropolitaine avant l'infection n'est pas disponible et pour 2, il a une notion de voyage à l'étranger mais le pays n'est pas précisé. Les 14 autres isolats *C. diphtheriae tox+* proviennent de : Guyane (N=1), la Réunion (N=4) et Mayotte (N=9). L'âge médian est de 22 ans. L'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox+* est majoritairement cutanée (71%). Quarante-sept des 49 isolats humains (96%) sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif). Deux isolats sont NTTB (non-toxigenic toxin-gene-bearing). Huit isolats sont *C. diphtheriae* biovar Gravis et 41 biovar Mitis. En ce qui concerne les 7 isolats obtenus à partir de prélèvements vétérinaires ils sont tous producteurs de la toxine diphtérique et leur biovar est Gravis.

C. diphtheriae non porteurs du gène *tox* (*tox*-) Les 76 isolats *C. diphtheriae tox*- proviennent en majorité de différentes régions de France métropolitaine (44 humains et 7 vétérinaires), 16 proviennent de Guyane et 1 de La Réunion. L'âge médian est de 30 ans, avec 62 % d'hommes. Comme pour les isolats *tox*+, l'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox*- est majoritairement cutanée (69%).

Diversité génomique des isolats de *C. diphtheriae*

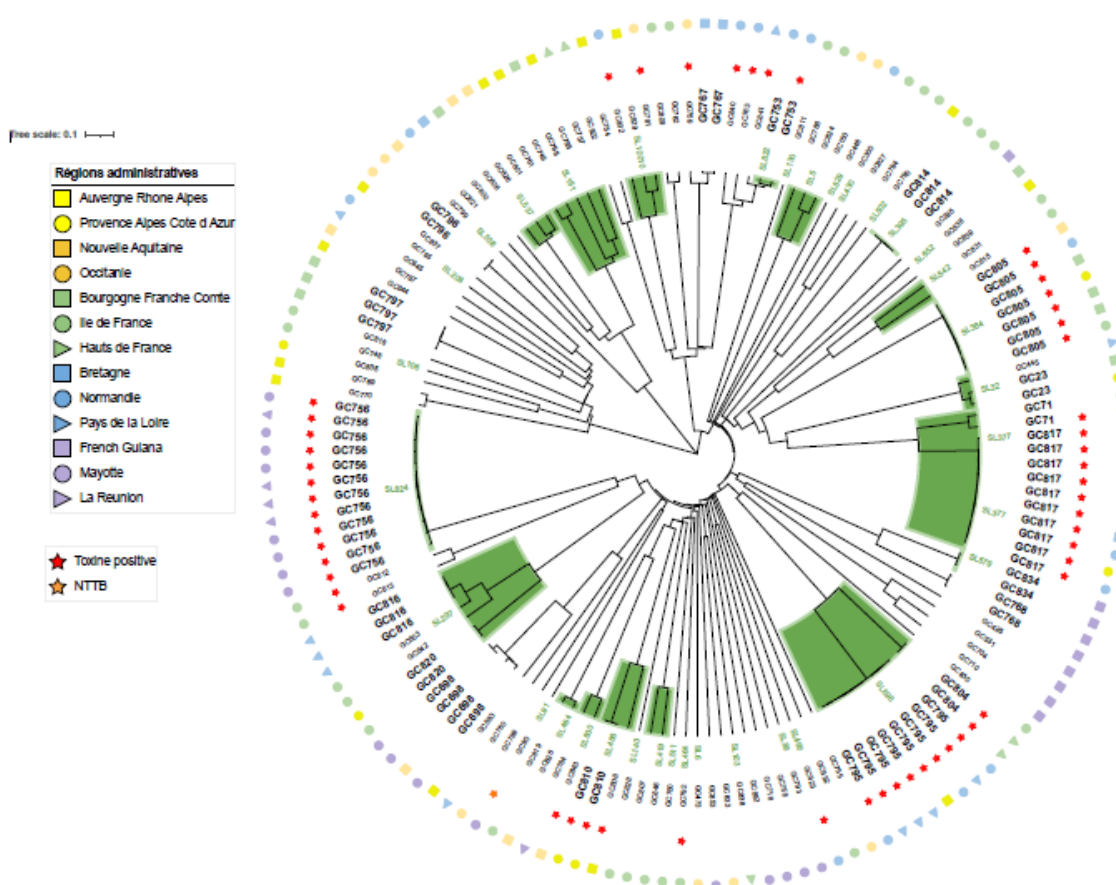


Figure : dendrogramme des données cgMLST des souches de *C. diphtheriae*, 2022. GC : Genomic cluster (<25 allèles cgMLST différents) ; SL : sublineage (<500 allèles cgMLST différents). Les numéros de SL sont hérités des numéros de ST (MLST 7-gènes) pour une cohérence et continuité nomenclaturale. A noter, ces groupes sont créés par single linkage et sont susceptibles d'évoluer lors de l'analyse ultérieure de souches additionnelle.

L'analyse de génotypage cgMLST montre une grande diversité des souches de *C. diphtheriae* collectées en 2022 (Figure). On observe toutefois un certain nombre de groupes clonaux (GC) de souches porteuses du gène *tox*, qui correspondent à des chaînes de transmission récente (quelques années au plus) au vu de leur similarité génomique (1 à 3 allèles cgMLST différents au maximum au sein de chaque groupe clonal) :

- GC756 : 12 isolats de la Réunion ou de Mayotte ; ces souches ont été isolées entre février 2022 et décembre 2022 dans plusieurs villes de Mayotte : Mamoudzou (février et août), Passamaity (mars), Dembeni (avril), Bandraboua (juin), Sada (décembre), et de la Réunion : St Gilles les Hauts, Tampon (avril), St Pierre (juin).
- GC795 : 8 isolats isolés entre juillet et décembre 2022 chez des migrants d'origine Afghane et d'un migrant d'origine Syrienne.
- GC804 : 2 isolats isolés chez des migrants d'origine Afghane entre août et septembre 2022.
- GC817 : 10 isolats, majoritairement isolés chez des migrants d'origine Afghane entre septembre et décembre 2022.
- GC810 : une paire de souches originaires de Tunisie isolées entre août et octobre 2022.

Les cas groupés d'infections chez des migrants (majoritairement hommes jeunes, non vaccinés, infections cutanées) ont fait l'objet d'une investigation en collaboration avec Santé publique France et nos homologues Européens, qui ont observé les mêmes groupes clonaux dans les mêmes populations. Suite à la prise en charge des cas et les mesures de prévention mises en place chez les contacts, nous n'avons plus observé de nouvelle infection à partir de fin janvier 2023. Une circulation au sein des populations de migrants (contamination suspectée dans des foyers de demandeurs d'asile par exemple) a été observée, sans notion de transmission aux populations résidentes.

C. *ulcerans* porteurs du gène *tox* (*tox+*). En 2022 le CNR a reçu ou isolé 198 *C. ulcerans* porteurs du gène *tox*. Tous les isolats proviennent de France métropolitaine. Sept isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 191 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=23), des chiens (N=161), des chevaux (N=3) et des rats (N=4).

L'âge médian des patients humains est de 70 ans ; avec 29 % d'hommes. L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox+* en provenance des isolats humains est majoritairement cutanée (57%). En revanche, les *C. ulcerans tox+* d'origine animale ont été majoritairement retrouvés sur des prélèvements respiratoires (95%). Les 5% restant sont d'origine cutanée (2,5%) et auriculaire (2,5%). Le contact proche avec des animaux n'a pu être vérifié que pour un cas.

Tous les isolats vétérinaires porteurs du gène *tox* testés sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif), de même que les isolats obtenus à partir de prélèvements humains. A noter, une quantité importante des isolats *C. ulcerans tox+* d'origine vétérinaire reçus en 2022 provenaient d'une épidémie dans un centre, causée par une souche clonale. De ce fait nous avons décidé de seulement analyser de manière approfondie (Elek, génomique, antibiogrammes), certains des isolats reçus (au début, au milieu, et en fin de l'épidémie).

C. ulcerans non porteurs du gène *tox* (*tox*-) Tous les isolats proviennent de France métropolitaine. Six isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 33 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=13), des chiens (N=17), un âne (N=1) et 2 chevaux (N=2).

L'âge médian des cas humains est de 74 ans ; avec 67% d'hommes. L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox*- isolés chez l'homme est 100% cutanée. Le contact proche avec des animaux domestiques n'a été renseigné pour aucun des cas. En ce qui concerne les isolats isolés chez les animaux, 30% sont d'origine cutanée (10/33), 21% sont isolés au niveau des oreilles (7/33) et 42% au niveau respiratoire (14/33). Un isolat a été obtenu à partir d'un prélèvement au niveau du tractus génital, et pour 1 isolat l'origine clinique n'a pas été précisée.

Séquençage génomique. Le séquençage génomique des souches de *C. ulcerans* n'a pas entraîné la suspicion de cas groupés, contrairement à ce qui a été observé chez *C. diphtheriae*. En revanche l'analyse génomique a confirmé l'identité des isolats (1 à 3 différences cgMLST) au sein de foyers dans trois cas ; tous ces isolats sont *tox*+:

- ST331 : 2 isolats isolés d'un maître et son chien en janvier 2022 en Bretagne.
- ST331 également : 2 isolats d'un maître et son chien isolés en janvier 2022 en Occitanie
- ST514 : 2 isolats d'un maître et son chien (novembre 2022, Hauts de France).

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

Toutes les corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae* reçues ou isolées au CNR sont testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité au-delà du diamètre critique est mise en évidence, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode des bandelettes à gradient (E- test).

Pour l'interprétation, nous nous basons sur les seuils de sensibilité des corynébactéries publiés en 2023 par l'**EUCAST (issu d'une étude en collaboration avec le CNR et le laboratoire de référence allemand)** ; et à défaut, sur les recommandations CA-SFM 2013.

Le tableau ci-dessous montre le nombre d'isolats résistants aux différents antibiotiques testés pour *C. diphtheriae*; pour les autres espèces y compris *C. ulcerans*, les isolats restent très majoritairement sensibles. A noter, *C. ulcerans* n'est pas sensible à la clindamycine contrairement à *C. diphtheriae*.

Tableau : C. diphtheriae, sensibilité aux antibiotiques en 2022

Antibiotiques	C. diphtheriae tox+ N (%)	C. diphtheriae tox- N (%)	Critères d'interprétation
Beta-lactamines			
Pénicilline	4 (7)	9 (12)	EUCAST 2023
Amoxicilline	1 (2)	6 (8)	CA-SFM, 2013
Oxacilline	4 (7)	14 (18)	CA-SFM, 2013
Céfotaxime	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	EUCAST 2023
Méropénème	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	EUCAST 2023
Cyclines			
Tétracycline	7 (13)	25 (33)	EUCAST 2023
Aminosides			
Gentamicine	29 (52)	41 (54)	CA-SFM/EUCAST, 2019
Macrolides			
Azithromycine	2 (4)	8 (11)	CA-SFM, 2013
Clarithromycine	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	CA-SFM, 2013
Érythromycine	<i>Pas de résistance</i>	2 (2)	EUCAST 2023
Clindamycine	<i>Pas de résistance</i>	4 (5)	EUCAST 2023
Pristinamycine	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	CA-SFM, 2013
Spiramycine *	2 (4)	7 (9)	CA-SFM, 2013
Fluoroquinolones			
Ciprofloxacine	2 (3)	2 (3)	EUCAST 2023
Moxifloxacine	1 (2)	2 (3)	CA-SFM, 2013
Autres			
Linezolide	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	EUCAST 2023
Rifampicine	<i>Pas de résistance</i>	4 (5)	CA-SFM, 2013
Sulfonamide *	4 (7)	9 (12)	CA-SFM, 2013
Triméthoprim	24 (43)	25 (33)	CA-SFM, 2013
Triméthoprim/ Sulphaméthoxazole	22 (39)	21 (28)	EUCAST 2023
Vancomycine	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	CA-SFM, 2013

Le nombre total d'isolats est de 56 tox+ et de 76 tox-. Les données proviennent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode des bandelettes à gradients.

* Pour ces antibiotiques, données basées sur les diamètres, car absence de bandelettes disponible commercialement

Dans l'ensemble, les isolats de *C. diphtheriae* restent sensibles aux antibiotiques de première intention à quelques exceptions près. En effet, en ce qui concerne l'amoxicilline, 1 tox+ et 6 tox- sont résistants. L'isolat tox+ a été isolé chez un individu ayant séjourné en Tunisie.

Pour la pénicilline, 4 tox+ et 9 tox- sont résistants. Deux des tox+ ont été isolés chez des individus ayant séjourné au Mali et 2 autres chez des individus ayant séjourné en Tunisie.

Pour l'érythromycine, 2 isolats tox- sont résistants. Pour l'azithromycine, 2 isolats *C. diphtheriae* tox+ ont une résistance modérée (CMI entre 4 et 6 mg/L) et 8 tox- sont très résistants (CMI entre 16 et 256 mg/L).

Pour la ciprofloxacine 2 *C. diphtheriae* tox+ et 2 tox- sont résistants. Deux tox- et 1 tox+ avaient une CMI très élevée (32 mg/L).

En ce qui concerne la tétracycline, 32 *C. diphtheriae* (7 tox+ et 25 tox-) ont des CMI variant entre 3 et 48 mg/L.

Pour la rifampicine, 4 *C. diphtheriae* tox- ont été trouvés résistants et la CMI était de 32 mg/L. Parmi ces 4 isolats, 3 provenaient de Guyane et 1 d'Ile de France. Deux des 3 isolats en provenance de Guyane ont une mutation dans le gène *rpoB*.

L'analyse de la sensibilité au cotrimoxazole montre une sensibilité diminuée pour 43 isolats: 22 tox+ et 21 tox-. Les CMI varient entre 0,75 et 32 mg/L.

Enfin, nous observons une diminution modérée de la sensibilité à la gentamycine pour 29 *C. diphtheriae* tox+ et 41 *C. diphtheriae* tox- (CMI variant entre 1,5 et 3 mg/L).

Isolats multirésistants. Nous avons observé des isolats multi-résistants (3 classes ou plus, hors résistance naturelle à la fosfomycine) sur la base des antibiotiques suivants : pénicilline, azithromycine, ciprofloxacine, érythromycine, cotrimoxazole, amoxicilline, gentamycine, rifampicine, tétracycline, triméthoprime, sulfaméthoxazole, moxifloxacine, spiramycine, clindamycine et oxacilline.

Le tableau ci-dessous indique le nombre d'isolats multirésistants, par nombre d'antibiotiques.

Tableau : *C. diphtheriae*, nombre d'isolats multirésistants aux antibiotiques

Nombre d'antibiotiques	<i>C. diphtheriae</i> tox+	<i>C. diphtheriae</i> tox-
3	19	22
4	7	18
5	5	/
6	4	11
7	3	10
8	1	/
9	/	5
10	/	2
11	/	1

Quarante-deux isolats ont une sensibilité réduite à au moins 3 de ces antibiotiques. Tous sont des *C. diphtheriae* à l'exception d'un *C. belfantii* (résistant à 3 antibiotiques). Parmi les 41 *C. diphtheriae*, 7 tox+ sont résistants à 4 ou plus

antibiotiques (2 isolats sont résistants à 4 antibiotiques, 1 à 5 antibiotiques, 1 à 6 antibiotiques, 2 à 7 antibiotiques et 1 à 8 antibiotiques). En ce qui concerne les *C. diphtheriae tox-*, nous avons observé 18 isolats avec une sensibilité diminuée à au moins 4 antibiotiques (7 isolats sont résistants à 4 antibiotiques, 1 à 6 antibiotiques, 5 à 7 antibiotiques, 3 à 9 antibiotiques, 1 à 10 antibiotiques et 1 à 11 antibiotiques)

Les 6 isolats avec une sensibilité diminuée pour 8, 9 ou 10 antibiotiques sont tous résistants à la pénicilline, oxacilline, spiramycine, azythromycine, tétracycline, triméthoprime.

L'isolat résistant à 8 antibiotiques est aussi résistant au cotrimoxazole et aux sulfamides. Cet isolat est un *C. diphtheriae tox+* obtenu à partir d'un prélèvement cutané réalisé chez un patient ayant séjourné au Mali.

Les 5 autres isolats sont des *C. diphtheriae tox-*. Deux des isolats résistants à 9 antibiotiques sont résistants en plus au cotrimoxazole, aux sulfamides et à la gentamycine. Ces souches ont été isolées en région Ile de France. Un isolat résistant à 9 antibiotiques est résistant en plus à la gentamycine, l'amoxicilline et à la clindamycine. Cet isolat a été obtenu à partir d'un prélèvement cutané réalisé chez un patient ayant séjourné en Egypte. En ce qui concerne l'isolat résistant à 10 antibiotiques, il est résistant en plus à la gentamycine, l'amoxicilline, au cotrimoxazole et aux sulfamides. L'isolat résistant à 11 antibiotiques est résistant en plus à l'érythromycine. L'isolat résistant à 10 antibiotiques a été obtenu à partir d'un prélèvement cutané réalisé chez un patient ayant séjourné au Mali et celui résistant à 11 antibiotiques a été obtenu à partir d'un prélèvement cutané réalisé chez un patient à Nice.

En conclusion, ces données montrent une émergence de souches multirésistantes de *C. diphtheriae*, surtout parmi les souches *tox-*, mais présente aussi parmi les *tox+*. La pénicilline est fréquemment touchée, parfois en combinaison avec une résistance aux macrolides. La résistance conjointe à ces deux antibiotiques de première intention (recommandés par l'OMS ; en France, l'amoxicilline est utilisée plutôt que la pénicilline) reste exceptionnelle mais est à surveiller tout particulièrement. Certains de ces isolats multirésistants sont associés avec un voyage depuis Afrique.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

National. Il n'y a pas de réseau national de surveillance de la diphtérie. La maladie étant à déclaration obligatoire, le CNR réalise la surveillance de la diphtérie en recevant les souches envoyées par les laboratoires, ou des échantillons cliniques, pour recherche du gène *tox*.

Le CNR informe Santé publique France en temps réel pour chaque détection d'un isolat porteur du gène *tox*. Une déclaration obligatoire est renseignée par le prescripteur. Des analyses épidémiologiques sont faites au cas par cas avec Santé publique France et les ARS et/ou CIRE.

Des analyses microbiologiques populationnelles des souches des localités d'Outre-Mer sont réalisées avec les collègues locaux.

International. Il n'existe pas de réseau professionnel sur le diagnostic et la surveillance de la diphtérie à l'international. Depuis 2013, le réseau Européen Diphtheria Surveillance Network (DIPNET) a été interrompu. Dernière action en date, en 2017, le CNR a participé à un « gap analysis » (identification des besoins) réalisé par l'ECDC sur

les capacités des laboratoires de diagnostic et la disponibilité de l'antitoxine (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/gap-analysis-securing-diphtheria-diagnostic-capacity-and-diphtheria-antitoxin>).

Depuis 2017, le CNR a initié plusieurs collaborations internationales avec : le laboratoire des infections à prévention vaccinales (UKSHA, Colindale, Londres) ; le laboratoire du « Department of Microbiology, National Reference Centre for Toxigenic Corynebacteria, Universitair Ziekenhuis Brussel, Vrije Universiteit Brussel », Bruxelles (Belgique) ; le laboratoire « German Consiliary Laboratory on Diphtheria », Oberschleisheim, Allemagne ; le laboratoire « National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control » à Varsovie (Pologne) ; le NCPHL (National Centre of the Public Health Laboratories), Sana'a, Yemen ; le Département de microbiologie de l'hôpital Providence Health Care, University of British Columbia.

Ces collaborations incluent l'échange d'expertise et la mise en place de projet collaboratifs (qPCR, seuils critiques, Elek, génomique comparative), et l'envoi de souches dans le cadre de contrôles externes de qualité ou de projets de recherche.

Des contacts existent également avec le Centre Collaborateur OMS de la diphtérie (Androulla Efstratiou, UKSHA). Nous échangeons avec ce centre sur les méthodes diagnostiques et capacités de laboratoires, les besoins de formation internationaux et le typage génomique des souches.

En 2022, dans le cadre de l'épidémie chez des migrants originaires majoritairement d'Afghanistan, de formes cutanées à *C. diphtheriae tox+*, nous avons initié une collaboration avec l'OMS, l'ECDC et une dizaine de laboratoires Européens. Nous avons analysé et caractérisé 34 souches de cette épidémie qui nous ont été envoyées par différents laboratoires de biologie médicale en France métropolitaine. Nous avons analysé les caractéristiques cliniques, épidémiologiques et microbiologiques de cette évènement (voir partie recherche).

Nous avons établi également une collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter et collègues) et le laboratoire de référence allemand pour la diphtérie en Bavière (Andreas Sing et collègues). Le but de cette collaboration était de définir les seuils critiques de la sensibilité aux antibiotiques pour

C. diphtheriae et *C. ulcerans* de manière robuste, sur la base de la distribution naturelle qui permet également de définir des cut-offs écologiques (ECOFFs). Les seuils ont été définis et publiés dans la version 13 du référentiel de l'EUCAST pour l'interprétation des concentrations inhibitrices minimales et diamètres de zones d'inhibition pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques : "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>". Un article décrivant ces résultats est en cours de rédaction.

Enfin, les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données des génotypes MLST de *C. diphtheriae* (<https://bigsd.bpasteur.fr>), standard international qui permet la comparaison des souches et le recensement de la biodiversité du complexe diphtheriae.

Contrôles externes de qualité. Comme chaque année, nous avons organisé un contrôle externe de qualité pour nos collègues à l'international qui en font la demande. En décembre 2022, le CNR a envoyé 6 échantillons à LMB

(Bruxelles, Belgique). Pour chaque échantillon le test consistait en rechercher, identifier et caractériser les isolats présents dans ces échantillons. Nous avons analysé les résultats et rendu notre évaluation.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNR a réalisé quelques études ponctuelles concourant à la surveillance de la diphtérie, qui sont décrites en partie 6 :

- Épidémiologie génomique de *Corynebacterium diphtheriae* en Nouvelle-Calédonie
- Corynébactéries du complexe d'espèces diphtheriae chez les animaux de compagnie : Caractérisation clinique et microbiologique de 64 cas en France
- Lignée SL453 toxigénique multirésistante de *Corynebacterium diphtheriae*, avec deux nouveaux îlots génomiques de résistance

Les trois études ci-dessus ont été publiées.

Par ailleurs :

- Une étude sur la réémergence de la diphtérie à La Réunion a également été réalisée (en collaboration avec l'équipe de O. Belmonte, CHU Félix Guyon de La Réunion, Saint-Denis). Cette étude est en révision dans *Emerg. Inf. Diseases*. **Résumé** : Sur la période 2015-2020, 26 cas d'infections à Corynébactéries du complexe d'espèces *C. diphtheriae* ont été signalés dans le territoire français d'outre-mer de La Réunion (océan Indien). Les analyses cliniques, épidémiologiques et microbiologiques ont révélé une émergence de ces pathogènes. La diversité génétique des isolats indique la circulation de plusieurs sous-lignées de la diphtérie sur l'île et leur transmission locale.

4 Alertes

4.1 Cas groupés ou phénomènes anormaux

À l'été 2022, une augmentation du nombre de cas de diphtérie chez des personnes migrantes était identifiée en France et dans d'autres pays européens. Nous avons contribué à investiguer cet événement avec Santé publique France et les ARS concernées.

Les données issues de la DO et des investigations menées autour des cas, ont révélé 35 cas de diphtérie à *C. diphtheriae tox+* en France métropolitaine, contre 3,4 cas en moyenne annuelle sur les 5 dernières années. La majorité des cas concernait des personnes migrantes (n=27) ou des voyageurs (n=6). Pour ces cas, la notion d'un séjour dans un ou plusieurs des pays suivants a été retrouvée notamment en Afghanistan (n=24), Turquie (n=6), Serbie (n=6), Italie (n=5), Autriche (n=4), Tunisie (n=3). Un cas a probablement été infecté en métropole par le contact d'une personne de retour du Togo. Un cas n'était pas interrogeable. Les cas étaient majoritairement des hommes (n=32), de moyenne d'âge de 23 ans, 11 résidaient en foyer d'hébergement pour migrants et 3 seulement étaient à jour de leur

vaccination. Les cas ont été diagnostiqués dans 9 régions. Cliniquement, 27 cas présentaient une forme cutanée, 4 une forme ORL classique de diphtérie, 1 une forme ORL peu symptomatique (cas autochtone), 3 étaient asymptomatiques (sphère ORL) et 1 cas est décédé. Le génotypage de 34 isolats a montré 12 groupes génétiques différents (voir **Figure partie 3, génomique**) dont 5 parmi les migrants en provenance d'Afghanistan : SL377-GC817 (8 cas), SL466-GC823 (1 cas), SL384-GC805/GC217 (7 cas), SL698-GC795 (7 cas) et SL698-GC804 (2 cas). Ces groupes ont également été identifiés chez des migrants dans d'autres pays européens.

Il a donc été observé en 2022 une augmentation inhabituelle des cas de diphtérie à *C. diphtheriae* en France métropolitaine. La couverture vaccinale contre la diphtérie en France métropolitaine est très élevée : 96% pour le rappel à 11 mois chez les nourrissons en 2019. Le risque d'apparition de cas graves ou de clusters dans la population générale française est donc extrêmement faible. Cependant, la survenue de cas de diphtérie chez des personnes migrantes, très majoritairement non à jour de leurs vaccinations, implique que les professionnels prenant en charge ces populations soient particulièrement vigilants au repérage des signes cliniques de diphtérie et à la mise à jour des vaccinations de ces populations.

4.2 Nombre d'alertes

Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox* il alerte directement Santé Publique France par courriel (alerte@santepubliquefrance.fr et dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr), en même temps que le rendu du résultat *tox* au laboratoire expéditeur. Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf).

En 2022, 254 alertes ont été réalisées. Parmi ces 254 alertes, 56 correspondaient à des souches isolées chez l'homme (49 *C. diphtheriae* et 7 *C. ulcerans*) et 198 souches isolées chez l'animal (7 *C. diphtheriae* et 191 *C. ulcerans*)

En amont de ces alertes, selon le contexte, le CNR recommande aux biologistes de contacter les ARS pour se préparer à tracer les contacts des cas.

En 2022 nous avons mis en place l'envoi systématique, en même temps que le courriel contenant les résultats, d'un courriel aux biologistes contenant les informations nécessaires pour gérer un cas lors de la détection du gène *tox* dans un isolat.

4.3 Sollicitations et aide à la décision

Le CNR a été consulté par l'ANSM (janvier 2022) pour conseils sur la politique d'utilisation des antitoxines dans le cadre de la recrudescence des infections cutanées à *C. diphtheriae* en 2022.

Le CNR a révisé en mars 2022 pour l'INRS sur sa demande, les fiches de la base de données Baobab (<https://www.inrs.fr/publications/bdd/baobab.html>) concernant les *Corynebacterium*.

Le CNR a été consulté par UKSHA dans le cadre de la réémergence des cas d'infections chez des migrants, sur le sujet de la prophylaxie antimicrobienne dans un contexte d'apparition de souches résistantes aux macrolides.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le site web du CNR donne nos informations de contact : courrier électronique et téléphone. Nous recevons très régulièrement ces deux types de contacts auxquels nous répondons en temps réel.

Le CNR est joignable aux heures ouvrées par téléphone, aux 4 postes du responsable, des adjoints et du secrétariat, et sur le portable du responsable en cas d'urgence.

Le CNR peut également être joint par courriel (coryne@pasteur.fr).

Ces informations de contact et la liste des jours fériés annuels sont disponibles et mises à jour sur le site web du CNR. Un contact (CIBU) est donné pour les jours non ouvrés.

En 2022, nous avons documenté 40 appels de la part de médecins biologistes ou infectiologues qui souhaitent des renseignements divers sur la diphtérie, la prise en charge d'un cas ou autour d'un cas, et/ou sur l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié à cette activité.

Un webinaire a été donné par S Brisse conjointement avec K Museux le 8 novembre 2022 auprès des vétérinaires français, sur le thème de la diphtérie animale zoonotique (cycle de séminaires organisé par Cerba-Vet collège).

En 2022, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel.

De plus, une FAQ (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-reference/cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae/foire-aux-questions>) a été mise en ligne sur le site web du CNR, qui répond aux questions les plus fréquentes :

- Quelles sont les situations pour lesquelles la recherche du gène *tox* doit être faite en urgence ?
- Quelles sont les recommandations pour l'utilisation des antitoxines diphtériques ?
- Conduite à tenir dans les cas particuliers suivants :
 - conduite à tenir lors de la découverte de sujets porteurs asymptomatiques de *C. ulcerans* ou de *C. diphtheriae* ;
 - conduite à tenir dans l'entourage d'une personne présentant un cas de diphtérie à *C. ulcerans* ;
 - conduite à tenir autour des cas d'infection à *C. diphtheriae* ou *ulcerans tox*-négatif
- Le CNR couvre-t-il les Corynébactéries en général, dont *C. striatum* ou *C. pseudodiphtheriticum* ?

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Nous sommes en contact quasi-quotidien avec SpF dans le cadre de nos alertes en cas de détection du gène *tox*. En 2022, 254 alertes (notifications de détection de souches *tox*+) ont été réalisées. De plus, nous avons été sollicités

régulièrement par les ARS ou CIRE pour demande des conseils sur la conduite à tenir sur des isolats de *C. ulcerans* d'origine vétérinaire.

Le CNR a été consulté par l'ANSM (janvier 2022) pour conseils sur la politique d'utilisation des antitoxines dans le cadre de la recrudescence des infections cutanées à *C. diphtheriae* en 2022.

Le CNR a révisé en mars 2022 pour l'INRS sur sa demande, les fiches de la base de données Baobab (<https://www.inrs.fr/publications/bdd/baobab.html>) concernant les Corynebacterium.

Le CNR a été consulté par UKSHA dans le cadre de la réémergence des cas d'infections chez des migrants, sur le sujet de la prophylaxie antimicrobienne dans un contexte d'apparition de souches résistantes aux macrolides.

La mission COREB, suite à une demande de la DGOS pour créer une fiche radar / repère au sujet de la diphtérie, dans le contexte actuel d'accueil de réfugiés Ukrainiens dont la couverture vaccinale est plus faible, a sollicité le CNR pour relecture et corrections de cette fiche. Cette fiche a été envoyé aux cliniciens de 1ere ligne fin 2022.

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

Le responsable du CNR (Sylvain Brisse) a été consulté par de nombreux média à l'occasion de la recrudescence des infections chez les migrants. Plusieurs media Anglais en particulier (The Times, The Daily Mail) et français (Le Figaro) ont réalisé des interviews puis des articles (12 au 14 avril 2023 en particulier).

Deutsche Welle (radio allemande diffusant en francophone en Afrique) a interviewé S Brisse le 9 février 2023 à l'occasion de la recrudescence de la diphtérie au Nigéria.

Le Figaro (N Szapiro) a également consulté S. Brisse pour un article sur la recrudescence des maladies infectieuses (29 mai 2023)

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

A) Études finalisées dans l'année 2022 et publiées (déjà considérées dans le rapport de renouvellement de mandat)

1. Épidémiologie génomique de *Corynebacterium diphtheriae* en Nouvelle-Calédonie.

Un nombre croissant d'isolats de *Corynebacterium diphtheriae* a été observé ces dernières années dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie. Nous avons cherché à analyser les caractéristiques cliniques et microbiologiques de ces isolats. Tous les isolats de *C. diphtheriae* identifiés en Nouvelle-Calédonie de mai 2015 à mai 2019 ont été inclus. Pour chaque cas, une consultation rétrospective des dossiers des patients a été réalisée. Les phénotypes de sensibilité aux antimicrobiens, l'expression du gène *tox* et de la toxine diphtérique, le biovar et la séquence génomique ont été

déterminés. Le « Core genome multilocus sequence typing » (cgMLST), le MLST à 7 gènes et la recherche de gènes d'intérêt ont été effectués à partir d'assemblages génomiques.

Cinquante-huit isolats ont été inclus, avec un âge médian des patients de 28 ans (extrêmes : 9 jours à 78 ans). L'origine cutanée représentait 51 des 58 isolats (87,9 %) et *C. diphtheriae* était associée à *Staphylococcus aureus* et/ou *Streptococcus pyogenes* dans les trois quarts des cas. La moitié des cas provenaient soit de la ville principale de Nouméa (24 %, 14/58) soit de l'île peu peuplée de Lifou (26 %, 15/58). Six isolats *tox* positifs ont été identifiés, associés à un voyage récent au Vanuatu ; 5 de ces cas étaient liés et le cgMLST a confirmé une transmission récente. Deux cas d'endocardite chez de jeunes patientes ayant des antécédents de rhumatisme articulaire aigu concernaient des isolats *tox*-négatifs.

Les 58 isolats étaient pour la plupart sensibles aux antibiotiques couramment utilisés. En particulier, aucun isolat n'était résistant aux molécules de première intention amoxicilline ou érythromycine. La résistance à la tétracycline a été trouvée dans un groupe génomique de 17 isolats (29 %), dont 16 portaient le gène *tetO*. Il y avait 13 sous-lignées cgMLST, dont la plupart ont également été observées en Australie, pays voisin. L'introduction possible de souches *tox* positives en provenance d'une île voisine met en évidence que la surveillance de la diphtérie doit être maintenue en Nouvelle-Calédonie et que la vaccination dans les îles voisines doit être améliorée.

En conclusion, l'analyse des souches de *C. diphtheriae* de l'archipel tropical de Nouvelle-Calédonie a révélé une grande diversité génétique avec des sous-lignées pouvant être rattachées à la Polynésie, à l'Australie ou à la France métropolitaine. Des isolats toxigènes ont été observés chez des patients revenant du Vanuatu, montrant l'importance d'améliorer la couverture vaccinale là où elle est insuffisante. Cette étude illustre également l'importance de l'inclusion d'isolats de sources cutanées en plus des cas respiratoires pour la surveillance de la diphtérie, afin de fournir une image épidémiologique plus complète de la diversité et de la transmission de *C. diphtheriae*.

Ce travail a été publié : Tessier E, Hennart M, [Badell E](#), Passet V, [Toubiana J](#), Biron A, Gourinat AC, Merlet A, Colot J, Brisse S. Genomic Epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* in New Caledonia. *Microbiol Spectr.* 2023 Apr 12:e0461622. doi: 10.1128/spectrum.04616-22. 2

2. Corynébactéries du complexe d'espèces *diphtheriae* chez les animaux de compagnie : Caractérisation clinique et microbiologique de 64 cas en France.

Les corynébactéries appartenant au complexe d'espèces *C. diphtheriae* (CdSC) peuvent provoquer la diphtérie chez l'homme et ont été signalées chez des animaux de compagnie. Notre objectif était de décrire les cas d'infection animale causés par des isolats de CdSC.

Au total, 18 308 animaux (chiens, chats, chevaux et petits mammifères) atteints de rhinite, dermatite, plaies non cicatrisantes et otites ont été prélevés en France métropolitaine entre août 2019 et août 2021. Des données sur les symptômes, l'âge, la race et la région administrative d'origine ont été recueillies. Les bactéries cultivées ont été analysées pour la présence du gène *tox*, la production de la toxine diphtérique et la sensibilité aux antimicrobiens et ont été génotypées par typage de séquence multilocus.

Corynebacterium ulcerans a été identifié dans 51 cas dont 24 toxinogènes. La rhinite était la présentation la plus fréquente (18/51). Onze cas (6 chats, 4 chiens et 1 rat) étaient des mono-infections. Les chiens de grande race, en particulier les bergers allemands (9 chiens sur 28 ; $P < 0,00001$), étaient surreprésentés. Les isolats de *C. ulcerans* étaient sensibles à tous les antibiotiques testés. *C. diphtheriae tox* positif a été identifié chez 2 chevaux.

Enfin, 11 cas d'infections (9 chiens et 2 chats ; majoritairement des otites chroniques et 2 plaies) étaient *C. rouxii*, une

espèce récemment définie ; tous tox-négatifs.

Les isolats de *C. rouxii* et *C. diphtheriae* étaient sensibles à la plupart des antibiotiques testés, et presque toutes ces infections étaient polymicrobiennes. Les mono-infections à *C. ulcerans* indiquent un potentiel pathogène primaire pour les animaux. *C. ulcerans* représente un risque zoonotique important et *C. rouxii* semble représenter un nouvel agent zoonotique. Cette série de cas fournit de nouvelles données cliniques et microbiologiques sur les infections à CdSC et souligne la nécessité de gérer les animaux et leurs contacts humains.

En conclusion : nous rapportons la survenue et les caractéristiques cliniques et microbiologiques des infections causées par les membres de la CdSC chez les animaux de compagnie. Il s'agit de la première étude basée sur l'analyse systématique d'une très grande cohorte animale (18 308 échantillons), qui fournit des données sur la fréquence des isolats de CdSC dans divers types d'échantillons cliniques d'animaux. La connaissance de ce groupe

bactérien zoonotique reste faible chez les vétérinaires et les laboratoires vétérinaires, parmi lesquels il est souvent considéré comme commensal chez les animaux. Nous suggérons qu'en cas de détection de CdSC chez l'animal, les laboratoires vétérinaires soient encouragés à envoyer les échantillons à un laboratoire de référence pour analyse de la présence du gène *tox*. Ce travail est pertinent pour l'élaboration de lignes directrices dans le cas des infections à CdSC chez les animaux et souligne leur pertinence en matière de santé publique compte tenu du risque de transmission zoonotique.

Ce travail a été publié : Museux K, Arcari G, Rodrigo G, Hennart M, Badell E, Toubiana J, Brisse S. Corynebacteria of the diphtheriae Species Complex in Companion Animals: Clinical and Microbiological Characterization of 64 Cases from France. *Microbiol Spectr*. 2023 Apr 6:e0000623. doi: 10.1128/spectrum.00006-23.

3. Lignée SL453 toxigénique et multirésistante de *Corynebacterium diphtheriae* avec deux nouveaux îlots génomiques de résistance.

L'antibiothérapie est importante pour la prise en charge des cas de diphtérie, mais les connaissances sur l'émergence de la multirésistance chez *Corynebacterium diphtheriae* sont rares. Nous rapportons les caractéristiques génomiques de deux isolats toxigéniques multirésistants prélevés sur des plaies en France à 3 ans d'intervalle.

Les deux isolats étaient résistants à la spiramycine, la clindamycine, la tétracycline, la kanamycine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. Les gènes *ermX*, *cmx*, *aph(3')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aph(3')-Ic*, *aadA1*, *dfrA15*, *sul1*, *cmlA*, *cmlR* et *tet(33)* ont été regroupés dans deux îlots génomiques, l'un constitué de deux transposons et d'un intégrom, l'autre étant flanqué de deux séquences d'insertion IS6100. Un isolat présentait en outre des mutations dans *gyrA* et *rpoB* et était résistant à la ciprofloxacine et à la rifampicine. Les deux isolats appartenaient à la sous-lignée 453 (SL453), ainsi que 25 isolats de 11 autres pays (<https://bigsd.bpasteur.fr/diphtheria/>).

En conclusion, SL453 est une sous-lignée toxigène cosmopolite de *C. diphtheriae*, dont un sous-ensemble a acquis une multirésistance. Même si la pénicilline, l'amoxicilline et l'érythromycine, recommandées en première intention dans le traitement de la diphtérie, restent actives, la surveillance de la diphtérie doit tenir compte du risque de dissémination des souches multirésistantes et de leurs éléments génétiques.

Ce travail a été publié : Arcari G, Hennart M, Badell E, Brisse S. Multidrug-resistant toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* sublineage 453 with two novel resistance genomic islands. *Microb Genom*. 2023 Jan;9(1):mgen000923. doi: 10.1099/mgen.0.000923. PMID: 36748453.

4. *Corynebacterium ulcerans* sous forme de tiges ramifiées filamenteuses.

Un homme de 33 ans s'est présenté à l'hôpital pour une adénite axillaire gauche apparue 1 mois plus tôt. Il n'avait aucun antécédent médical et était à jour de ses vaccinations. Il possédait deux chiens et avait été récemment en contact avec du bétail dans le cadre de son travail d'exterminateur de rats. L'examen physique a révélé une lésion axillaire inflammatoire croissante associée à une toux sèche. L'analyse sanguine a révélé une hyperéosinophilie (nombre d'éosinophiles : $2,53 \times 10^9/L$). La coloration de Gram de l'aspiration des ganglions lymphatiques a montré des tiges ramifiées filamenteuses à Gram variable. Après incubation de 24 heures sous atmosphère aérobie à 37 ° C, la culture sur gélose Columbia (Oxoid ThermoFisher Scientific [Basingstoke, Royaume-Uni]) était positive avec des colonies gris-blanchâtres identifiées comme *Corynebacterium ulcerans* par MALDI-TOF (MS Biotyper®, Bruker Daltonics, Billerica, USA ; bibliothèque MBT v10).

Compte tenu de l'écart entre l'examen direct et la culture, une analyse métagénomique a été réalisée directement sur l'échantillon et a relevé la seule présence de *C. ulcerans*. La détection moléculaire par PCR en temps réel du gène de la toxine diphtérique (*tox*) et le test d'Elek étaient positifs. L'écouvillonnage pharyngé était négatif pour *C. ulcerans*, ainsi que des échantillons prélevés sur des membres de la famille et des animaux de compagnie dans le cadre de l'enquête de l'ARS. Une allergie à l'amoxicilline étant suspectée, un traitement par azithromycine (500 mg par jour pendant 3 jours) a été instauré.

C. ulcerans est un Gram positif en forme de bâtonnet à massue, généralement disposé en forme de V ou de palissades. Bien que décrit comme polymorphe, l'aspect ramifié des bâtonnets reste exceptionnel.

Ce travail a été publié : Lamoureux C, Rézig S, Le Bars H, Le Divenah F, Tandé D, Vélo-Suarez L, [Badell E](#), [Brisse S](#), Héry-Arnaud G, Beauruelle C. *Corynebacterium ulcerans* as filamentous branching rods. Clin Microbiol Infect. 2023 May;29(5):600-601. doi: 10.1016/j.cmi.2022.11.016. Epub 2022 Nov 25.

B. Études finalisées en 2022 et publiées ou en prépublication en 2023

1. **Une étude sur la réémergence de la diphtérie à La Réunion** a été réalisée (en collaboration avec l'équipe de O. Belmonte, CHU Félix Guyon de La Réunion, Saint-Denis).

Résumé : Sur la période 2015-2020, 26 cas d'infections à Corynébactéries du complexe d'espèces *C. diphtheriae* ont été signalés dans le territoire français d'outre-mer de La Réunion (océan Indien). Les analyses cliniques, épidémiologiques et microbiologiques ont révélé une émergence de ces pathogènes. La diversité génétique des isolats indique la circulation de plusieurs sous-lignées de la diphtérie sur l'île et leur transmission locale.

Cette étude est en révision dans Emerg. Inf. Diseases : Emerging infections by Corynebacteria of the diphtheriae species complex on Reunion Island (Indian Ocean): clinical, epidemiological and microbiological analyses, 2015-2020. Thomas Garrigos^{1*}, Anais Grimal¹, Edgar Badell, Nicolas Traversier, Sandrine Picot, Anne Lignereux, Mahery Ramiandrisoa, Céline Ben Cimon, Marie-Christine Jaffar-Bandjee, Houssein Gbaguidi-Haore, Julie Toubiana, Sylvain Brisse, Guillaume Miltgen², Olivier Belmonte²

2. Réémergence de la diphtérie en 2022 en France et mise en contexte global

La diphtérie, causée par *Corynebacterium diphtheriae*, réapparaît en France, et plus largement en Europe depuis 2022, liée à des personnes migrantes. Afin de comprendre cette réémergence, nous avons collaboré étroitement avec Santé publique France pour un bilan épidémiologique de cet événement (voir **partie 4.1**). Étant donné que le séquençage génomique peut fournir des informations sur les voies de transmission et les génotypes préoccupants, mais qu'il n'existe actuellement aucune approche standard pour détecter les caractéristiques génomiques importantes sur le plan clinique et pour interpréter l'émergence dans le cadre de la population mondiale de *C. diphtheriae*, nous avons développé le pipeline bioinformatique diphtOscan (disponible à l'adresse <https://gitlab.pasteur.fr/BEBP/diphtoscan>) pour extraire des génomes des corynébactéries du complexe d'espèces *diphtheriae*, des caractéristiques importantes sur le plan médical, notamment la présence et la perturbation du gène de la toxine diphtérique. Nous avons analysé les 101 isolats humains de *C. diphtheriae* collectés en 2022 en France métropolitaine et outre-mer (France-2022). Pour définir le contexte démographique de cette émergence, nous avons séquencé 379 isolats supplémentaires (principalement en France, 2018-2021) et collationné 870 génomes accessibles dans les bases de séquences publiques.

Les isolats France-2022 comprenaient 45 isolats *tox*-positifs (44 toxigènes), principalement importés, appartenant à 10 sous-lignées (<500 gènes distincts). L'ensemble des données mondiales comprenait 245 sous-lignées et 33,9% de génomes *tox*-positifs, DIPHTOSCAN prédisant la non-toxigénicité pour 16,0 % d'entre eux. 12 % des isolats mondiaux et 43,6 % des isolats de France-2022 étaient multirésistants. Une convergence entre la toxigénicité et la résistance à la pénicilline et à l'érythromycine a été observée chez 2 isolats de France-2022. Les lignées phylogénétiques Gravis et Mitis présentaient un contraste frappant en ce qui concerne les gènes associés à la pathogénicité.

Ce travail fournit un outil bioinformatique et un cadre populationnel global pour analyser les génomes de *C. diphtheriae*, révélant d'importantes hétérogénéités dans les caractéristiques de virulence et de résistance. Les génotypes émergents combinant la toxigénicité et la résistance aux antimicrobiens de première ligne représentent de nouvelles menaces. Les études épidémiologiques génomiques de *C. diphtheriae* devraient être intensifiées à l'échelle mondiale afin d'améliorer la compréhension de la réémergence et de la propagation spatiale.

Cette étude est en révision dans Peer Community In (PCI) : A global *Corynebacterium diphtheriae* genomic framework sheds light on current diphtheria reemergence. Melanie Hennart a,b,c, Chiara Crestani a, Sebastien Bridel a, Nathalie Armatys a,b, Sylvie Brémont a,b, Annick Carmi-Leroy a,b, Annie Landier a,b, Virginie Passet a,b, Laure Fonteneau e, Sophie Vaux e, Julie Toubiana a,b,d, Edgar Badell a,b and Sylvain Brisse a,b,*.

C. Études en cours de finalisation

1. Largest European *Corynebacterium diphtheriae* outbreak in 50 years: phenotypic and genomic analysis.

The 2022 EU diphtheria consortium

La réémergence en 2022 de la diphtérie en Europe, liée à des personnes migrantes, fait l'objet d'une étude conjointe avec nos homologues Européens et le CDC Européen, qui est encore en cours. Un résumé provisoire est fourni.

Depuis l'été 2022, un nombre croissant de cas d'infections à *Corynebacterium diphtheriae* a été diagnostiqué dans des centres d'accueil de migrants en Europe. La plupart des cas concernaient la diphtérie cutanée, bien que certains cas respiratoires et des décès aient été signalés. Un consortium paneuropéen a évalué la parenté génétique et la sensibilité aux antibiotiques des isolats de l'épidémie.

Les 363 isolats toxigènes de *C. diphtheriae* provenant de dix pays européens ont fait l'objet d'une analyse microbiologique. Une combinaison de méthodes cgMLST et SNP a été utilisée pour définir les relations phylogénétiques des isolats de l'épidémie. Le typage des séquences, des intégrons, des toxines et de la résistance aux antimicrobiens (AMR) a été réalisé avec diphtOscan. Les tests de résistance phénotypique ont été réalisés conformément aux lignes directrices de l'EUCAST.

L'analyse cgMLST a permis d'identifier quatre groupes génomiques de foyers multinationaux (GC) : GC795 (ST574, n=134), GC817 (ST377, n=114), GC671 (ST377, n=19) et GC217 (ST384, n=79). Notamment, GC671 portait les gènes *ermX* et *blaOXA-2* sur un intégron. Les souches portant le gène *ermX* étaient phénotypiquement résistantes à l'érythromycine ; les isolats portant le gène *pbp2m* étaient résistants à la pénicilline, mais sensibles à l'amoxicilline, et ceux portant le gène *blaOXA-2* restaient sensibles à toutes les bêta-lactamines.

L'analyse des SNP à l'intérieur des quatre groupes génomiques a montré des distances SNP d'un maximum de 14 SNPs. La distribution de chaque groupe dans plusieurs pays, avec quelques groupes génétiques à plus petite échelle observés à l'intérieur des pays, a démontré des transmissions récentes, qui se sont probablement produites au cours de voyages et dans des installations pour migrants.

L'augmentation du nombre de cas de *C. diphtheriae* chez les migrants est préoccupante, en particulier si l'on considère la présence de gènes de résistance aux antimicrobiens qui menacent l'efficacité des traitements de première intention, dans un contexte de manque d'approvisionnement en antitoxine au niveau mondial. Pour réduire la transmission, nous recommandons une surveillance clinique accrue, un traitement rapide, la vaccination, la confirmation en laboratoire et une couverture vaccinale de routine élevée. La poursuite de la surveillance à l'aide d'approches de typage moléculaire et de génomique peut contribuer à l'identification d'événements de propagation.

2. Une série de cas d'infections par des corynébactéries du complexe *diphtheriae* en Guyane française

Auteurs (ordre à confirmer): Mélanie Gaillet, Mélanie Hennart, Vincent Sainte Rose, Céline Michaud, Romain Blazot, Magalie Demar, Luisiane Carvalho, Jean François Carod, Audrey Andrieu, Félix Djossou, Loïc Epelboin, Edgar Badell, Julie Toubiana, et Sylvain Brisse

Les cas d'infections humaines à corynébactéries étaient jusqu'à récemment exceptionnels en Guyane. Depuis 2016, 60 cas ont été rapportés. Nous avons cherché à mieux comprendre cette évolution épidémiologique, qui soulève d'importantes questions de santé publique.

Nous avons réalisé une étude épidémiologique, rétrospective et multicentrique. Tous les cas humains d'infection à corynébactéries du complexe d'espèces diphtheriae diagnostiqués en Guyane entre le 1er janvier 2016 et le 31 décembre 2021 ont été inclus. Nous décrivons les caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biologiques des cas. 60 cas ont été inclus, dont la plupart étaient dus à *Corynebacterium diphtheriae* et un à *C. ulcerans*. L'incidence estimée était de 0,7 cas pour 100 000 habitants en 2016, 8,0 en 2021. L'âge moyen était de 29,2 ans (SD = 22,8), le sex-ratio de 0,6 (F / M = 22 / 38). La plupart des patients (80% ; n = 48 / 60) ont été diagnostiqués dans les territoires amazoniens de la Guyane française. Nous avons observé des antécédents d'immunodépression pour 10% (n = 6 / 58) des patients et une pathologie cutanée chronique préexistante pour 14% (n = 8 / 58) d'entre eux. Parmi les 44 patients dont les données étaient disponibles, 66% (n = 29) avaient une vaccination antidiphthérique à jour.

Parmi les 61 isolats de *C. diphtheriae*, cinq étaient *tox+* et Elek négatifs. Les isolats provenaient de lésions cutanées dans 95% (n = 58 / 61) des cas, d'un échantillon pulmonaire, d'un échantillon sanguin et d'un échantillon muqueux. Les trois isolats de *C. ulcerans* provenaient de lésions cutanées d'un seul patient. Une évolution favorable de la maladie a été observée dans 93 % des cas (n = 37 / 40 cas pour lesquels des données sont disponibles). Aucun isolat n'était résistant aux médicaments de première intention (amoxicilline et érythromycine). Le principal gène de résistance de *C. diphtheriae* était *sul1* (résistance au sulfaméthoxazole), observé dans 18% des isolats (n = 11/60) et 7% (n = 4/61) des isolats portaient les trois gènes *sul1*, *tet(A)* et *cmx*. Il y avait 16 sous-lignées cgMLST (SL), la sous-lignée SL536 étant prédominante. D'après les bases de données publiques, la plupart de ces SL n'ont été observées qu'en Guyane française.

Des infections à *C. diphtheriae*, y compris des formes invasives, ont été rapportées en Guyane française au cours des 7 dernières années. La bactérie semble circuler de façon endémique. Toutes ces infections étaient non-toxinogènes. Cependant, l'émergence de souches toxinogènes pourrait trouver une niche favorable, la couverture vaccinale étant insuffisante sur ce territoire. Cette étude souligne l'importance de sensibiliser les praticiens de santé de première ligne aux infections par *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* et à leur prévention.

3. Définition de seuils critiques de sensibilité aux antibiotiques pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans*

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons souvent des résistances (voir plus haut), même si l'impact en santé publique de la résistance aux antibiotiques chez l'agent de la diphtérie reste mineur. Néanmoins, jusqu'à 2022 les seuils critiques étaient pas ou mal définis pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans*, les deux espèces cliniquement les plus importantes du complexe diphtheriae.

En collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter et collègues) et le laboratoire de référence allemand en Bavière (Andreas Sing et collègues), nous avons cherché à définir les seuils critiques pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* de manière robuste, sur la base de la distribution naturelle qui permettra également de définir des cut-offs écologiques (ECOFFs).

Dans ce travail, 400 souches (200 du CNR français, 200 du centre de référence en Allemagne ; moitié *C.*

diphtheriae, moitié *C. ulcerans* dans chaque pays) ont été testées par la méthode des diamètres et de microdilution en plaques (CMI), pour les antibiotiques les plus pertinents. Les analyses ont abouti à une proposition de seuils critiques du comité de l'EUCAST est prévue (Janvier 2023, version 13, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints), pour la première fois pour les agents de la diphtérie. Une publication correspondante sera préparée.

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

(i) Publications nationales

Aucune publication nationale à reporter cette année

(ii) Publications internationales

1. Tessier E, Hennart M, Badell E, Passet V, Toubiana J, Biron A, Gourinat AC, Merlet A, Colot J, Brisse S. Genomic Epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* in New Caledonia. *Microbiol Spectr*. 2023 Apr 12:e0461622. doi: 10.1128/spectrum.04616-22. 2
2. Museux K, Arcari G, Rodrigo G, Hennart M, Badell E, Toubiana J, Brisse S. *Corynebacteria* of the *diphtheriae* Species Complex in Companion Animals: Clinical and Microbiological Characterization of 64 Cases from France. *Microbiol Spectr*. 2023 Apr 6:e0000623. doi: 10.1128/spectrum.00006-23.
3. Arcari G, Hennart M, Badell E, Brisse S. Multidrug-resistant toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* sublineage 453 with two novel resistance genomic islands. *Microb Genom*. 2023 Jan;9(1):mgen000923. doi: 10.1099/mgen.0.000923. PMID: 36748453.
4. Lamoureux C, Rézig S, Le Bars H, Le Divenah F, Tandé D, Vélo-Suarez L, Badell E, Brisse S, Héry-Arnaud G, Beauvue C. *Corynebacterium ulcerans* as filamentous branching rods. *Clin Microbiol Infect*. 2023 May;29(5):600-601. doi: 10.1016/j.cmi.2022.11.016. Epub 2022 Nov 25.
5. Delvallez G, Badell E, Cheng S, Meng S, Tong V, Norman J, Toubiana J, Vandellanoot K, Bañuls AL, Hide M, Brisse S. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in hallux ulceration. *J Infect Dev Ctries*. 2022 Jun 30;16(6):1118-1121. doi: 10.3855/jidc.16153.
6. Melanie Hennart, Chiara Crestani, Sebastien Bridel, Nathalie Armatys, Sylvie Brémont, Annick Carmi-Leroy, Annie Landier, Virginie Passet, Laure Fonteneau, Sophie Vaux, Julie Toubiana, Edgar Badell and Sylvain Brisse*. A global *Corynebacterium diphtheriae* genomic framework sheds light on current diphtheria reemergence. En révision, Peer Community In.

(iii) Communications nationales

1. Le CNR a contribué à un article sur *C. ulcerans* dans le journal La Semaine Vétérinaire (n° 1937 - 22/03/2022 Attention au risque de diphtérie à *Corynebacterium ulcerans*), sous forme d'interview/conseil.

2. Sylvain Brisse a donné un webinaire conjointement avec K Museux le 8 novembre 2022 auprès des vétérinaires français, sur le thème de la diphtérie animale zoonotique (cycle de séminaires organisé par Cerba-Vet collège).

(iv) Communications internationales

1. Sylvain Brisse a donné une présentation sélectionnée sur abstract à l'ECCMID le 14 avril 2023 sur la réémergence de la diphtérie (session maladies à prévention vaccinale réémergentes)

(v) Conférences sur invitation

1. Sylvain Brisse a donné une présentation le 26 octobre 2022 sur la réémergence de la diphtérie et les outils génomiques disponibles, à l'invitation de WHO-Europe
2. Sylvain Brisse a donné une présentation le 24 novembre 2022 sur la diphtérie et ses nouveautés, à l'Institut Pasteur de Madagascar.

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

7.1 Coopération avec les laboratoires de santé animale

Il n'existe pas de LNR ou laboratoire de santé animale concernant la diphtérie. De ce fait, le CNR est en contact très régulier avec les gros laboratoires d'analyses médicales vétérinaires (par exemple, CERBA-VET, VETODIAG). Nous échangeons régulièrement par téléphone, visioconférence ou mail avec ceux-ci autour de cas particuliers ou pour des bilans.

En 2022, nous avons finalisé une étude conjointe avec CERBA-VET. Plus de 18 000 échantillons analysés par CERBA-VET ont été inclus, et un travail d'analyse microbiologique et clinique d'une série de 64 cas (2019-2020) d'infections à Corynébactéries du complexe d'espèces *diphtheriae* chez l'animal, a été réalisée (voir **partie 6.1**). Cette étude a été publiée et représente à ce jour, de loin, la plus vaste étude d'infections par les agents de la diphtérie chez l'animal.

En 2022, un bilan de 42 cas animaux, dont 19 chez des chevaux, a été réalisé avec VETODIAG. Une étude clinique et microbiologique a été initiée et la comparaison de ces souches avec les souches humaines est en cours.

En 2022, nous avons également collaboré avec un groupe de vétérinaires pour un article de revue sur la diphtérie chez l'animal et le risque zoonotique (M.-H. Laaberki *et al.*, en cours d'évaluation).

7.2 Coopération avec les laboratoires de sécurité sanitaire des aliments ou environnementaux

Néant - cette thématique est peu pertinente concernant la diphtérie, même si la littérature ancienne suggérait une transmission de *C. diphtheriae* via le lait cru.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

En complément des techniques déjà existantes qui seront maintenues au CNR (voir annexe 2), les développements de méthodes et projets de recherche suivants seront finalisés ou poursuivis.

8.1 Développement de seuils critiques pour l'antibiorésistance

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons quelques résistances (voir partie 3), même si l'impact en santé publique de la résistance aux antibiotiques chez l'agent de la diphtérie reste mineur. Néanmoins, les seuils critiques ont jusqu'à récemment été peu ou mal définis pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans*, les deux espèces cliniquement les plus importantes du complexe *diphtheriae*.

En collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter et collègues) et le laboratoire de référence allemand en Bavière (Andreas Sing et collègues), nous avons fonc cherché à définir les seuils critiques pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* de manière robuste, sur la base de la distribution naturelle qui permet de définir des cut-offs écologiques (ECOFFs).

Ce travail a été finalisé concernant la partie expérimentale et analytique ; 400 souches ont été testées par la méthode des diamètres et de microdilution en plaques (CMI), pour les antibiotiques les plus pertinents. Une proposition de seuils critiques a été faite par le comité de l'EUCAST (juin 2022) ; suite à consultation internationale, l'EUCAST a publié ces nouveaux seuils, pour la première fois pour les agents de la diphtérie.

Une publication associée à ce travail est en cours d'élaboration (retardée par l'événement 2022 en France et Europe) et devrait être finalisée dans les 2 années qui viennent.

8.2 Développement d'un test de diagnostic rapide (détection de la toxine)

La détection du gène *tox* n'est pas toujours associée à la production de la toxine, du fait de la dégradation du gène *tox* dans certaines lignées de *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* (et chez *C. silvaticum*, dans laquelle toutes les souches ont un gène *tox* inactivé). Ces souches porteuses du gène *tox* mais ne produisant pas la toxine, dites NTTB, représentent 10 à 15% des isolats de *C. diphtheriae* circulants (Hennart *et al.* 2020 Genome Med). Elles représentent en quelque sorte des 'faux positifs' pour le système de surveillance et l'alerte car il n'y a pas de risque toxigène. Pour la surveillance et la prise en charge clinique, une optimisation serait donc de disposer d'un test rapide de production de la toxine diphtérique.

Actuellement, cette détection est réalisée en utilisant le test d'Elek, un test d'immuno-précipitation dont la lecture manuelle est partiellement subjective. Ce test dure entre 18 et 48 heures et nécessite d'une part, l'isolement des souches et d'autre part des locaux adaptés à la culture de bactéries, ce qui limite son utilisation en surveillance ou prise en charge clinique. Incidemment, nous allons prochainement tester de nouveaux anticorps antitoxine commerciaux pour la continuité de ce test (nos stocks précédents, réalisés par l'Institut Pasteur de St-Petersbourg, n'étant pas renouvelables).

L'approche de séquençage génomique pourrait être une piste pour éliminer les 'faux positifs', car les mutations du gène *tox* sont détectables dans la plupart des souches NTTB. Néanmoins, il faudra des technologies de séquençage plus rapide et fiables que celles disponibles actuellement. Les progrès en termes de vitesse, cout et fiabilité de séquence de la technologie Oxford Nanopore sont scrutés de près car cette approche a le potentiel de fournir un résultat en

quelques heures. Nous réaliserons des tests des nouvelles versions de kits de séquençage et de flow cells (membranes/pores pour évaluer ce potentiel) mais il ne sera pas validé en clinique humaine avant plusieurs années au mieux.

Très différente, l'approche d'un test de détection rapide par bandelettes d'immunochromatographie est une approche que nous avons déjà commencée à développer et que nous aimerions pouvoir approfondir dans un futur proche.

L'objectif est de développer des anticorps de camélidés (nanobodies), plus faciles à manipuler biochimiquement et moléculairement. Ce projet avait été démarré en collaboration avec la plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur, mais a été interrompu par l'épidémie de COVID19, et sera réactivé.

8.3 Évaluation d'un test existant de diagnostic rapide pour la production de la toxine

Nous chercherons également à évaluer un test d'immuno-chromatographie de la toxine, développé en Allemagne (Senova Diagnostics). Cette évaluation sera réalisée en regard de notre projet de développement d'un tel test avec des nanobodies (anticorps de lamas) décrit ci-dessus en lieu et place d'anticorps monoclonaux humains (utilisés dans le test de Senova). Cette évaluation dépendra de la résilience de cet industriel, dont l'avenir est incertain actuellement, en particulier sur le champ de la diphtérie du fait de son partenariat avec la Russie.

8.4 Évaluation du séquençage génomique WGS pour *C. ulcerans*

Étant donné que nous avons déjà développé la méthode de typage génomique pour *C. diphtheriae* (Guglielmini et al., 2021), notre priorité portera sur les développements et la validation de l'approche pour *C. ulcerans*. Pour le typage des souches, l'évaluation de la méthode cgMLST sera faite en regard des méthodes traditionnelles (congruence avec la méthode classique MLST sur 7 gènes) et en comparant des souches lors d'évènements comprenant des cas groupés (animaux et/ou humains). Par la suite, le typage génomique des souches permettra de confirmer, avec une probabilité d'erreur beaucoup plus faible, la transmission lors de cas groupés, voire de préciser la chaîne de transmission. Le CNR validera cette approche à partir des groupes d'isolats animaux autour de cas humains.

8.5 Microbiologie des biovars de *C. diphtheriae* et *C. pseudotuberculosis* et liens avec les données cliniques

Le biotypage des souches de *C. diphtheriae* date des années 1930-1950. Trois biovars principaux, Gravis, Mitis et Belfanti ont été décrits à l'époque, ainsi qu'un biovar Intermedius très rarement isolé actuellement. Des associations entre la clinique et les biovars ont été proposées (Gravis : formes graves). Nous souhaitons revisiter la définition des biovars et leurs liens avec la clinique, sur la base des souches du CNR. Les différences génomiques qui sous-tendent la différenciation biochimique entre les biovars restent mal comprises, et seront également analysées. Les biovars de *C. pseudotuberculosis* seront également inclus dans l'étude.

1 Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions spécifiques du Centre National de Référence, telles que définies dans le cahier des charges de l'appel à candidature (SPF - 20 janvier 2022) sont de contribuer à l'expertise, aux conseils, à la surveillance et aux alertes.

1.1.1 Expertise

- Développer la collection d'isolats existants ;
- Identifier et typer les isolats, en détectant le gène de la toxine diphtérique et en recherchant sa production
- Apporter un soutien aux laboratoires de biologie médicale hospitaliers ou privés (isolement, transport, analyse)
- Maintenir une expertise et des collaborations concernant les corynébactéries animales
- Poursuivre l'analyse de la résistance aux antibiotiques de tous les isolats reçus au CNR ;
- Assurer le maintien d'une compétence bactériologique concernant les bactéries du complexe *diphtheriae*

1.1.2 Conseil

- Apporter son expertise pour la prise en charge clinique des cas
- Apporter son expertise dans le domaine de la vaccination antidiphtérique

1.1.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

- Suivre la circulation des corynébactéries, porteuses du gène *tox*
- Suivre la sensibilité aux antibiotiques
- Contribuer aux études épidémiologiques
- Contribuer aux réseaux de surveillance européens

1.1.4 Alerte

- Signaler à l'agence nationale de santé publique, les détections du gène *tox* et les cas groupés liés à des souches tox-négatives, ainsi que toute autre situation inhabituelle (augmentation des cas, cas groupés, souches « mutantes »)

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées dans le tableau ci-dessous. Pas de laboratoire associé.

Tableau : Liste du personnel dévolu au CNR

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité. ---

1.3 Locaux et équipements

1.4 Collections de matériel biologique

Description : nombre de souches, caractérisation

Notre collection regroupe plus de 1400 isolats reçus entre 2000 et 2022. L'ensemble de ces isolats a été caractérisé pour le biotype, la présence du gène *tox* et son expression. De plus, la majorité des isolats a été typée par séquençage génomique, qui permet d'identifier les éventuelles mutations du gène *tox* et son contexte génomique, des gènes marqueurs d'espèce et de biovar, les gènes MLST, et les gènes de résistance aux antibiotiques.

Conditions de stockage

Les isolats sont conservés à -80°C en double, en utilisant deux congélateurs différents, chacun branché sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h avec système d'alarme. Les souches de référence sont aussi conservées au sein de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP).

Conditions de mise à disposition des collections

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de corynébactéries du complexe *diphtheriae* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues ou isolées. L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ou de recherche fondamentale ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords sont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Voir section 1 du rapport principal (Démarche Qualité).

2 Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

L'expertise du CNR comprend :

- La microbiologie des bactéries du complexe *diphtheriae* ;
- La détection et l'identification moléculaire des différentes espèces ;
- La détection de l'expression de la toxine
- La sensibilité aux antibiotiques
- Le typage génomique des souches et leur émergence épidémiologique et évolution génétique

Les techniques utilisées plus spécifiquement sont :

- **PCR multiplexée en temps réel** : Pour tout isolat envoyé ou obtenu au CNR nous recherchons en priorité la présence du gène *tox* ainsi que des variants du gène *rpoB* qui permettent d'identifier les espèces. Cette recherche de première intention se fait par PCR multiplexée en temps réel et permet un rendu de résultat en quelques heures, accompagné d'alerte des autorités sanitaires en cas de détection du gène de la toxine diphtérique. **Cette technique est accréditée à la norme ISO 15189** (voir partie 1, document principal).
- **Test d'Elek** : Nous vérifions l'expression de la toxine à l'aide du test d'Elek, qui est un test d'immuno-précipitation dans un milieu gélosé.
- **Isolement des bactéries** : Pour l'isolement des bactéries du complexe *diphtheriae* nous réalisons dans un premier temps la culture sur un milieu gélosé (TSA ou Columbia) sur lesquelles on dépose de disques de fosfomycine à 200 µg (les corynebactéries sont naturellement résistantes à la fosfomycine). Ensuite, dans un deuxième temps, les bactéries qu'ont poussé au tour des disques de fosfomycine sont cultivés sur un milieu sélectif pour les corynebactéries appartenant au complexe *diphtheriae*, le milieu de Tinsdale, fabriqué à la plateforme de préparation de milieux de l'Institut Pasteur.
- **Identification bactérienne** : Nous complétons l'identification par des **techniques de microbiologie** telles que : **coloration de Gram, galerie API Coryne, et spectrométrie de masse MALDI-TOF**. Le biovar est déterminé à partir des galeries API.
- **Sensibilité aux antibiotiques** : La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de diffusion de disques d'antibiotiques en milieu gélosé supplémenté avec du sang de cheval. Lorsqu'une résistance (ou sensibilité intermédiaire) est détectée, nous déterminons les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par Etest. Les interprétations suivent les recommandations 2023 de l'EUCAST, ou CA-SFM 2013 pour celles qui ne sont pas couvertes par EUCAST 2023 (v13).
- **Analyse génomique** : En parallèle, nous réalisons le **typage moléculaire des isolats**, comprenant la technique multilocus sequence typing à l'échelle du génome (cgMLST), l'analyse de séquence du gène *tox* et des gènes de biovar (*spuA*), et la recherche de déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Les techniques recommandées par le CNR aux autres laboratoires sont :

Pour les prélèvements de suivi (criblage autour d'un cas ou suivi du cas) :

L'isolement des corynebactéries : en utilisant un milieu gélosé (TSA ou Columbia) et de disques de fosfomycine à 200 µg. Si des bactéries poussent au tour des disques de fosfomycine nous conseillons de les analyser par coloration de Gram, galerie API Coryne, et spectrométrie de masse MALDI-TOF. La sélection de colonies en utilisant le milieu de Tinsdale n'est pas recommandée aux laboratoires car il n'est pas commercialisé et sa préparation « maison » n'est pas conseillée car la durée de vie est très courte et les réactifs sont coûteux.

Cette approche est décrite sur le site web du CNR :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-reference/cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae/realiser-prelevements-suivi>

Pour les autres techniques de caractérisation : le CNR recommande l'envoi des isolats au CNR.

3 Annexe 3 : Déclaration publique d'intérêt du responsable (Sylvain BRISSES)

Disponible sur : <https://dpi.sante.gouv.fr>