

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Brucella

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

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	7
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	7
2.4 Collections de matériel biologique	7
2.5 Activités d'expertises	9
2.6 Activités de séquençage	9
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	17
3. Activités de surveillance	18
3.1 Description du réseau de partenaires	18
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	18
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	19
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	21
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	21
4. Alertes	22
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	23
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	23
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	23
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	24
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	25
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	25
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	28
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	30

8. Programme d'activité pour les années suivantes	31
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	33
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	33
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	33
1.3 Locaux et équipements	37
1.4 Collections de matériel biologique.....	38
1.5 Démarche qualité du laboratoire	39
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	45
2.1 Liste des techniques de référence.....	45
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	46
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	48
3.1 Permanence du CNR	48
3.2 Autorisations MOT	48
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale	49
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo.....	49
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France.....	49
3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR.....	49
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR	49

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

En 2023, 37 cas de brucellose ont été déclarés à Santé publique France. Des souches appartenant au genre *Brucella* ont été définitivement identifiées au CNR pour 17 patients ; toutes se sont révélées appartenir à l'espèce *Brucella melitensis*. Pour 26 patients, le diagnostic a été basé uniquement sur les résultats de sérologie positive. Aucun cas n'a été associé à un foyer potentiel de brucellose en France métropolitaine et aucune souche de *Brucella* n'a été identifiée comme résistante aux antibiotiques.

Le CNR a analysé 97 isolats ou échantillons bactériens, dont 39 étaient positifs en culture pour *B. melitensis* (chez 16 patients) et un positif pour *Brucella* sp. par biologie moléculaire. De plus, le CNR a analysé 2645 sérums, dont 33 étaient positifs chez 32 patients. Cette augmentation considérable du nombre de sérums analysés (équivalent à notre activité entre 2017-2022) est due à l'arrêt de la commercialisation en France de la séroagglutination de Wright (voir rapport 2022) et une demande d'aide du laboratoire CERBA (du 16 mars au 30 juin 2023).

Parmi les 37 cas de brucellose, tous étaient des cas importés. Ces patients avaient séjourné dans des zones d'endémie de brucellose du bassin méditerranéen. Pour un patient, il y a eu une réactivation d'une infection de l'articulation du genou, précédemment diagnostiquée par le CNR en 2019. Un patient a été identifié comme ayant une brucellose ancienne ou chronique par sérologie, et un couple a présenté une brucellose. Enfin, un cas exceptionnel d'infection in utero a été diagnostiqué, dans des hémocultures positives à *B. melitensis* chez la mère (d'origine libanaise) et le nouveau-né. Contrairement aux ruminants, ces cas d'infection *in utero* sont rarissimes chez la femme et peu documentés, en particulier dans les pays où la brucellose a été éradiquée. Ce cas d'infection intra-utérine rappelle les risques de la brucellose pendant la grossesse.

Enfin, à la suite de l'identification d'une nouvelle espèce de *Brucella* isolée en Guyane en 2022, nous avons définitivement identifié et caractérisé l'espèce *B. amazoniensis*. Nous avons conduit une mission dans ce DROM qui a permis d'établir une collaboration avec le CH de Cayenne et l'Institut Pasteur afin d'évaluer la séroprévalence de la brucellose dans une zone où cette maladie n'avait jamais été diagnostiquée et établir les liens avec la faune sauvage, potentiel réservoir de cette maladie.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

In 2023, 37 cases of brucellosis were reported to Santé publique France. Strains belonging to the genus *Brucella* were definitively identified at the CNR for 17 patients; all were found to belong to the species *Brucella melitensis*. For 26 patients, the diagnosis was based solely on positive serology results. No cases were associated with a potential brucellosis outbreak in mainland France, and no *Brucella* strains were identified as resistant to antibiotics.

The CNR analyzed 97 bacterial isolates or samples, of which 39 tested positive in culture for *B. melitensis* (in 16 patients) and one tested positive for *Brucella* sp. by molecular biology. Additionally, the CNR analyzed 2645 serums, of which 33 were positive in 32 patients. This considerable increase in the number of serums analyzed (equivalent to our activity between 2017-2022) was due to the cessation of the commercialization of Wright seroagglutination in France (see 2022 report) and a request for assistance from the CERBA laboratory (from March 16 to June 30, 2023).

Among the 37 cases of brucellosis, all were imported cases. These patients had traveled to endemic areas of brucellosis in the Mediterranean basin. For one patient, there was a reactivation of a knee joint infection, previously diagnosed by the CNR in 2019. One patient was identified as having an old or chronic brucellosis through serology, and one couple presented with brucellosis. Finally, an exceptional case of in utero infection was diagnosed, with positive *B. melitensis* blood cultures in both the mother (of Lebanese origin) and the newborn. Unlike in ruminants, such cases of *in utero* infection are extremely rare and poorly documented, especially in countries where brucellosis has been eradicated. This case of intrauterine infection underscores the risks of brucellosis during pregnancy.

Lastly, following the identification of a new species of *Brucella* isolated in French Guiana in 2022, we definitively identified and characterized the species *B. amazoniensis*. We conducted a mission in this Overseas Department and Region (DROM) that established collaboration with the Cayenne Hospital Center and the Pasteur Institute to assess the seroprevalence of brucellosis in an area where this disease had never been diagnosed and establish links with wildlife, a potential reservoir of this disease.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme

PAS DE CHANGEMENTS (VOIR ANNEXE 1)

Mission et Organisation

PAS DE CHANGEMENTS (VOIR ANNEXE 1)

Démarche Qualité

Le CNR-LE est dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189. Le Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière est accrédité selon la norme NF15189 depuis le 1^{er} janvier 2015 (Accréditation N°8-3367).

Lors de la visite des experts-visiteurs du 24 au 29 septembre 2023, la demande de renouvellement et d'extension du périmètre d'accréditation prenant en compte les activités du CNR-Le (culture, identification, antibiogramme, sérologie, biologie moléculaire) a été validée et accréditée définitivement le 23 janvier 2024 (Attestation rev.16 Microbiologie générale (BM MG08), Bactériologie spécialisée (BM BA02)).

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

Nous avons mis en place un test utilisant la technique par Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) pour la détection de *Brucella*. La LAMP est un test très sensible et rapide, à tube unique, qui ne nécessite pas de thermocycleur, mais un simple bloc thermique. Grâce à une lecture colorimétrique, ce test peut être adapté à une utilisation sur le terrain.

En collaboration avec le LNR à Maison-Alfort, nous avons débuté le développement de protocoles de PCR HRM (High Resolution Melt) ou à courbe de fusion à haute-résolution permettant de distinguer des amplicons variant d'un minimum d'une base. Cette technique aura pour but d'identifier les espèces de *Brucella* atypiques ou récemment découvertes.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Durant l'année, nous avons mis en place un travail d'évaluation des techniques de réalisation des antibiogrammes en collaboration avec le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) afin de pouvoir publier des règles d'interprétation européennes déterminant la sensibilité de *B. melitensis* à un panel d'antibiotiques.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Du fait de l'arrêt de la technique de séroagglutination de Wright en France, nous avons conseillé et aidé plusieurs laboratoires français (publics et privés) dans le choix de leur stratégie de diagnostic de la brucellose.

2.4 Collections de matériel biologique

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

- 1- Le Laboratoire VBIC dispose d'une collection de souches :
 - des souches de référence ATCC/NCTC et des souches types (pour *B. cetii*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* et *B. papionis* récemment approuvées) et de l'ensemble des espèces et biovars de *Brucella* actuellement reconnus,
 - d'une collection de 219 souches d'origine humaine et animale isolées des principales espèces domestiques et sauvages,
 - d'une collection de souches apparentées aux *Brucella* au plan génomique (*Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, etc.) ou antigénique (*Yersinia enterocolitica* O:9).

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

L'ensemble de cette collection est conservé dans un congélateur à -80°C au sein du laboratoire NSBL3 de l'unité VBIC accréditée pour détenir des MOT (micro-organismes et toxines hautement pathogènes).

2- Le laboratoire dispose d'une collection de sérums (n=4830) et de LCR (n=35), positifs, négatifs, faussement positifs ou douteux au diagnostic de brucellose. Le CNR dispose également de 18 ADN extraits de prélèvements dont 6 ADN issus de biopsie, 3 de sang total, 2 de sérums, 1 pour chaque prélèvement suivant (liquide articulaire, LBA, moelle osseuse, plasma et cutané) et 2 dont l'origine était non précisée.

L'ensemble de cette collection est conservé transitoirement dans un congélateur à -80°C au sein de l'unité VBIC, puis transférées et conservées définitivement au sein du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes (accrédité ISO 9001 et ISO 20388 depuis le 11 février 2021 ; certification renouvelée en janvier 2024).

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

.

2.5 Activités d'expertises

▪ Activités d'expertise microbiologique

En 2023, le CNR-LE a apporté son appui aux différents laboratoires d'analyses de biologie médicale et aux laboratoires hospitaliers pour l'isolement et l'identification des *Brucella*. Il a, par ailleurs, eu en charge la caractérisation moléculaire des *Brucella*, à minima au niveau de l'espèce. Il est, à ce titre, le destinataire (*a priori* exclusif) des souches suspectées d'appartenir au genre *Brucella* par les laboratoires français. Le CNR-LE a mis en place de nouveaux outils de biologie moléculaire et des techniques sérologiques qui font actuellement référence dans le diagnostic direct ou indirect de la brucellose humaine.

Il est à noter que les résultats sont communiqués aux laboratoires demandeurs soit par messagerie sécurisée « Blue Files », soit par messagerie sécurisée « mssante ».

Méthodes d'identification directes

En 2023, 37 cas de brucellose ont été notifiés à Santé Publique France (Tableau 1).

Le CNR-LE a traité 97 isolats bactériens ou prélèvements (comprenant des flacons d'hémoculture positifs, du sang total, du sérum, diverses biopsies ou liquide de ponction, de la moelle osseuse, du lait maternelle, et du placenta) issus de 63 patients et identifié 39 **(40.2%)** positifs pour *Brucella* avec **38 souches** (Tableau 2) **et 1 PCR positive** issue d'une ponction de liquide articulaire (Tableau 3).

-Les **38 isolats** appartenant au genre *Brucella* ont été isolés chez 17 patients. L'analyse par PCR-Bruce Ladder a montré que ces isolats appartenait tous à l'espèce *B. melitensis* (Tableau 2).

Tableau 2. Cas de brucellose par identification directe à partir d'une souche en 2023.

N° CNR	Vitek MS	Bruce- LADDER	Prélèvement	Séjour pays à risque	Commentaire
BRSO-2023-415	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAGHREB	/
BRSO-2023-416	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAGHREB	/
BRSO-2023-417	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	/
BRSO-2023-418	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	/
BRSO-2023-423	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	JORDANIE	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2023-424	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	JORDANIE	Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2023-431	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-436	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru et Consommation de fromage frais au lait cru
BRSO-2023-440	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-441	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-442	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-443	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-444	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-445	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-446	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-447	Brucella sp	B. melitensis	Souche	MAROC	/
BRSO-2023-448	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-449	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-453	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-454	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-455	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-456	Brucella sp	B. melitensis	Souche	ALGERIE	Consommation de lait cru
BRSO-2023-457	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	/
BRSO-2023-458	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	MAGHREB	BRSO-2023-458/459/460; isolées chez un couple marié
BRSO-2023-459	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	MAGHREB	BRSO-2023-458/459/460; isolées chez un couple marié
BRSO-2023-460	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	MAGHREB	BRSO-2023-458/459/460; isolées chez un couple marié
BRSO-2023-470	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	ALGERIE/TURQUIE	Liquide articulaire également Positif par PCR (BRSO-2023-469)
BRSO-2023-471	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	MAGHREB	/
BRSO-2023-475	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	LIBAN	Brucellose pendant la grossesse. Mère du nouveau-né (BRSO-2023-485)
BRSO-2023-476	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	LIBAN	Brucellose pendant la grossesse. Mère du nouveau-né (BRSO-2023-485)
BRSO-2023-477	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	LIBAN	Brucellose pendant la grossesse. Mère du nouveau-né (BRSO-2023-485)
BRSO-2023-478	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	LIBAN	Brucellose pendant la grossesse. Mère du nouveau-né (BRSO-2023-485)
BRSO-2023-481	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	/
BRSO-2023-482	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	ALGERIE	/
BRSO-2023-483	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	MAGHREB	Antécédent brucellose ostéoarticulaire en 2019 (BRSO-2019-130)
BRSO-2023-484	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	MAGHREB	Antécédent brucellose ostéoarticulaire en 2019 (BRSO-2019-130)
BRSO-2023-485	Brucella sp	B. melitensis	Souche sur hémoculture	LIBAN	Nouveau-né, brucellose maternelle (BRSO-2023-475)
BRSO-2023-486	Brucella sp	B. melitensis	Hémoc	LIBAN	Nouveau-né, brucellose maternelle (BRSO-2023-475)

Tableau 3. Cas de brucellose identifiées par PCR spécifique uniquement en 2023.

N° CNR	Prélèvement	PCR IS711	Séjour pays à risque	Commentaire
BRSO-2023-469	Liquide articulaire	Présence de Brucella	ALGERIE/TURQUIE	Hémoculture positive B. melitensis (BRSO-2023-470)

La majorité des isolats a été reçue à partir de cultures bactériennes sur milieu gélosé. Ces isolats étaient suspectés d'appartenir au genre *Brucella* et étaient adressés au CNR pour confirmation. La plupart d'entre eux provenaient d'hémocultures positives (21/38). Nous avons également reçu des flacons d'hémocultures positives pour mise en culture et analyse bactériologique lorsque le laboratoire suspectait une brucellose mais n'avait pas les conditions de sécurité requises pour manipuler les cultures ou lorsqu'il avait détruit les cultures suspectes d'appartenir au genre *Brucella* pour des raisons de biosécurité. Vue la propension de *Brucella* à infecter différents organes chez l'Homme, notamment en cas d'infections subaiguës ou chroniques, nous sommes amenés à recevoir des biopsies (os, ganglion, articulation, placenta, débris utérins...) et des fluides biologiques (sang, sérum, LCR, liquides articulaires, pus...), pour la culture de ces prélèvements et la recherche de *Brucella* par des techniques moléculaires. Nous avons ainsi détecté la présence de *Brucella* à partir d'un liquide articulaire (BRSO-2023-469) ponctionné chez un patient qui avait consommé du lait de chamelle en Algérie (et avait réalisé un séjour en Turquie). Une hémoculture positive (BRSO-2023-470) a également été détectée chez ce patient permettant le diagnostic d'espèce.

En 2023, aucun cas de brucellose n'a été diagnostiqué uniquement à partir de prélèvements positifs basés sur les résultats de tests moléculaires (PCR sur l'ADN isolé des prélèvements).

Méthodes de diagnostic indirectes

En 2023, le CNR-LE a analysé 2654 sérums et LCR dont 33 (1,24%) étaient positifs pour la brucellose (Tableaux 4 à 8) et donc 2621 négatifs (98,76%). Cette augmentation considérable du nombre de sérums analysés est due à l'arrêt de la commercialisation en France du test de séroagglutination de Wright par la société bioMérieux® (voir le rapport du CNR Brucella 2022). En référence aux guides des analyses, le laboratoire CERBA ne pouvant pas rendre un résultat de sérologie *Brucella* basé exclusivement sur un seul test (Rose Bengale), il nous a demandé d'analyser leurs sérologies jusqu'à qu'une solution soit mise en place dans leur secteur (soit du 16 mars au 30 juin 2023).

Un total de 32 patients (33 sérums) ont été identifiés comme ayant une infection fortement probable par *Brucella* sur la base du tableau clinique, de l'épidémiologie et du résultat des sérologies réalisées (Tableau 4).

Tableau 4. Sérologies positives confirmant un diagnostic de brucellose humaine en France en 2023.

N° CNR	EAT	IgM	IgG	Brucellapt	Sejour Pays a Risque	Commentaire
BRU-2023-2288	1/16e	Négatif	Positif	1/2560e	Algerie	Consommation lait cru
BRU-2023-2302	1/16	Négatif	Positif	1/2560e		
BRU-2023-2303	1/16e	Négatif	Positif	1/1280e	Algerie	consomation laitages cru
BRU-2023-2538	1/8	Négatif	Positif	1/2560e		
BRU-2023-2976	e1/32	Douteux	Positif	1/5120E		
BRU-2023-3038	1/8	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-3206	1/4	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-3681	Négatif	Négatif	Positif	Négatif	Algerie	LCR
BRU-2023-3682	Négatif	Négatif	Positif	1/320	Algerie	LCR
BRU-2023-3912	1/8	Douteux	Positif	1/5120e	Algerie	B. melitensis BRSO-2023-436
BRU-2023-3955	e1/32	Négatif	Positif	1/5120e	Algerie	B. melitensis BRSO-2023-440 Spondylodiscite
BRU-2023-4131	1/32	Négatif	Positif	1/5120e		
BRU-2023-4132	1/8	Douteux	Positif	1/5120e		
BRU-2023-4133	1/16	Négatif	Positif	1/5120e		
BRU-2023-4134	1/4	Positif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4135	1/4	Négatif	Positif	1/2560e		
BRU-2023-4136	1/2	Négatif	Positif	1/640		
BRU-2023-4137	1/32	Positif	Positif	1/5120e		
BRU-2023-4138	1/2	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4200	1/16	Positif	Négatif	1/5120		
BRU-2023-4484	1/32	Négatif	Positif	1/5120e		
BRU-2023-4485	1/4	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4509	1/4	Négatif	Positif	1/2560	Algerie	
BRU-2023-4512	1/32	Positif	Positif	1/5120	Algerie	B. melitensis BRSO-2023-456
BRU2023-4562	Pur	Douteux	Positif	1/640	Algerie	Consommation lait cru
BRU-2023-4608	1/16	Positif	Négatif	1/2560		
BRU-2023-4668	1/8	Positif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4684	1/2	Négatif	Positif	1/640		Consommation lait cru
BRU-2023-4685	1/2	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4719	Négatif	Négatif	Positif	1/320		Brucellose ancien
BRU-2023-4729	1/8	Positif	Positif	1/1280		B. melitensis BRSO-2023-475
BRU-2023-4734	Négatif	Négatif	Positif	Négatif		B. melitensis BRSO-2023-486
BRU-2023-4788	1/4	Négatif	Positif	1/1280		
BRU-2023-4802	1/16	Négatif	Positif	1/2560		

Pour 5 des 32 patients, les sérologies positives ont confirmé une brucellose diagnostiquée par l'isolement d'une souche de *Brucella* concomitamment chez le patient (Tableau 5).

Tableau 5. Résultats de sérologies pour les cas de brucellose humaine avec isolement de *Brucella* par méthode directe durant l'année 2023.

N° CNR	EAT	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2023-3912	1/8	Douteux	Positif	1/5120e
BRU-2023-3955	e1/32	Négatif	Positif	1/5120e
BRU2023-4562	Pur	Douteux	Positif	1/640
BRU-2023-4729	1/8	Positif	Positif	1/1280
BRU-2023-4734	Négatif	Négatif	Positif	Négatif

Vingt-six patients avaient une brucellose suspectée uniquement par le résultat de la sérologie était par sérologie seule (Tableau 6).

Tableau 6. Cas de brucellose confirmés par sérologies uniquement durant l'année 2023.

N° CNR	EAT	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2023-2303	1/16e	Négatif	Positif	1/1280e
BRU-2023-2538	1/8	Négatif	Positif	1/2560e
BRU-2023-2976	e1/32	Douteux	Positif	1/5120E
BRU-2023-3038	1/8	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2023-3206	1/4	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2023-3681	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-3682	Négatif	Négatif	Positif	1/320
BRU-2023-4131	1/32	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2023-4132	1/8	Douteux	Positif	1/5120e
BRU-2023-4133	1/16	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2023-4134	1/4	Positif	Positif	1/1280
BRU-2023-4135	1/4	Négatif	Positif	1/2560e
BRU-2023-4136	1/2	Négatif	Positif	1/640
BRU-2023-4137	1/32	Positif	Positif	1/5120e
BRU-2023-4138	1/2	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2023-4200	1/16	Positif	Négatif	1/5120
BRU-2023-4484	1/32	Négatif	Positif	1/5120e
BRU-2023-4485	1/4	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2023-4509	1/4	Négatif	Positif	1/2560
BRU-2023-4512	1/32	Positif	Positif	1/5120
BRU-2023-4608	1/16	Positif	Négatif	1/2560
BRU-2023-4668	1/8	Positif	Positif	1/1280
BRU-2023-4684	1/2	Négatif	Positif	1/640
BRU-2023-4685	1/2	Négatif	Positif	1/1280
BRU-2023-4719	Négatif	Négatif	Positif	1/320
BRU-2023-4788	1/4	Négatif	Positif	1/1280

Pour 5 patients, les résultats des tests sérologiques n'ont pas permis d'affirmer une brucellose (cas douteux) correspondant à une même patiente a eu deux sérums à deux mois d'intervalle (BRU-2023-2289/2290) avec des résultats ne permettant pas d'affirmer une brucellose et dans les 4 autres cas, le tableau clinique était aspécifique (fièvre au long cours) avec des résultats à la limite de la positivité (Tableau 7). Aucune sérologie faussement négative a été identifiée.

Tableau 7. Résultats des sérologies douteuses pour le diagnostic de brucellose durant l'année 2023.

N° CNR	EAT	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2023-2289	1/8e	Négatif	Positif	1/1280e
BRU-2023-2290	1/2e	Négatif	Positif	1/320e
BRU-2023-3328	1/2	Négatif	Positif	1/320
BRU-2023-4531	Pur	Négatif	Positif	1/320
BRU-2023-4586	1/8	Positif	Négatif	1/2560
BRU-2023-4730	Pur	Douteux	Douteux	Négatif

Finalement, les résultats de 38 sérologies (1,43%) issues de 38 patients ont été considérées comme faussement positives du fait de réactions croisées, très fréquentes avec ces tests, et d'un tableau épidémiologique ne correspondant pas du tout avec une brucellose (Tableau 8).

Tableau 8. Résultats des sérologies correspondant à des fausses positivité durant l'année 2023.

N° CNR	EAT	IgM	IgG	Brucellacapt
BRU-2023-2284	1/2e	Négatif	Négatif	Négatif
BRU-2023-2295	Négatif	Douteux	Négatif	1/320e
BRU-2023-2306	Pur	Négatif	Négatif	Négatif
BRU-2023-2309	1/2e	Négatif	Négatif	1/1280e
BRU-2023-2311	Pur	Négatif	Négatif	1/320e
BRU-2023-2312	1/4e	Négatif	Négatif	1/320e
BRU-2023-2325	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-2329	1/2	Positif	Négatif	Négatif
BRU-2023-2967	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-2972	1/2	Négatif	Négatif	<1/320
BRU-2023-3325	Négatif	Négatif	Douteux	Négatif
BRU-2023-3504	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-3527	1/2	Douteux	Négatif	1/320
BRU-2023-3533	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-3537	1/2	Négatif	Négatif	<1/320
BRU-2023-3538	1/2	Négatif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4156	Pur	Négatif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4507	Négatif	Douteux	Négatif	Négatif
BRU-2023-4518	pur	Négatif	Douteux	1/320
BRU-2023-4529	1/2	Positif	Négatif	1/320
BRU-2023-4535	Négatif	Douteux	Négatif	Négatif
BRU-2023-4537	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-4553	Négatif	Positif	Négatif	1/320

BRU-2023-4578	Pur	Positif	Négatif	1/320
BRU-2023-4587	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4588	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4607	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
BRU-2023-4639	1/2	Douteux	Négatif	1/320
BRU-2023-4656	1/2	Négatif	Négatif	1/640
BRU-2023-4661	1/2	Douteux	Négatif	1/1280
BRU-2023-4669	Négatif	Négatif	Négatif	1/320
BRU-2023-4708	1/2	Négatif	Négatif	1/320
BRU-2023-4727	Négatif	Douteux	Négatif	1/320
BRU-2023-4728	1/2	Positif	Négatif	1/640
BRU-2023-4765	Pur	Négatif	Négatif	1/320
BRU-2023-4786	Pur	Positif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4787	Pur	Positif	Négatif	Négatif
BRU-2023-4792	1/2	Négatif	Douteux	1/320

Au total, 37 patients ont été diagnostiqués comme ayant une brucellose. Un patient avait déjà eu la brucellose en 2019, avec isolation de *B. melitensis* dans des prélèvements de liquide articulaire du genou (BRSO-2019-130). En 2023, *B. melitensis* a été identifiée dans des hémocultures (BRSO-2023-483/484) et le cas a été considéré comme une rechute. Pour un patient (BRU-2023-4719), le dossier clinique était en faveur d'une brucellose ancienne ou chronique (difficilement diagnosticable par sérologie) (Tableau 4). A noter que *B. melitensis* a été isolée dans des hémocultures d'un couple marié (BRSO-2023-458/459). Enfin, nous avons identifié un cas d'infection in utero, avec des hémocultures à *B. melitensis* isolée chez la mère et chez sa nouveau-née. La maman venait du Liban. Chez les ruminants, la brucellose est associée à l'avortement, mais ces cas sont exceptionnels chez la femme et classiquement peu documentés. Ce cas d'infection intra-utérine rappelle les risques de la brucellose pendant la grossesse. A noter encore que nous avons mis en culture et testé par PCR des prélèvements du placenta et plusieurs échantillons de lait maternel qui se sont avérés tous négatifs.

Il n'y avait aucune suspicion que les cas de brucellose résultaient d'une contamination en France. De plus, en 2023, toutes les souches isolées étaient *B. melitensis*. Or, excepté les rares cas de « spillover », tels que l'épisode du Bargy en 2011, les cas de *B. melitensis* détectés en France sont toujours importés. Tous les cas provenaient des pays du bassin méditerranéen, principalement du Maghreb et notamment d'Algérie (Figure 1). La majorité présentaient des facteurs de risque connus à la brucellose (consommation de produits à base de lait cru ou de produits locaux).

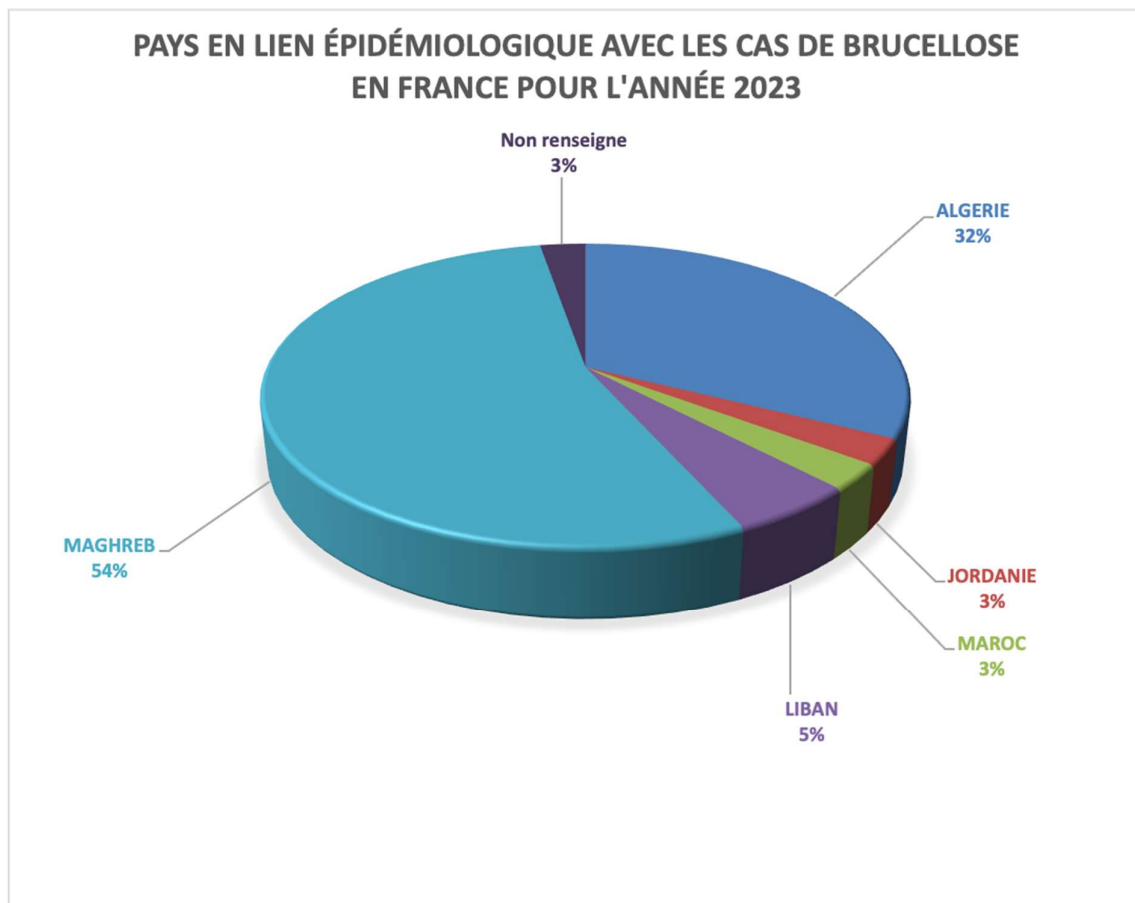


Figure 1. Pays ou région du monde en lien épidémiologique avec les cas de brucellose en France pour l'année 2023.

2.6 Activités de séquençage

Le CNR *Brucella* n'a pas d'activité de séquençage génomique en routine à proprement parlé. Les apports du séquençage sont négligeables pour le diagnostic et la prise en charge de la brucellose humaine. Nous avons cessé d'utiliser le séquençage de l'ARNr 16S comme outil de diagnostic en raison de son manque de sensibilité et de spécificité pour *Brucella*. Le nouveau décret du 26 avril 2023 fixant la liste des MOT facilite grandement le séquençage des génomes de *Brucella* (notre plateforme de séquençage ne disposant pas d'une autorisation MOT). Cela nous permettra de séquencer davantage d'isolats cliniques et de comprendre, par exemple, la base génétique des rares cas de résistance aux antibiotiques (voir 3.2)

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> * OUI	Plateforme MICRO&BIO, Service de Microbiologie et Hygiène Hospitalière, CHU de Nîmes avec un MiSeq (Illumina) et deux MinIon (Oxford Nanopore).

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

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON , est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> * OUI	Nous avons utilisé le séquençage génomique pour caractériser les deux isolats de <i>B. amazoniensis</i> identifiés en 2022 en Guyane.

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

Analyses In silico MLST et MLVA, wgMLST, WG SNP, et des analyses phylogénétiques

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

Non applicable. La brucellose n'est pas épidémique en France.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

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

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

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

Dans les bases de données fermées : Précisez

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

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

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

3. Activités de surveillance

En 2022, 37 cas de brucellose ont été recensés, tous en France métropolitaine. Tous ces cas correspondaient à des cas importés. Pour 17 patients, une souche de *Brucella* a été isolée et les analyses par PCR « Bruce Ladder » a montré que toutes ces souches appartenaient à l'espèce *B. melitensis*.

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

Aucune souche de *Brucella* résistante aux antibiotiques n'a été identifiée

3.1 Description du réseau de partenaires

A priori tous les laboratoires d'analyses médicales, publics et privés, en France disposent via le site Santé Publique France, de l'information nécessaire pour contacter le CNR afin d'envoyer les souches, les prélèvements, les sérums ou autres prélèvements et demander des conseils diagnostiques ou thérapeutiques. De plus, le site internet du CNR (www.chu-nimes.fr/cnr-brucella/cnr-brucella.html) accessible à tous et facilement identifiable sur les moteurs de recherche internet. Le nombre de souches et de sérums reçus correspond au nombre de DO validées au niveau de Santé Publique France. Nous pouvons donc considérer que le réseau de surveillance est quasi-exhaustif sur le territoire national.

Par ailleurs, nous avons établi un partenariat avec différents CHU (APHP, CHU Tours, CHU Bordeaux) pour la réalisation des analyses sérologiques des brucelloses. Ce type de partenariat va s'étendre à d'autres structures. De plus, une collaboration avec le laboratoire CERBA a été mise en place depuis fin 2022 et une avec le laboratoire BIOMNIS EUROFINIS (à Lyon) a été établie en 2023. Ces collaborations nous permettent de recevoir l'ensemble des sérums douteux ou positifs identifiés en France. L'objectif est d'obtenir une exhaustivité sur les déclarations de brucellose en France et de pouvoir vérifier le diagnostic posé (surtout sérologique). Enfin, une collaboration avec l'Outre-Mer (CH de Cayenne en Guyane) été signée en 2022 pour évaluer l'importance de la brucellose dans ce département-région d'outre-mer dont nous venons d'identifier les premiers cas de brucellose avec notamment une nouvelle espèce, *B. amazoniensis* (voir Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR).

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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

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

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

En 2023, notre CNR a intégré l'EUCAST Network laboratories (<https://www.eucast.org/organization/network-laboratories>). Ce réseau de laboratoires permet à l'EUCAST de disposer de laboratoires de microbiologie ayant une expertise particulière et une formation spécifique dans les tests de sensibilité aux antimicrobiens. Les laboratoires du réseau de l'EUCAST s'engagent à contribuer au développement, à la validation et à la résolution des problèmes des méthodes de test de sensibilité de l'EUCAST et/ou à aider à former et éduquer d'autres laboratoires aux méthodes de l'EUCAST.

Dans ce cadre, nous avons participé à la mise en place des distributions des CMI de différents antibiotiques pour *B. melitensis* (https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecie%5D=595&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50).

Ainsi, nous avons défini :

- CMI pour la ceftriaxone : 2 mg/L ;
- CMI pour la ciprofloxacine : 1 mg/L ;
- CMI pour la doxycycline : 0.25 mg/L ;
- CMI pour la gentamicine : 0.5 mg/L ;
- CMI pour la lévofloxacine : 1 mg/L ;
- CMI pour la rifampicine : 2 mg/L ;
- CMI pour la streptomycine : 1 mg/L ;
- CMI pour la tétracycline : 0.5 mg/L ;
- CMI pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SXT) : 0.125 mg/L.

Nous avons réalisé une surveillance de la résistance de 69 souches *B. melitensis* à ces antibiotiques isolées de 2018 à 2023 par notre CNR. Les résultats sont les suivants (**Tableau 9**):

Tableau 9. Distribution des CMI de différents antibiotiques vis à vis de 69 souches cliniques de *B. melitensis* isolées en France.

Antibiotique	Nombre de souches avec une CMI (mg/L) à :									
	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	≥8
Ceftriaxone	0	0	0	2	13	49	4	1	0	0
Ciprofloxacine	0	0	0	0	2	67	0	0	0	0
Gentamicine	0	0	0	0	1	65	3	0	0	0
Levofloxacine	0	0	0	0	1	62	6	0	0	0
Rifampicine	0	0	0	0	0	4	15	50	0	0
Tétracycline	0	5	15	39	10	0	0	0	0	0
TMP-SXT	3	43	22	1	0	0	0	0	0	0
Doxycycline	0	5	10	41	13	0	0	0	0	0

Trois souches étaient résistantes à la gentamicine. Cette résistance déjà identifiée chez *B. melitensis* n'est pas due à l'acquisition de plasmides porteurs d'acétylases. Elle est liée à des mécanismes d'efflux propres à la bactérie. Aucune autre résistance n'a été mise en évidence. Une étude complète sur l'ensemble des souches cliniques du CNR a été réalisée en 2024.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

Comme indiqué ci-dessus, nous offrons un soutien aux laboratoires d'analyses médicales, de diagnostic publics et privés en France et des laboratoires de recherche pour le diagnostic de la brucellose et aux cliniciens pour la prise en charge de leurs patients.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Brucellose en Guyane française : investigations sur une situation épidémiologique émergente dans la zone tropicale américaine

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

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

Sur la même période, une équipe de chercheurs Costa-Ricains a par ailleurs découvert une autre espèce de *Brucella* (appelée *B. nosferati*) chez des chauves-souris vampire au Sud du pays [3]. La détection de bactéries dans les glandes salivaires de ces animaux représente un risque élevé de transmission à ses proies (dont l'Homme). La comparaison des séquences génomiques de *B. amazoniensis* et de *B. nosferati* a révélé que les deux espèces sont génétiquement très proches mais distinctes, ce qui suppose l'existence d'un ou des hôte(s) intermédiaire(s).

En 2023, deux missions ont été menées : une à Cayenne pour déterminer la séroprévalence de la brucellose dans ce DROM où aucun cas de brucellose n'avait été diagnostiqué ; une au Costa Rica pour établir une collaborations avec les biologistes en charge de la brucellose.

4. Alertes

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

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

Plusieurs situations peuvent être considérées comme anormales et doivent être signalées sans délai à Santé Publique France et à la DGS :

- Un phénomène épidémique : les cas de brucellose en France sont habituellement sporadiques, en lien épidémiologique avec un pays d'endémie (100% des cas en 2023).
- La survenue de cas de brucellose en territoire français, chez un patient n'ayant pas voyagé au cours des mois précédents. La France étant considérée comme un pays indemne de brucellose bovine, ovine et caprine depuis 2015, la confirmation d'un cas autochtone impliquerait une action sanitaire vétérinaire immédiate.
- La survenue de cas groupés de pneumonies à *Brucella* spp. pourrait évoquer une action malveillante.

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

En 2023, nous avons rapporté dans la littérature des cas de brucellose chez des orpailleurs clandestins en Guyane. L'analyse des souches a montré qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce de *Brucella*. Nous continuons notre enquête avec les autorités sanitaires et vétérinaires locales pour déterminer l'incidence de la brucellose humaine dans le département et identifier les éventuels réservoirs animaux.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le CNR-LE a une activité importante de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant la prévention, le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Environ 250 appels téléphoniques sont reçus par an. La prise en charge des personnels de laboratoire exposée à une brucellose est devenue la principale source d'appel téléphonique. Les numéros de portable du Pr Lavigne et du Dr O'Callaghan sont à la disposition de tous les centres permettant une prise en charge la plus efficace et précoce possible.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2023, à la demande du CA-SFM, notre CNR a participé à la détermination des seuils de CMI critiques pour les différents antibiotiques utilisables pour traiter une infection à *B. melitensis* en lien avec l'EUCAST.

Pour cela, notre laboratoire a été intégré parmi les laboratoires de l'EUCAST Network et a déterminé les sensibilités/résistances d'un panel d'antibiotiques sur notre collection de souches cliniques de *B. melitensis*.

Ces données nous ont permis de :

-confirmer les méthodes de réalisation des antibiogrammes :

Détermination des CMI : Milieu (bouillon Muller Hinton ou Mueller-Hinton + 5% de sang de cheval défibriné et 20 mg/L de beta-NAD (MH-F) ; Inoculum : 5×10^5 UFC/ML ; Techniques : bandelettes E-tests ou microdilution en bouillon ; Incubation : $35 \pm 1^\circ\text{C}$ sous O₂ pendant 48h ; Lecture : Lire les CMI à la concentration la plus basse de l'agent qui inhibe complètement la croissance visible.

Détermination des diamètres d'inhibition : Milieu (Agar Mueller-Hinton + 5% de sang de cheval défibriné et 20 mg/L de beta-NAD (MH-F) ; Inoculation : McFarland 0,5 ; Techniques : Méthode de diffusion sur disque standardisée ; Incubation : $35 \pm 1^\circ\text{C}$ sous 5% de CO₂ pendant 48h ; Lecture : lire les bords des zones comme le point ne montrant aucune croissance vu de l'avant avec le couvercle retiré et avec une lumière réfléchie.

-proposer les breakpoints suivants (Tableau 10) :

Tableau 10. Breakpoints proposés pour différents antibiotiques vis à vis de *B. melitensis*.

Antimicrobial agent	ECOFF	Proposed breakpoints	
		S ≤	R >
Doxycycline	0.25	0.25	0.25
Tetracycline	0.5	0.5	0.5
Rifampicin	2	2	2
Gentamicin	0.5	0.5	0.5
Streptomycin	1	1	1
Ciprofloxacin	1	1	1
Levofloxacin	1	1	1
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	0.125	0.125	0.125
Ceftriaxone	2*	2*	2*

*L'EUCAST a suivi notre recommandation alors que précédemment une CMI à 1 mg/L avait été proposée.

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

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

Une information sur France Info a été récemment réalisée sur la découverte de *B. amazoniensis* en Guyane. Un article récapitulatif est disponible sur les liens :

<https://la1ere.francetvinfo.fr/guyane/une-nouvelle-bacterie-decouverte-en-guyane-annonce-la-lettre-recherche-du-centre-hospitalier-de-cayenne-1380546.html> et <https://www.ghguyane.fr/chc/article/11>

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

La brucellose en Guyane

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

1) Santé humaine :

Pour faire un état des lieux de la brucellose humaine en Guyane française, nous avons commencé par évaluer sa séroprévalence chez les habitants de Guyane française. Cette approche a été réalisée de façon transversale et rétrospective sur plusieurs collections de sérums déjà collectées chez différentes populations :

- pour le projet BRUCeORP : chez des orpailleurs du plateau Amazonien, dans le cadre de deux études (ORPAL-2 et ORPAL-3) promues par le Centre Hospitalier de Cayenne et dont le recueil d'échantillons est terminé depuis 2019 et 2022, respectivement ;
- pour le projet BRUCeGUY : chez des volontaires de la population générale (sur tout le territoire de Guyane) dans le cadre de l'étude EpiCovid, promue par l'Institut Pasteur de la Guyane et dont le recueil d'échantillons est terminé depuis 2021.

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

Ces études, dont les résultats sont encore en cours d'analyse, ont démontré la présence de la brucellose en Guyane française, avec une prévalence bien supérieure chez les orpailleurs que dans la population générale. Elles ont également circonscrit des régions où la prévalence est nettement supérieure, ce qui pourrait mettre en évidence une zone où la transmission zoonotique pourrait avoir plus de risque de se produire.

2) Réservoir animal :

L'identification du réservoir animal de *B. amazoniensis* est essentielle. Notre hypothèse de travail est que ce réservoir est présent au sein de la faune sauvage des forêts tropicales d'Amérique latine (néotropiques). La découverte de *B. nosferati* (génétiquement proche de *B. amazoniensis*) chez des chauves-souris vampires au Costa Rica incite à considérer ces chiroptères comme

potentiel transmetteur en Guyane française. La transmission à l'Homme pourrait être soit directe, soit par un hôte intermédiaire qui pourrait être un mammifère que les orpailleurs clandestins déclarent chasser.

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

Une première partie de ce travail a été réalisée par deux membres du CNR qui se sont rendus à l'Institut Pasteur Guyane en Octobre 2023. Ils y ont notamment analysé 250 sérums de chauve-souris vampire de Guyane française. Cette étude a permis d'identifier un animal séropositif et une forte proportion d'animaux présentant des signes cliniques évocateurs de la brucellose. Un second séjour à Cayenne est prévu en 2024 pour poursuivre ces travaux.

Sérologies

Du fait de l'abandon de la commercialisation de la séroagglutination de Wright et des limites des tests sérologiques traditionnels (faible spécificité et taux élevés de faux positifs), nous avons cherché à optimiser la précision diagnostique en réévaluant les tests sérologiques et en explorant de nouveaux algorithmes de diagnostic. Une étude observationnelle rétrospective a été menée en utilisant des sérums collectés entre juin 2012 et juin 2023 au Centre National de Référence Français des *Brucella*. Différents algorithmes de diagnostic ont été évalués, combinant le test au Rose Bengale (RBT) avec la séroagglutination de Wright (SAT), la technique Brucellacapt® et des dosages des IgM et IgG par ELISA, pour améliorer les performances des tests diagnostiques. Parmi les 3587 sérums analysés, 148 étaient des cas confirmés de brucellose humaine. La combinaison du RBT avec la SAT ou le test Brucellacapt® a significativement amélioré les performances diagnostiques, avec une réduction des faux positifs. Les résultats les plus prometteurs ont été observés lorsqu'un algorithme a été construit combinant le RBT, Brucellacapt® et les dosages des IgM et IgG (pour une valeur du score de 0,5 : 90,5 % de sensibilité, 99,7 % de spécificité, 92,4 % de VPP et 99,6 % de VPN).

Survie de *Brucella* dans les produits laitiers

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

Nouveau traitement pour la brucellose

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

Étude de la virulence de *Brucella*

Nous avons continué nos études sur la virulence de *Brucella* au sein de l'unité VBIC (INSERM U1047). *Brucella* est un pathogène intracellulaire facultatif, qui survit et se multiplie dans certaines cellules de l'hôte (cellules immunitaires, épithéliales ou placentaires). Notre équipe travaille sur les facteurs bactériens et cellulaires impliqués dans cette survie intracellulaire.

Systèmes de Sécrétion. Du côté des facteurs de virulence bactériens, nous nous intéressons à plusieurs protéines appelées « effecteurs », qui sont transloquées par *Brucella* dans la cellule infectée via son système de sécrétion de type IV, VirB. Nous étudions également d'autres mécanismes de sécrétion présents chez *Brucella*, comme le système Tat (Twin Arginine Translocator) (Riquelme et al 2023).

La génomique pour étudier l'évolution, l'épidémiologie et la résistance aux antibiotiques.

En collaboration avec un consortium de partenaires internationaux (États-Unis, Brésil, Royaume-Uni,...), nous avons utilisé les données des séquences génomiques pour étudier les origines historiques des souches de *B. abortus* isolées dans le monde entier et montrer comment le commerce des animaux a influencé leur distribution au cours des 600 dernières années (Janke et al., 2023). Nous avons également étudié la base génétique de rares cas de faible résistance aux antibiotiques trouvés chez *B. abortus* au Brésil. Dans ce cas, aucun indice génétique n'a été trouvé (Pereira et al., 2023). Ces résultats seront importants à prendre en compte lors de l'interprétation des données issues des antibiogrammes réalisés sur les isolats de *B. melitensis* potentiellement résistants aux antibiotiques (voir 3.2).

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

Publications Internationales

- Janke NR, Williamson CHD, Drees KP, Suárez-Esquivel M, Allen AR, Ladner JT, Quance CR, Robbe-Austerman S, O'Callaghan D, Whatmore AM, Foster JT. (2023) Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front Microbiol.* 14:1287046.
- Moreno E, Middlebrook EA, Altamirano-Silva P, Al Dahouk S, Araj GF, Arce-Gorvel V, Arenas-Gamboa Á, Ariza J, Barquero-Calvo E, Battelli G, Bertu WJ, Blasco JM, Bosilkovski M, Cadmus S, Caswell CC, Celli J, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Comerci DJ, Conde-Álvarez R, Cook E, Cravero S, Dadar M, De Boelle X, De Massis F, Díaz R, Escobar GI, Fernández-Lago L, Ficht TA, Foster JT, Garin-Bastuji B, Godfroid J, Gorvel JP, Güler L, Erdenliğ-Gürbilek S, Gusi AM, Guzmán-Verri C, Hai J, Hernández-Mora G, Iriarte M, Jacob NR, Keriel A, Khames M, Köhler S, Letesson JJ, Loperena-Barber M, López-Goñi I, McGiven J, Melzer F, Mora-Cartin R, Moran-Gilad J, Muñoz PM, Neubauer H, O'Callaghan D, Ocholi R, Oñate Á, Pandey P, Pappas G, Pembroke JT, Roop M, Ruiz-Villalón N, Ryan MP, Salcedo SP, Salvador-Bescós M, Sangari FJ, de Lima Santos R, Seimenis A, Splitter G, Suárez-Esquivel M, Tabbaa D, Trangoni MD, Tsois RM, Vizcaíno N, Wareth G, Welburn SC, Whatmore A, Zúñiga-Ripa A, Moriyón I. (2023) If You're Not Confused, You're Not Paying Attention: *Ochrobactrum* Is Not *Brucella*. *J Clin Microbiol.* 61(8):e0043823.
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, Foster JT, Oliveira IRC, Bueno Filho JSS, Lage AP, Azevedo VAC, Dorneles EMS. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. (2023) *J Microbiol Methods.* 211:106772.
- Pereira CR, Kato RB, Araújo FA, da Silva AL, dos Santos RG, de Jesus Sousa T, Neia RC, da Silva SB, Williamson CHD, Gillece J, Lage AP, O'Callaghan D, Pickard DJ, Ramos RTJ, de Carvalho Azevedo VA, Foster JT, Dorneles EMS (2023). Genomic investigation of antimicrobial resistance in *Brucella abortus* strains isolated from cattle in Brazil. *Gene Reports* 31, 101777
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, Foster JT, Oliveira ICR, Filho JSSB, Lage AP, Azevedo VAC, Dorneles EMS. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Microbiol Method*, 2023 211:106772.
- Melzani A, Boutrou M, Sainte-Rose V, About F, Douine M, Michaud C, Nacher M, Gaillet M, Blanchet D, Lavigne JP, Demar M, O'Callaghan D, Djossou F, Keriel A, Epelboin L. Case Report: Acute Brucellosis Due to *Brucella suis* in a Brazilian Gold Miner Diagnosed in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2023 109(1):32-34
- About F, Pastre T, Boutrou M, Martinez AY, Melzani A, Peugny S, Michaud C, Zouaoui S, Carage T, Rose VS, Demar M, Lavigne JP, Djossou F, O'Callaghan D, Epelboin L, Keriel A. Novel Species of *Brucella* Causing Human Brucellosis, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2023 Feb;29(2):333-340
- Riquelme E, Omarova S, Ize B, O'Callaghan D. Analysis of the *Brucella suis* Twin Arginine Translocation System and Its Substrates Shows That It Is Essential for Viability. *Infect Immun.* 2023; 91(1):e0045922

Communications Nationales

- Octobre 2023: Brucellosis due to *B. amazoniensis* : “One Health” investigations on a new epidemiological situation in South and Central America (ANSES, Maisons-Alfort) Invitation à l’Annual Workshop of the EU National Reference Laboratories for Brucellosis – A. Keriél
- Octobre 2023: Atypical *Brucella* isolates: new challenges for identification and diagnosis (ANSES, Maisons-Alfort) Invitation à l’Annual Workshop of the EU National Reference Laboratories for Brucellosis – A. Keriél
- Février 2024: Brucellosis caused by novel species of *Brucella* : One Health investigations on a new epidemiological situation in Latin American tropical forests (CIRAD, Montpellier) Invitation du CIRAD – A. Keriél
- Mars 2024: Nouvelles espèces de *Brucella* dans les néo tropiques - Etape 1 : état de lieux de la brucellose en Guyane française (CHU de Nîmes) Point d’étape devant le bureau de la Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation – A. Keriél

Communications Internationales

- Janvier 2023 Role of secretion systems in *Brucella* virulence. Khazar University, Azerbaijan
S Omarova

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

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

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

Cette collaboration avec le LNR, qui est également Laboratoire Européen de référence de la brucellose animale, contribue ainsi à la surveillance et au contrôle de la brucellose humaine et animale. Tous les cas de brucellose humaine avec un lien possible avec des animaux en France sont ainsi déclarés au LNR.

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

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

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

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

8. Programme d'activité pour les années suivantes

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

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

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

Nous mettons en place un test utilisant la technique de la Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) pour la détection de *Brucella*. Cette technique est très sensible et rapide, sur un tube unique, et ne nécessitant pas de thermocycleur mais un simple bloc thermique. Ceci, ainsi qu'une lecture colorimétrique, signifie qu'il peut être adapté à une utilisation sur le terrain. Nous pensons que ce test sera très utile dans nos recherches sur la brucellose dans la forêt amazonienne.

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

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

La sérothèque du CNR-LE est conservée au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nîmes. La mise à disposition des sérums à des fins de recherche scientifique, notamment pour l'amélioration des outils de diagnostic ou pour la mise en place d'une nouvelle technique sérologique dans un laboratoire de bactériologie français est possible sur les bases de collaborations et en fonction de l'intérêt scientifique du projet.

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

- En collaboration avec le LNR, nous allons développer des protocoles de PCR HRM (High Resolution Melt) ou à courbe de fusion à haute-résolution permettant de distinguer des amplicons variant d'un minimum d'une base. Cette technique aura pour but d'identifier les espèces de *Brucella* atypiques et récemment découvertes.

-Notre projet d'évaluer le test Fluorescence Polarisation Assay (FPA) commercialisé par EllieLab (Germantown, WI, USA) et de valider un nouvel outil OPS iELISA est toujours mis en attente en raison de l'indisponibilité des techniciens de EllieLab.

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

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

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

-Evaluation de la sensibilité des souches de *Brucella* sp. Isolées en France depuis 2012. En application des nouveaux seuils d'interprétation des CMI d'un panel d'antibiotiques vis à vis de *B. melitensis*, nous allons déterminer les sensibilités résistances sur près de 150 souches cliniques de plusieurs espèces de *Brucella* afin de faire un état des lieux précis de l'antibiorésistance dans notre pays.

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

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

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

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

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

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

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

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

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

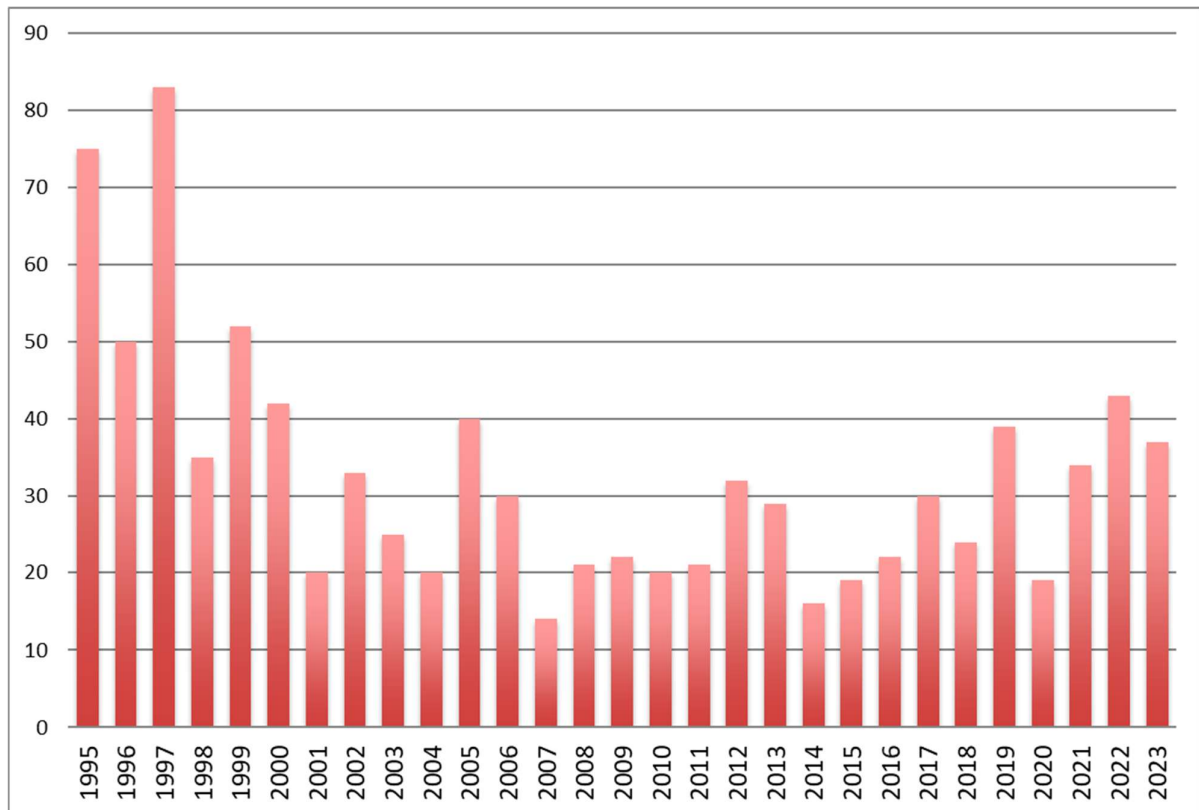


Figure 2. Nombre de cas de brucellose diagnostiqués en France annuellement (1995-2023)

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

Brucella est un pathogène de classe III, considéré comme un agent potentiel du bioterrorisme. En France, trois espèces de *Brucella* zoonotiques (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) sont classées comme des MOTs (micro-organismes et toxines hautement pathogènes). Seuls les laboratoires autorisés par l'ANSM peuvent donc détenir et manipuler ces bactéries. Leur transport est strictement réglementé.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

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

-les emplois affectés au CNR comprennent :

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Locaux et équipements

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

-Nous disposons actuellement des équipements suivants :

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

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

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

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

ii) A l'unité VBIC-U1047 : sont disponibles :

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

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

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

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

1.4 Collections de matériel biologique

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

1.5 Démarche qualité du laboratoire

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

Le CNR-LE est dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189.

Lors de la visite des experts-visiteurs du 24 au 29 septembre 2023, la demande de renouvellement et d'extension du périmètre d'accréditation prenant en compte les activités du CNR-Le (culture, identification, antibiogramme, sérologie, biologie moléculaire) a été validée et accréditée définitivement le 23 janvier 2024 (Attestation rev.16 Microbiologie générale (BM MG08), Bactériologie spécialisée (BM BA02)).

Figure 3. Documents relatifs à l'accréditation du Service de Microbiologie du CHU de Nîmes et du CNR.



Section Santé Humaine

Convention N° 5364

**ATTESTATION D'ACCREDITATION
ACCREDITATION CERTIFICATE**

N° 8-3367 rév. 16

Le Comité Français d'Accréditation (Cofrac) atteste que :
The French Committee for Accreditation (Cofrac) certifies that :

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NIMES

Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes

Place du Professeur Robert Debré

30029 NIMES Cedex 9

SIREN N° 263000036

Satisfait aux exigences de la norme **NF EN ISO 15189 : 2012** et **NF EN ISO 22870 : 2017**

Fulfils the requirements of the standard

et aux règles d'application du Cofrac pour les activités d'examens/analyses en :

and Cofrac rules of application for the activities of examination/analysis in :

**BIOLOGIE MEDICALE / BIOCHIMIE - HEMATOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE -
GENETIQUE - BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION**

CLINICAL BIOLOGY / BIOCHEMISTRY - HEMATOLOGY - IMMUNOLOGY - MICROBIOLOGY - GENETICS -

REPRODUCTIVE BIOLOGY

BIOLOGIE MEDICOLEGALE

FORENSIC BIOLOGY

réalisées par / *performed by :*

LBM DU CHU DE NIMES - Pôle Biologies Pathologie

et précisément décrites dans l'annexe technique suivante.

and precisely described in the following technical annexes.

L'accréditation suivant la norme internationale homologuée NF EN ISO 15189 est la preuve de la compétence technique du laboratoire dans un domaine d'activités clairement défini et du bon fonctionnement dans ce laboratoire d'un système de management adapté (cf. communiqué conjoint ISO/ILAC/IAF en vigueur disponible sur le site internet du Cofrac www.cofrac.fr)

Accreditation in accordance with the recognised international standard ISO 15189 demonstrates technical competence of the laboratory for a defined scope and the proper operation in this laboratory of an appropriate management system (see current joint ISO-ILAC-IAF Communiqué available on Cofrac website www.cofrac.fr).

Le Cofrac est signataire de l'accord multilatéral d'EA pour l'accréditation pour les activités objets de la présente attestation.

Cofrac is signatory of the European co-operation for Accreditation (EA) Multilateral Agreement for accreditation for the activities covered by this certificate.

Date de prise d'effet / *granting date :* **10/01/2024**

Date de fin de validité / *expiry date :* **31/12/2028**

Pour le Directeur Général et par délégation

On behalf of the General Director

Le Responsable de l'Unité d'accréditation Ouest

Unit manager - Accreditation Unit West,

David BAILLOUX

BIOLOGIE MEDICALE / MICROBIOLOGIE / MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE					
Code	Nature de l'échantillon biologique/de la région anatomique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques,...)
BM MG01	Liquides biologiques d'origine humaine	Recherche, identification et/ou détermination de la concentration d'anticorps et/ou d'antigènes spécifiques vis-à-vis d'agents infectieux Avidité des anticorps Type d'agents : bactéries, virus, parasites, champignons filamenteux, levures	- Immuno-enzymatique (ELISA et dérivées) - Immunoblotting - Immunofluorescence - Immunoprécipitation - Néphélométrie - Agglutination - Fixation du complément - Immuno-Electrophorèse - Immunochromatographie	Méthodes reconnues (A)	#
BM MG03	Échantillons biologiques d'origine humaine	Recherche et identification d'anticorps et/ou d'antigènes spécifiques et/ou de toxines et/ou d'enzymes et/ou d'agents infectieux Type d'agents : bactéries, virus, parasites, champignons filamenteux, levures	Tests unitaires simples	Méthodes reconnues (A)	Bandelettes, supports solides, lecteurs automatisés #
BM MG05	Echantillons biologiques d'origine humaine Autres échantillons (liés à un dispositif intravasculaire, liquide de dialyse, ...) Culture microbienne Acides nucléiques	Recherche et identification et/ou détermination de la concentration (quantification) d'acides nucléiques d'agents infectieux, détection de gènes de résistance et/ou de toxines Type d'agents : bactéries, virus, parasites, champignons filamenteux, levures	- Extraction, Détection d'acides nucléiques (PCR, ...) - FISH et dérivés	Méthodes reconnues (A)	Ex : Approche syndromique #

BIOLOGIE MEDICALE / MICROBIOLOGIE / MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE					
Code	Nature de l'échantillon biologique/de la région anatomique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques,...)
BM MG12	Echantillons biologiques d'origine humaine Autres échantillons (liés à un dispositif intravasculaire, liquide de dialyse, ...) Culture bactérienne/fongique	Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques/antifongiques Dosage microbiologique d'antibiotiques/antifongiques Détection des mécanismes de résistance	-Détermination phénotypique : Méthode de diffusion en gradient de concentration en milieu gélosé Inhibition de croissance en présence d'une certaine concentration d'antibiotiques/antifongiques, après incubation -Inhibition de croissance en milieu liquide en présence d'une certaine concentration d'antibiotiques/antifongiques -Détection des mécanismes de résistance (agglutination, colorimétrie, immunochromatographie, spectrométrie de masse ...) -Détection par FISH et dérivés	Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B)	#
BM MG13	Échantillons biologiques d'origine humaine Autres échantillons (liés à un dispositif intravasculaire, liquide de dialyse, ...) Culture parasitaire	Diagnostic biologique du paludisme (Recherche, identification et numération)	- Examen morphologique microscopique direct ou automatisé après fixation, coloration, concentration, culture, marquage, ... (Frottis, Goutte épaisse/QBC) - Détermination phénotypique : Immunochromatographie - Méthode génotypique : Extraction, Détection d'acides nucléiques après amplification (PCR, LAMP, hybridation, ...)	Méthodes reconnues (A)	#

BIOLOGIE MEDICALE / MICROBIOLOGIE / BACTÉRIOLOGIE SPÉCIALISÉE					
Code	Nature de l'échantillon biologique/de la région anatomique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques,...)
BM BA02	Echantillons biologiques d'origine humaine Autres échantillons (liés à un dispositif intravasculaire, liquide de dialyse, ...) Culture bactérienne Acides nucléiques	Recherche et identification et/ou détermination de la concentration (quantification) d'acides nucléiques bactériens (gènes de résistance, gènes de toxines, ...)	- Extraction, Détection d'acides nucléiques (PCR, ...) - FISH et dérivés - Cartographie d'acides nucléiques (séquençage, amplification, hybridation, ...)	Méthodes reconnues (A)	#

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

▪ Démarche qualité selon la norme ISO15189

La Démarche qualité a consisté en :

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

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

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

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

-la mise à jour du **processus post-analytique** avec notamment la diffusion des résultats via l'application « BlueFiles » ou les adresses « mssante » afin de préserver la confidentialité des patients lors de cet envoi au clinicien/laboratoire prescripteur par un courrier électronique sécurisé. Le CNR a également une activité de conseil auprès des biologistes et cliniciens concernant le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine. Les communications sont réalisées par e-mail sur l'adresse générique ou les adresses professionnelles des médecins du CNR ou par téléphone. L'activité téléphonique représente entre 2 et 10 appels hebdomadaires gérés principalement par le Pr. LAVIGNE et le Dr O'Callaghan. Ces activités sont tracées pour permettre une exhaustivité de l'activité du CNR-LE. Enfin, le CNR-LE informe Santé Publique France de tout nouveau cas diagnostiqué.

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

-la **traçabilité des résultats**. L'utilisation de cahiers de laboratoire numérotés et contresignés est de rigueur au sein de l'unité VBIC. Ils permettent la traçabilité des études entreprises et le maintien dans l'équipe des compétences et du savoir-faire acquis. Au sein du CHU, l'ensemble des demandes a intégré le logiciel métier du laboratoire (GLIMS) en fin d'année 2023 à l'occasion d'un changement de version (V.10) permettant une traçabilité complète et un respect total de la confidentialité des données (Figure 5). La mise en place de cette nouvelle version de Glims sur l'ensemble de l'activité du CNR Brucella a été réalisée en 2024.

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

Dossier 2402081022 - LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE - 3202-3203 - TEST MICROBIOLOGIEZZZZZ (NOM USUEL ZZZZZZZZZZZZ), MICROBIOLOGIE ZZZZZZZZ (F), 30-

Action de microbiologie Outils

Écran microbiologie Ajouter plaque Négatif Positif Lecture Relecture Relecture Microscopie Confirmer provisoirement F7 Validé provisoirement Confirmer Fin de dossier F8 Validé Enregistrer consultation Consultation Imprimer étiquettes plaque Imprimer Dossier Résultats Visual compte-rendu Échantillons Associé Lien vers H

TEST MICROBIOLOGIEZZZZZ
MICROBIOLOGIE ZZZZZZZZ NOM LEGAL ZZZZZZZZZZ
Né(e) le 30/03/70 soit 53 a (F)
Pathologie : Porteur de BMR(17m),
Dossier de FNC(15m), Dossier de FNV

Echantillon N° 240208102201 (Sur 2 Ech)
Divers Sang (Hémoculture)
Prélevé le 08/02/2024 à 11:37-Reçu le 08/02/2024 à 11:39
Révisé le 08/02/2024 à 11:39

Analyseur: XN1701 Non
état: Relecture Révision: 10/02/2024

Plaques			Isolements										T. B. melitensis - Antibiogramme					
Mâieu	Date	Ens. Incub.	Comment.	PI	Organisme	Eval.	Rp	Cl	Ab	Séq	Comm. In	Comm. Ex	Antibiotique	C	1	3	6	
A	CNRB_BRU_CI_08/02/11:41		?	1	BRUCEL		X	V	X	1	?	?	CNRB_CRO		?	?	?	
B	CNRB_CHOC_08/02/11:41		négative	3	BRU LABO		V	X	5	?	?	?	CNRB_CIP		?	?	?	
C	CNRB_TSA_CC_08/02/11:41		colonies grises	4	IDIBN		V	6	?	?	?	?	CNRB_LEV		?	?	?	
D	CNRB_TSS_CC_08/02/11:41		?	5	IDENCOURS		V	7	?	?	?	?	CNRB_GEN		?	?	?	
E	Etiquette_supp_01/03/11:39		?	6	BRUCELLA		X	V	X	8	?	?	CNRB_SMN		?	?	?	

Plaques Tests	Résultats de l'échantillon	Isolement Tests											
Plaques	Test	Date	Valeur	Analyse	N	Eta	C	Valeur	Its	Test	Eta	Date	Valeur
A	CNRB_BRU_Lecture_J2	08/02/24	Négative	CNR Bru Recherche	Alt	?			1	Identification	Val	09/02	Spectro_masse
A	CNRB_BRU_Lecture_J3	09/02/24	POS	CNR Bru ReDemandeur	Val	issu1234			1	Bruc-Ladder CNR	Val	09/02	OUJ
C	CNRB_TSA_Lecture_J2	08/02/24	Colonies à repiquer	CNR Bru Date prelev	Val	01/02/2024			4	Identification	Val	09/02	Spectro_masse
				Ensemencement manuel	X	?			4	Antibiogramme	Alt	09/02	?
									5	Aspect colonies	Alt	09/02	?
									5	Identification	Val	09/02	Spectro_masse
									5	Antibiogramme	Alt	09/02	?

qualifier

Figure 5. Exemple de feuille de travail sur le logiciel Glims V10 pour la traçabilité des prélèvements reçus au CNR *Brucella*.

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

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

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

-Diagnostic indirect : sérologie bactérienne

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

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

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

-Diagnostic direct : Technique de bactériologie classique

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

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

-Diagnostic direct : Techniques moléculaires

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

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

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

La résistance aux antibiotiques chez *Brucella* est extrêmement rare et ne constitue pas un problème pour le traitement des patients. L'étude de sensibilité *in vitro* est réalisée de façon systématique uniquement une fois par an sur les souches reçues au CNR en raison de l'absence

de résistance acquise rapportée à ce jour pour les traitements recommandés pour la brucellose (seuls quelques cas exceptionnels décrits dans la littérature) (voir paragraphe 5.2). Nous ne recommandons ni n'encourageons les laboratoires à effectuer des tests de sensibilité aux antibiotiques pour les isolats de *Brucella*. Il s'agit d'un risque majeur d'infection acquise en laboratoire.

Au sein du laboratoire, annuellement, nous réalisons des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de type Mueller Hinton au sang (MH-F) en utilisant les bandelettes E-tests (BioMérieux) pour les antibiotiques suivant : doxycycline, rifampicine, gentamicine, ceftriaxone, cotrimoxazole, ciprofloxacine, lévofloxacine et tétracycline. Ces analyses nous permettent une surveillance de la sensibilité des isolats identifiés en France.

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

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

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

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

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Diagnostic indirect : sérologie bactérienne

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

Diagnostic direct : Technique de bactériologie classique

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

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

La résistance aux antibiotiques

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