

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE BIOMEDICALE DEPARTEMENT D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE



**RAPPORT ANNUEL DES ACTIVITES DU
LABORATOIRE DE GENOMIQUES
DES PATHOGENES
EXERCICE 2021**

Table des matières

I. Introduction

Page 1

II. Vue d'ensemble de la Méthodologie de séquençage

Page 1

III. Activités réalisées

Page 1

1. Maladie à Virus Ebola

Page 1

2. Pandémie à Covid-19

Page 4

3. La détection moléculaire directe du Polio virus sur la plate-forme Nanopore

Page 16

4. La confirmation de l'épidémie de Monkeypox dans le Maniema

Page 18

5. La confirmation de l'épidémie de Peste dans la province de l'Ituri

Page 18

IV. Difficultés rencontrées et Perspectives

Page 19

V. Conclusion

Page 20

Liste des Abréviations

ADN : Acide ribonucléique

CUK : Cliniques Universitaires de Kinshasa

cVDPV : circulating Vaccine-Derived Polioviruses

DDNS : Directive Detective Nanopore Sequencing

FBMG : Fondation Bill et Melinda Gate

INRB : Institut National de Recherche Biomédicale

MVE : Maladie à Virus Ebola

NGS : Next Generation Sequencing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONT : Oxford Nanopore Technology

PCR : Polymerase Chain Reaction

PVS : Poliovirus Sauvage

RCA : République Centrafricaine

RDC : République Démocratique du Congo

RNA : Ribonucleic Acid

VOC : Variant Of Concern

Liste des Tableaux et Figures

1. Tableaux

Tableau 1 : Situation des 2 épidémies ayant sévi au Nord-Kivu cette année

Tableau 2 : Echantillons reçus par pays

Tableau 3 : Nombre d'échantillons de la RDC reçus par provinces

Tableau 4 : Nombre d'échantillons par plateforme et séquenceur

Tableau 5 : Répartition des pays en fonction de personnel formé au protocole Midnight (ONT) et aux analyses

Tableau 6 : Nombre de Séquences Soumises

Tableau 7 : Sensibilité par sérotype de l'étude rétrospective

Tableau 8 : Sensibilité de la DDNS comparée à la culture par sérotype

2. Figures

Figure 1.a : Arbre phylogénétique des échantillons de la 10ème épidémie intégrant les séquences des 12è et 13è épidémies en rouge

Figure 1.b : Illustration de la divergence des échantillons des 12è et 13è épidémies sur cette horloge de temps

Figure 2 : Capture d'écrans de l'arbre phylogénétique intégrant les échantillons de la 13ème épidémie et 7 des 30 échantillons séquencés les plus proches génétiquement

Figure 3 : Capture d'écrans sur Nextstrain montrant l'arbre phylogénétique des échantillons séquencés durant la 10ème épidémie et l'introduction de la mutation V75A et ceux de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest pour la mutation A82V

Figure 4 : Mutation A82V constatée en Afrique de l'Ouest et ayant le même modèle que celle V75A

Figure 5 : Pays d'Afrique Centrale couverts et appuyés par l'INRB dans la surveillance génomique

Figure 6 : Variants détectés en 2021

Figure 7 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1ère expédition de la République du Congo

Figure 8 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition de la République du Congo

Figure 9 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition de la République du Congo

Figure 10 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 4e expédition de la République du Congo

Figure 11 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 5e expédition de la République du Congo

Figure 12 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition du Tchad

Figure 13 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition du Tchad

Figure 14 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition du Tchad

Figure 15 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition de la RCA

Figure 16 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition de la RCA

Figure 17 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition de la RCA

Figure 18 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition Cameroun

Figure 19 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition Cameroun

I. Introduction

Depuis 2018, l'Institut National de Recherche Biomédicale a acquis des équipements, réactifs et consommables qui lui ont permis de réaliser les analyses de NGS au pays via les plates-formes Illumina et Oxford Nanopore Technologies (ONT). Les diverses formations reçues ont permis à l'équipe de séquençage des pathogènes de s'approprier la technologie. Cet acquis a été un support d'appui important pour les activités suivantes :

- Confirmation de deux dernières épidémies de la Maladie à Virus Ebola (12^{ème} et 13^{ème});
- 3 investigations complémentaires autour de la 10^{ème} épidémie Ebola en RDC :
 - L'impact de la mutation V75A,
 - Le profil bactériologique et virologique des échantillons négatifs collectés durant ladite épidémie.
 - Le lien avec les 12^{ème} et 13^{ème} épidémie.
- Détection des variants préoccupants (VOC) de la Covid-19 ayant circulé en Afrique Centrale.
- Détection moléculaire directe du Polio virus avec la plate-forme Nanopore.
- Confirmation de l'épidémie de Monkeypox dans le Manie-ma

- Confirmation de l'épidémie de Peste dans la province de l'Ituri.

Toutes ces activités se sont déroulées essentiellement à Kinshasa où le séquençage est implémentée dans ses composantes « wet lab » et « dry lab » ou bio-informatique. La même démarche a été aussi entreprise avec succès dans le Nord – Kivu, précisément à Goma.

II. Vue d'ensemble de la Méthodologie de séquençage

Tout au long de l'année, plusieurs approches et protocoles ont été utilisés pour le séquençage en fonction de l'objectif poursuivi. Notons que le séquençage des amplicons était la stratégie appliquée pour le séquençage des virus Ebola, Polio et SARS-CoV-2 tandis que l'approche métagénomique a servi à la détection du Monkeypox et de Yersinia pestis.

Pour ce qui concerne les analyses bioinformatiques, les pipelines ivar et artic ont servi pour le séquençage par amplicons respectivement dans les plate-formes Illumina et Nanopore. Le pipeline consensus.fasta et PathDisco ont été utilisés pour les analyses métagénomiques.

III. Activités réalisées

1. Maladie à Virus Ebola

a. Confirmation des deux dernières (12^{ème} et 13^{ème}) épidémies MVE

Deux épidémies ont été déclarées cette année au Nord – Kivu : à Butembo en février 2021 et à Beni vers fin octobre 2021. Leur situation est résumée dans le tableau ci-dessous.

	12 ^{ème} épidémie	13 ^{ème} épidémie
Zone de santé	Biena (Extension Butembo)	Béni
Période	Du 7 février au 3 mai 2021	Du 07 octobre au 16 décembre 2021
Total échantillons analysés	1758	1175
Nombre de patients testés positifs	11	8
Nombre d'échantillons expédiés à Kinshasa pour séquençage	11	1
Nombre d'échantillons positifs séquencés sur terrain	0	7 dont 6 génomes complets
Investigations supplémentaires à Kinshasa	Lien avec les échantillons de Butembo	Lien avec échantillon de Butsili Séquençage de 30 échantillons de la 10 ^{ème} épidémie en lien probable avec le cas index... les Analyses continuent

Tableau 1 : Situation des 2 épidémies ayant sévi au Nord-Kivu cette année

Pour les 2 réémergences, les nouveaux cas détectés et séquencés ont un lien avec un groupe d'échantillons de la 10^{ème} épidémie (variant Ituri). Il ne s'agissait donc pas d'une nouvelle introduction de virus (spillover), mais plutôt une résurgence probablement à partir d'un survivant.

Pour l'épidémie de Biena, le patient avait 5 mutations de plus que le génome le plus proche, révélateur d'un taux de substitution ralenti et caractéristique de l'infection prove-

nant d'une source persistante. La même suggestion d'infection provenant de source persistante a été émise également pour l'épidémie de Butsili (Béni) suite à la réduction de 5,6 fois du taux évolutif. Le nouveau génome(21-BEN114) avait six mutations divergentes du génome le plus proche, qui a été collecté en juillet 2019¹.

1. <https://virological.org/t/oct-2021-evd-case-in-drc-linked-to-2018-2020-nord-kivu-evd-outbreak/762>

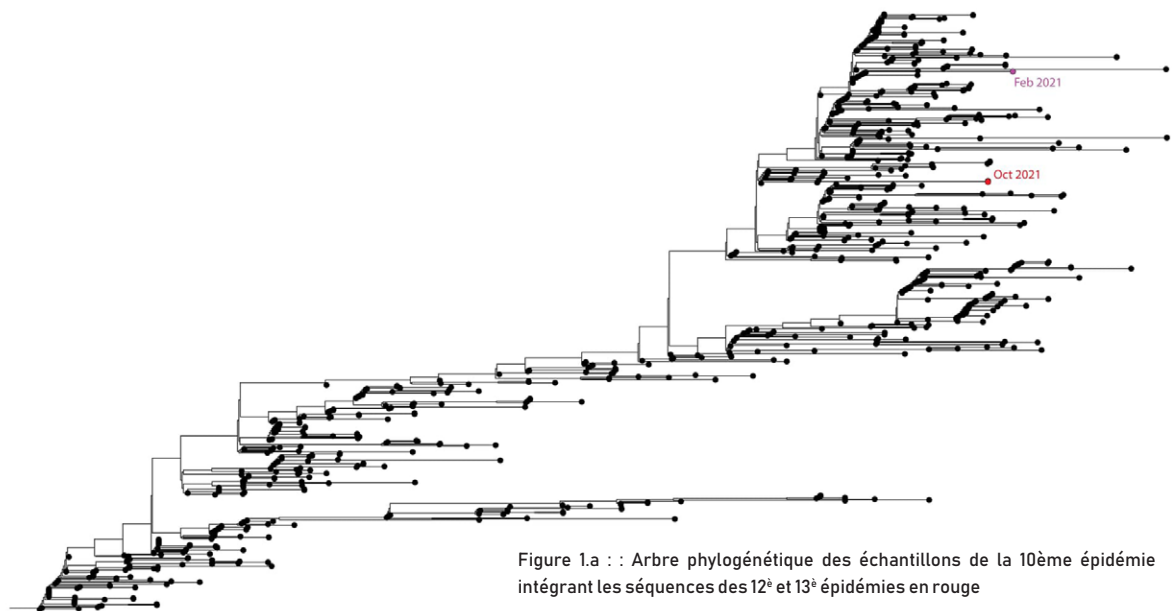


Figure 1.a : Arbre phylogénétique des échantillons de la 10ème épidémie intégrant les séquences des 12^è et 13^è épidémies en rouge

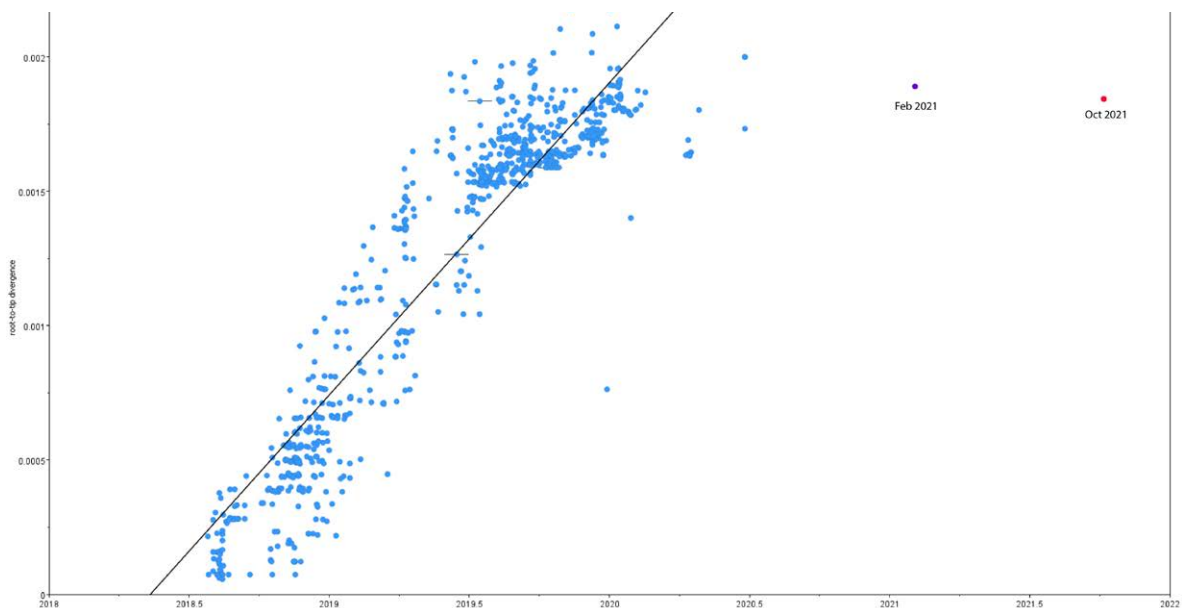


Figure 1.b : Illustration de la divergence des échantillons des 12^è et 13^è épidémies sur cette horloge de temps

b. Investigations complémentaires autour de la 10ème épidémie Ebola

i. Le lien avec les 12^{ème} et 13^{ème} épidémie

Après confirmation des épidémies, le séquençage a permis d'établir des liens avec des génomes isolés lors de la 10^{ème} épidémie. Pour la 13^{ème} épidémie, les génomes les plus proches (BEN24348 et KAT7440) étaient isolés des échantillons prélevés sur des patients décédés. Ils ne pouvaient donc pas être la source de l'infection, mais plutôt probablement dans la même chaîne de transmission ou à proximité du survivant infecté de manière persistante.

En outre, le premier cas diagnostiqué (21-BEN114) ne semblait pas être le cas source selon les rapports épidémiologiques. En effet, il a fait suite à un groupe de trois décès suspects de MVE signalés par les responsables de la zone de santé de Beni le 30 septembre qui se sont produits dans un ménage de la zone de santé de Butsili les 14, 19 et 29 septembre 2021. Les trois cas présumés de MVE vivaient dans

le même quartier que le cas confirmé. Aucun échantillon n'a été prélevé dans ces cas et des enterrements sûrs et dignes n'ont pas été effectués. Ainsi, a été émise l'hypothèse selon laquelle une ou plusieurs des six mutations acquises pourraient s'être produites pendant la transmission interhumaine normale avant le prélèvement de l'échantillon de 21-BEN114.

Ceci a donné lieu à des investigations supplémentaires ayant consisté à la recherche dans les bases des données ainsi que dans les narratifs d'investigations épidémiologiques, tous les échantillons de la 10^{ème} épidémie, en provenance des aires de santé de Butsili et Kanzulinzuli prélevés autour de juillet 2019.

30 échantillons ont été retrouvés et séquencés (cfr figure à la page suivante). Même de nouveaux génomes (en gris) sont entre BEN24348 et les échantillons 21-BEN (en vert). Le patient INRB-002269 (Lab ID BEN_24419 et Epi ID BENV_25508) partage une mutation avec la branche vers les échantillons 21-BEN, mais possède également des mutations supplémentaires. Il figure également parmi les contacts des cas index et a été récemment échantillonné à Beni. Les séra de ces

contacts étaient négatifs pour Ebola (Genexpert) et ont été expédiés à l'INRB pour sérologie (IgM et IgG) avec d'autres contacts. Un rapport sur les résultats sérologiques suivra sous peu. Le patient INRB-002269 (Lab ID BEN_24419 et Epi

ID BENV_25508) a été en outre testé positif aux IgG et négatif aux IgM (malgré un faible signal). Le séquençage de tous les cas liés à INRB-002269 pourrait être utile.

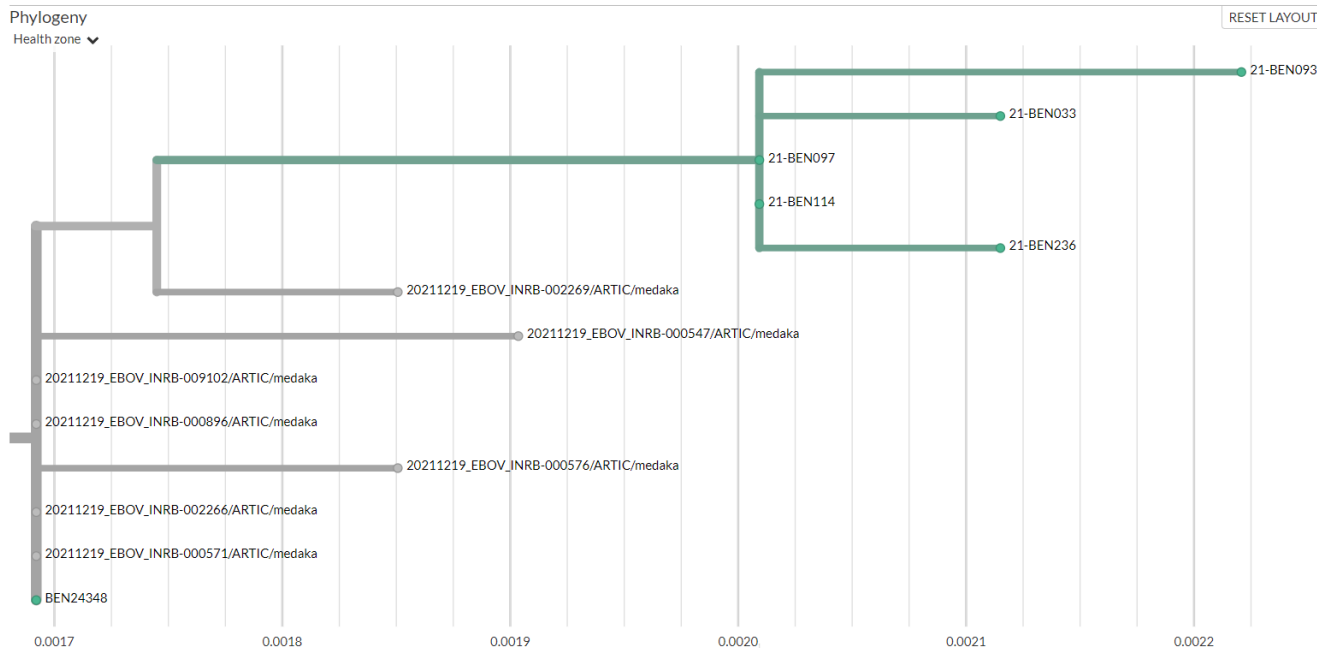


Figure 2 : Capture d'écrans de l'arbre phylogénétique intégrant les échantillons de la 13^{ème} épidémie et 7 des 30 échantillons séquencés les plus proches génétiquement

ii. L'impact de la mutation V75A

La 10^{ème} épidémie de la MVE qui a sévi en RDC est la 2^{ème} dans le monde tant par sa durée, soit 22 mois, que par son importance en termes de cas enregistrés. Déclarée le 1^{er} août 2018 dans la province du Nord-Kivu, elle s'est propagée dans les provinces de l'Ituri et du Sud-Kivu, avec des cas d'exportation en Ouganda. Cette flambée a présenté des

difficultés particulières du fait qu'elle est apparue dans une zone de conflit actif. On a dénombré 3 470 cas, 2 287 décès et 1 171 survivants jusqu'au 25 juin 2020. Plus de 800 échantillons répartis sur toute la durée de l'épidémie, ont été séquencés à ce jour. Il a été observé dans l'apparition d'une mutation non synonymique au niveau de la protéine GP, V75A (figure 4).

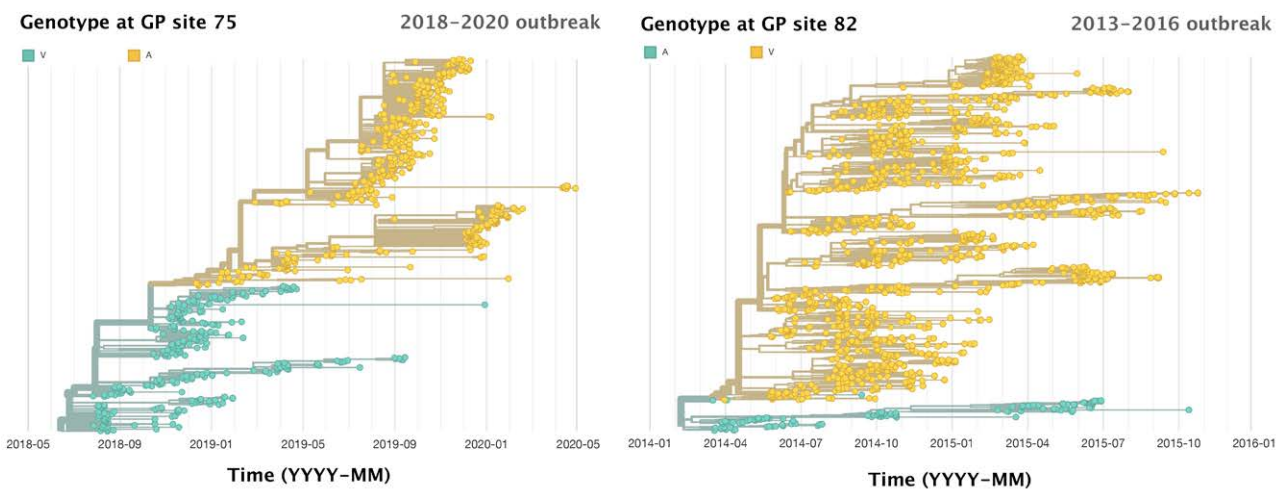


Figure 3 : Capture d'écrans sur Nextstrain montrant l'arbre phylogénétique des échantillons séquencés durant la 10^{ème} épidémie et l'introduction de la mutation V75A et ceux de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest pour la mutation A82V

Pour l'épidémie de Biena, le patient avait 5 mutations de plus que le génome le plus proche, révélateur d'un taux de substitution ralenti et caractéristique de l'infection pro-

venant d'une source persistante. La même suggestion d'infection provenant de source persise.

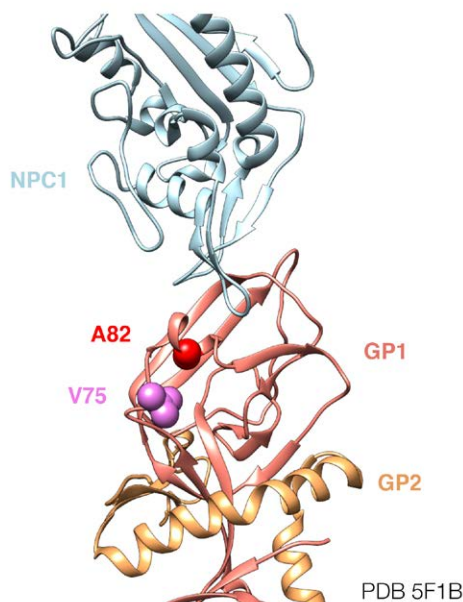


Figure 4 : Mutation A82V constatée en Afrique de l'Ouest et ayant le même modèle que celle V75A

La même question s'est donc posée pour la mutation V75A qui s'est fixée. Les investigations consistent à séquencer le maximum d'échantillons et surtout couvrir la période supposée de l'apparition de la mutation. Ceci permettra de compa-

rer les patients avec la mutation à ceux qui ne l'ont pas et déterminer l'impact sur l'évolution de l'épidémie en termes d'infectiosité, transmissibilité, létalité, échappement vaccinal ou face au traitement expérimentaux.

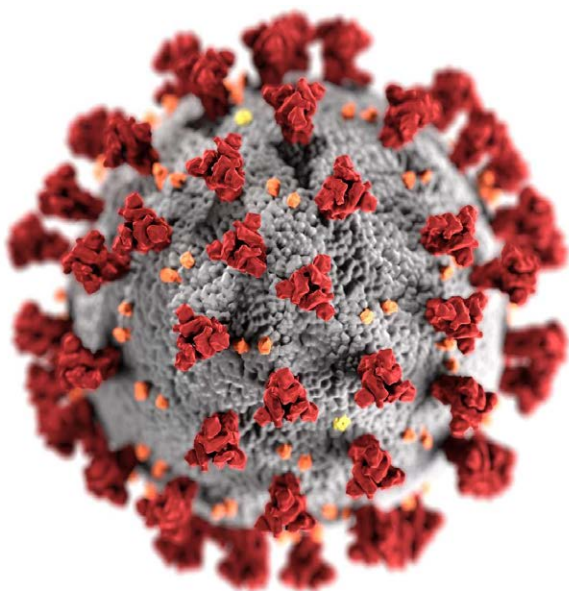
iii. Profil bactériologique et virologique des échantillons négatifs 10^{ème} épidémie

Au cours des 22 mois qu'a duré la 10^{ème} épidémie, la riposte a réalisé des tests pour plus de 220 000 échantillons. Cependant, seuls ceux de près de 3470 cas, (soit un peu plus de 20000 échantillons) étaient revenus positifs à la PCR Ebola. Sur les échantillons revenus négatifs, une moindre proportion appartenait aux cas contacts asymptomatiques sous suivi, et la majorité (plus de 80%) étaient prélevés chez les patients symptomatiques, répondant à la définition des cas en période épidémique.

Pour cette grande majorité des patients, des investigations par approche métagénomique des échantillons négatifs de la 10^{ème} épidémie, sont en cours d'analyse. Elles ont pour objectif de déterminer les profils bactériologique et virologique.

Une étude pilote a été lancée sur 274 échantillons. 96 librairies ont déjà été séquencées et sont en cours d'analyse bio-informatique.

2. Pandémie à Covid-19



a. Introduction

En RDC, le premier cas Covid-19 a été diagnostiqué le 10 mars 2020 et la RDC a enregistré jusqu'au 31 décembre près de 79632 cas confirmés dont 2 cas probables et 1135 décédés. La première séquence a été publiée sur la plate-forme GISAID 2 semaines plus tard, soit le 25 mars 2020. La RDC a été parmi

les premiers pays dans le monde à partager publiquement ses séquences sur GISAID afin de guider la riposte mondiale.

Adhérent au Pathogen Genomics Initiative (PGI), dès février 2021, l'Institut National de Recherche Biomédicale (INRB) a été désigné par l'OMS et Africa CDC, comme Laboratoire Régional de Référence pour le séquençage des échantillons SARS-Cov-2 en provenance de Tchad, de la République du Congo, du Cameroun et de la République Centrafricaine permettant l'étude des mutations virales dans le temps et dans l'espace pouvant également aider à suivre la propagation de l'agent pathogène et à mieux comprendre les voies de transmission potentielles et la dynamique de la transmission.

Avec l'appui et les efforts de plusieurs partenaires, le Pays a pu séquencer les échantillons réceptionnés en 2021, année marquée par les 3^{ème} et 4^{ème} vagues.

b. Activités réalisées

Les activités réalisées durant l'année 2021 ont consisté en :

- Réception et inventaire des échantillons ;
- Séquençage ;
- Et Formation.



i. Réception et inventaire des échantillons

En plus des échantillons de la RDC, Le laboratoire de séquençage a analysé des échantillons en provenance de 4 autres pays d'Afrique centrale, à savoir le Cameroun, le Tchad, la République Centrafricaine, la République du Congo (tableau 1).

Pour ce qui concerne la RDC, les échantillons ont été collectés depuis au moins 7 provinces sur les 26 (tableau 2).

Tous les échantillons positifs devraient avoir de bonnes charges virales (Ct<30 pour au moins une des cibles, ceux inférieurs à 28 étant privilégiés), avant d'être transmis au laboratoire de séquençage. Les échantillons de la RDC ont été réceptionnés en collaboration avec le laboratoire de grippe et virus respiratoires de l'INRB, de l'Université de Kinshasa, de certains hôpitaux de Kinshasa et des divisions provinciales.

Les détails sont fournis dans le tableau ci-dessous.

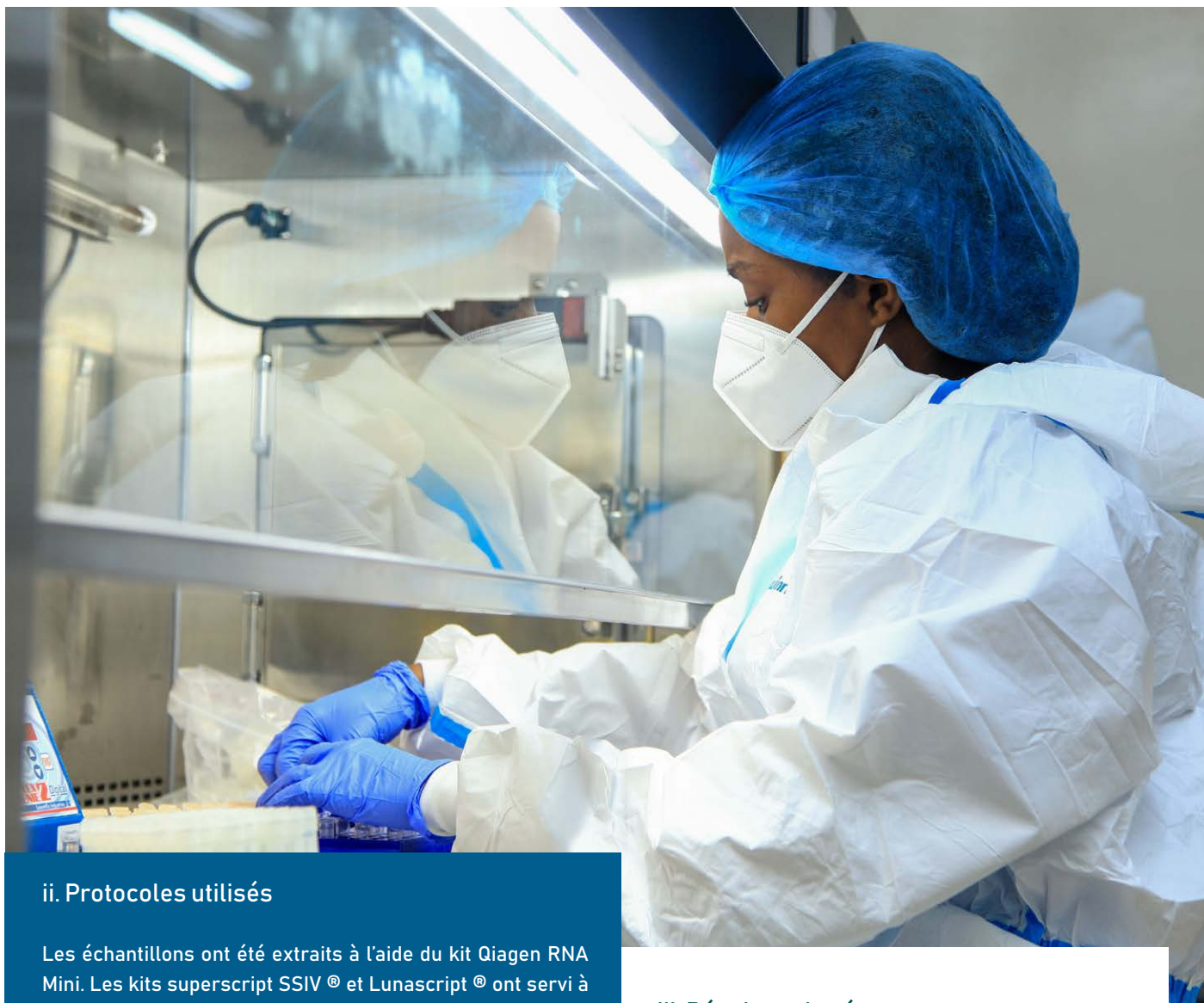
Pays	Nombre d'expéditions	Nombre d'échantillons	%
Cameroun	2	588	22.8
Tchad	3	60	5.5
République Centrafricaine	3	141	5.5
République du Congo	5	486	18.9
RD du Congo	NA	1302	50.5
Total		2577	100

Tableau 2 : Echantillons reçus par pays

Province	Couverture sup. à 80%	Total
Haut Katanga	20	50
Haut Uélé	14	23
Kinshasa	502	682
Kongo Central	6	13
Lualaba	9	18
Nord Kivu	18	24
Tshopo	2	5
Non renseigné	122	190

Tableau 3 : Nombre d'échantillons de la RDC reçus par provinces

Ces échantillons ont été transmis à la biobanque pour un stockage à long terme.



ii. Protocoles utilisés

Les échantillons ont été extraits à l'aide du kit Qiagen RNA Mini. Les kits superscript SSIV® et Lunascript® ont servi à la synthèse des ADNc. Les PCR multiplex se sont déroulées à l'aide des amorces V3, V4, Midnight ou Qiagen. Pour la préparation des bibliothèques, plusieurs protocoles et kits ont été utilisés dans les 2 plate-formes NGS Illumina et Nanopore à savoir : Rapid Barcoding Kit (Midnight), SQ-LSK109, Nextera DNA Flex, QIASEQ. Les pipelines artic ou iVar ont servi aux analyses bioinformatiques. Les consensus obtenus ont été soumis aux logiciels Pangolin et/ou Nextclade pour l'assignation des variants avant d'être publiés sur GISAID.

iii. Résultats de séquençage

a. RDC

La RDC a été marquée cette année par 2 vagues et l'équipe a analysé plus de 1005 échantillons dont 693 avaient une couverture du génome séquencé supérieure à 80% (tableau 3). La performance a varié tout au long de l'année et était fonction essentiellement de la qualité des échantillons reçus.

Séquenceur	Plate -forme	Cover>80%	Grand Total
MiSeq	Illumina	366	583
MinION	ONT	36	362
GridION	ONT	281	15
Mk1C	ONT	10	45

Tableau 4 . Nombre d'échantillons par plateforme et séquenceur



Figure 5 : Pays d'Afrique Centrale couverts et appuyés par l'INRB dans la surveillance génomique

Pour ce qui concerne la RDC, les variants détectés sont illustrés dans la figure ci-dessous. Nous notons que le variant Delta a circulé durant toute l'année avant de prédominer durant la 3ème vague. Il a successivement laissé la place aux variants B.1.640 et Omicron.

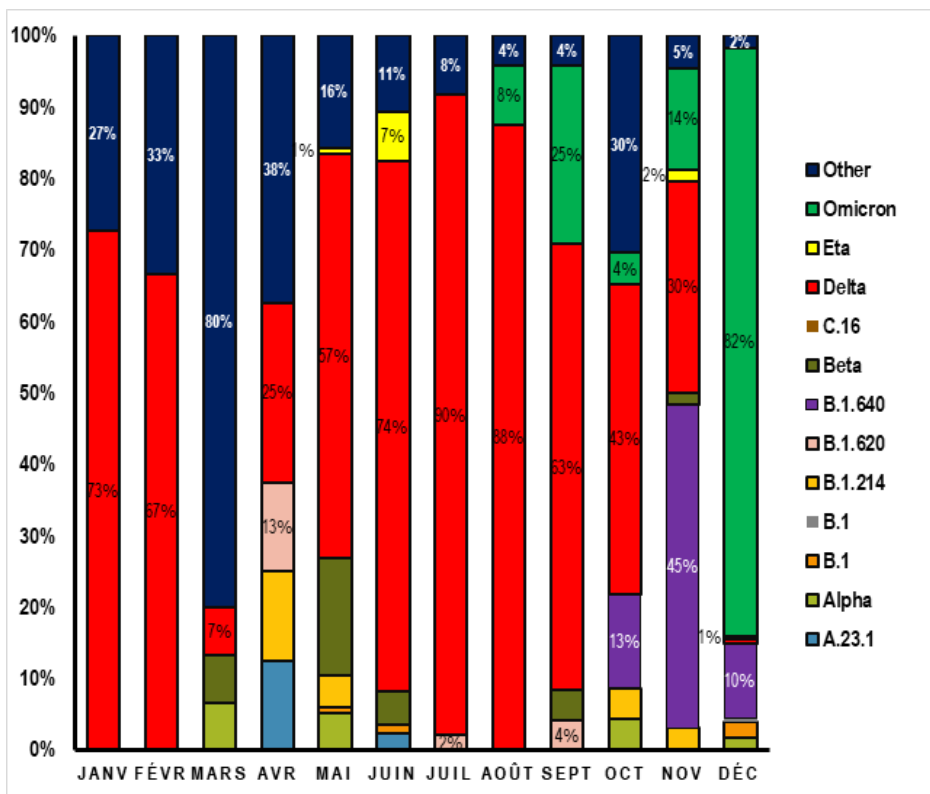


Figure 6 : Variants détectés en 2021



b. République du Congo

En provenance du Congo, il y a eu 5 expéditions dont 3 les 2 derniers mois. Les échantillons en provenance de la République du Congo ont été dominés respectivement par rapport aux expéditions, par les variants Alpha (expéditions juin), B.1.620 (octobre), B.1.640 (fin novembre), Delta et Omicron.

1ère expédition : 100 échantillons (15/06/21)

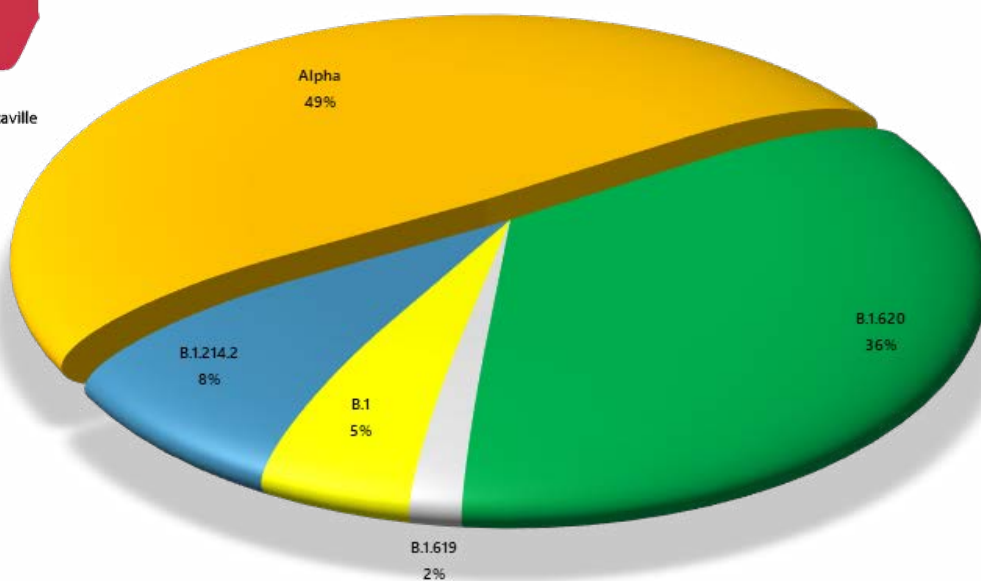


Figure 7 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1ère expédition de la République du Congo

2ème expédition : 73 échantillons (20/10/21)

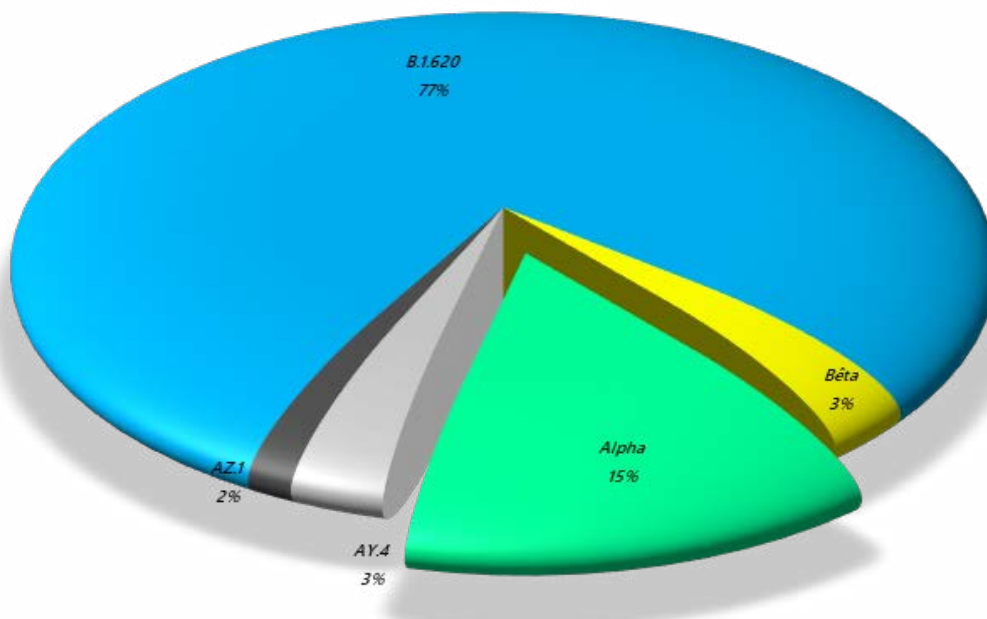


Figure 8 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition de la République du Congo

3ème expédition : 160 échantillons (23/11/21)

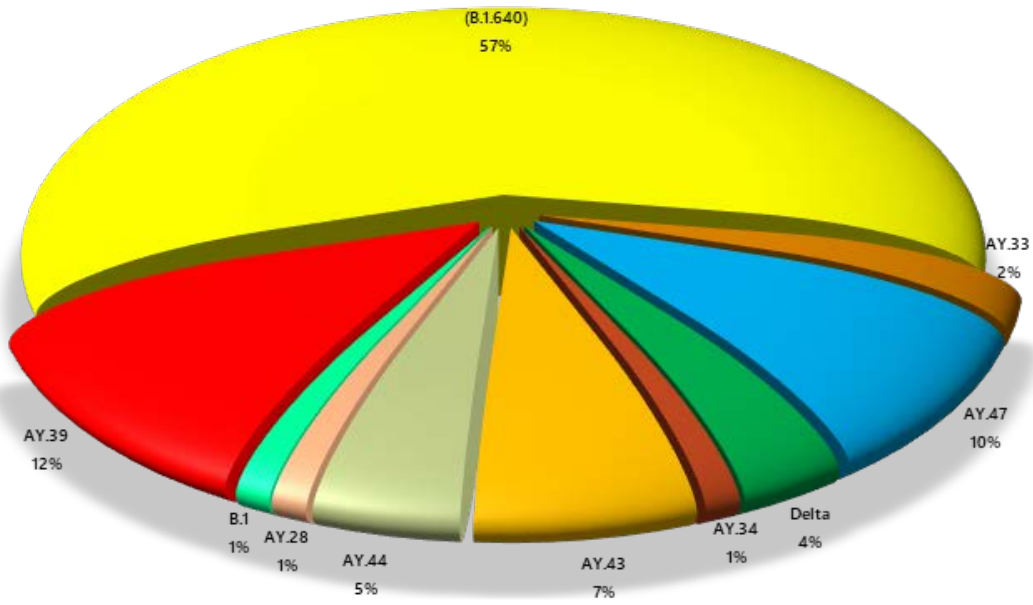


Figure 9 Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition de la République du Congo

4ème expédition : 81 échantillons (12/12/21)

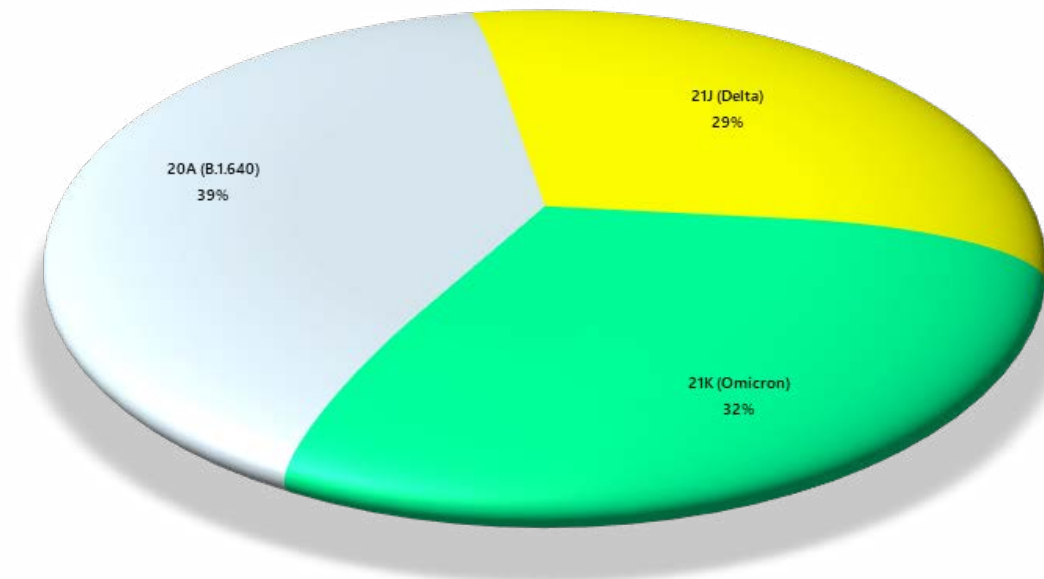


Figure 10 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 4e expédition de la République du Congo

5ème expédition : 72 échantillons (18/12/21)

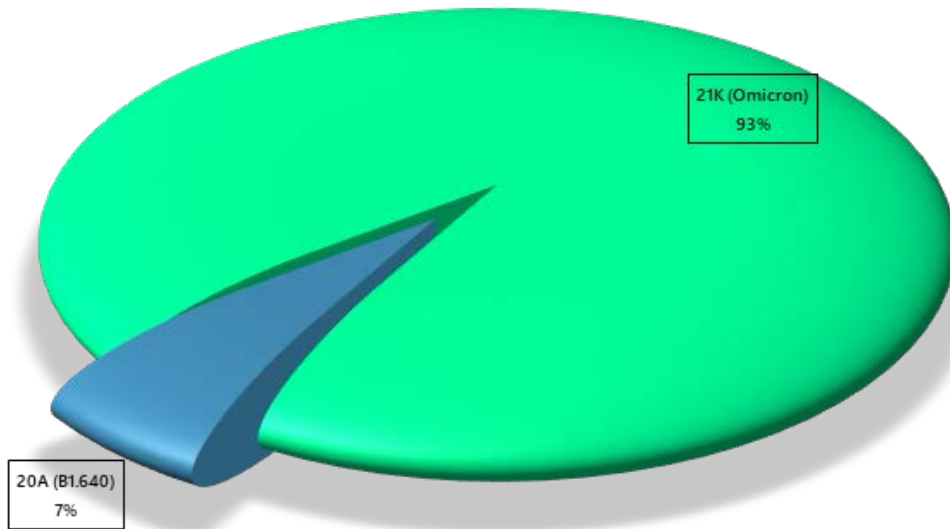


Figure 11 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 5e expédition de La République du Congo

c. Tchad

Pour ce qui concerne le Tchad, il y a eu 3 expéditions dominées respectivement par les variants B.1.1.1 (expédition de juillet 2021) et Delta (2ème et 3ème expéditions).



1ère expédition : 20 échantillons (13/07/21)

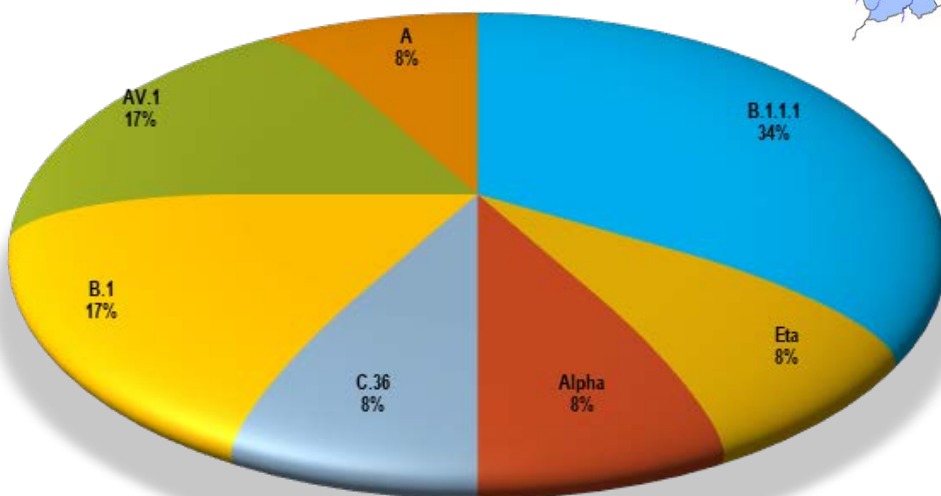


Figure 12 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition du Tchad

2ème expédition : 20 échantillons (27/09/21)

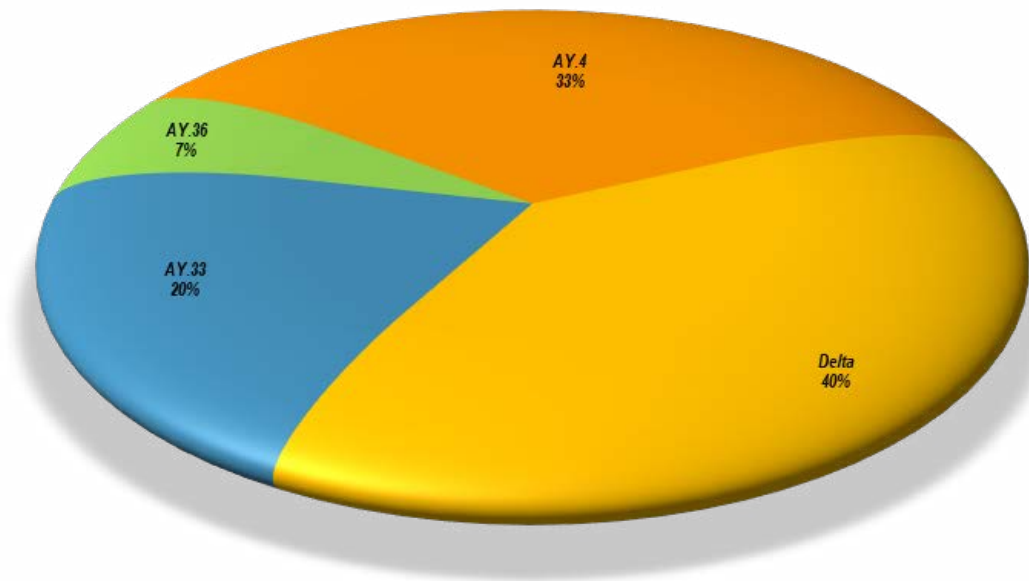


Figure 13 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition du Tchad

3ème expédition : 20 échantillons (24/11/21)

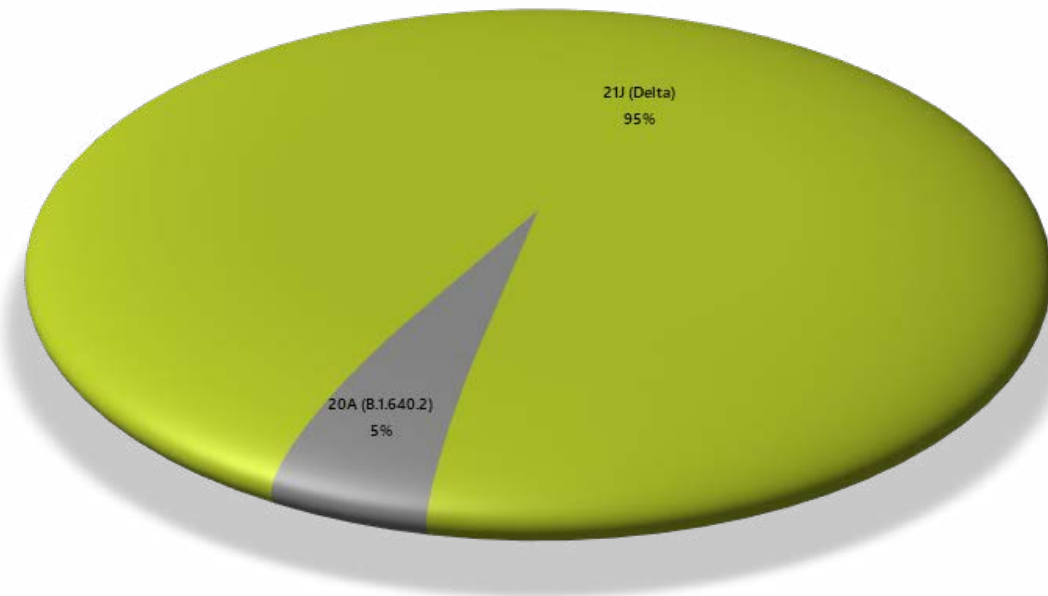


Figure 14 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition du Tchad

c. République Centrafricaine

Parmi les échantillons de la RCA, les variants majoritaires par expédition sont respectivement le B.1.177, le variant Delta et le B.1.640.

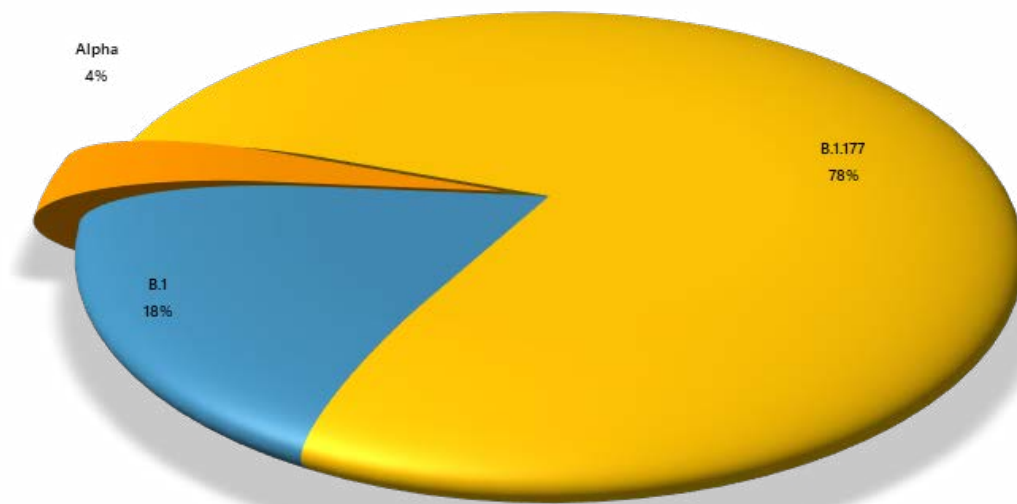


Figure 15 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition de la RCA

2ème expédition : 51 échantillons (07/08/21)

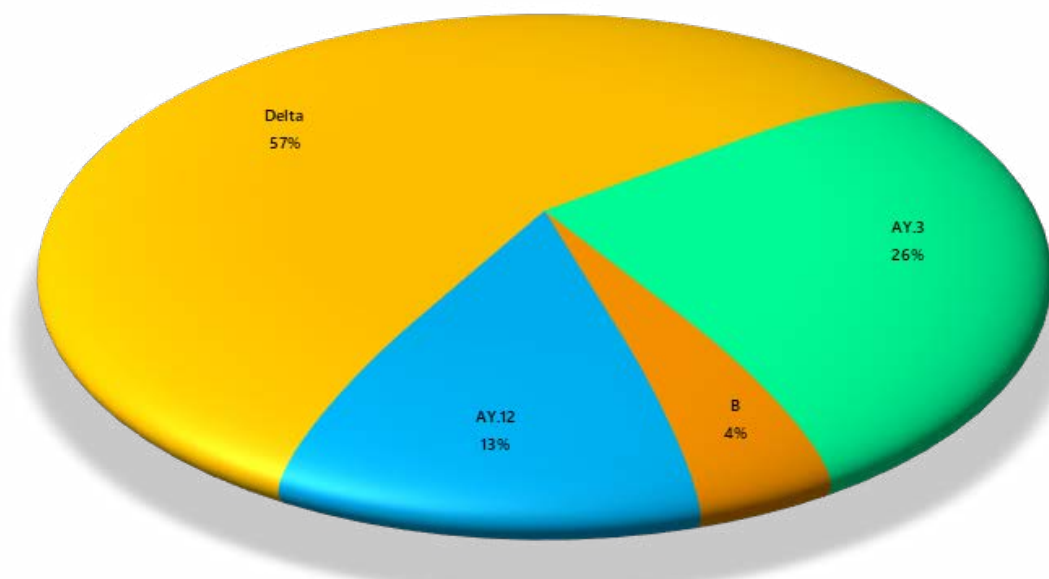


Figure 16 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition de la RCA

3ème expédition : 50 échantillons (07/12/21)

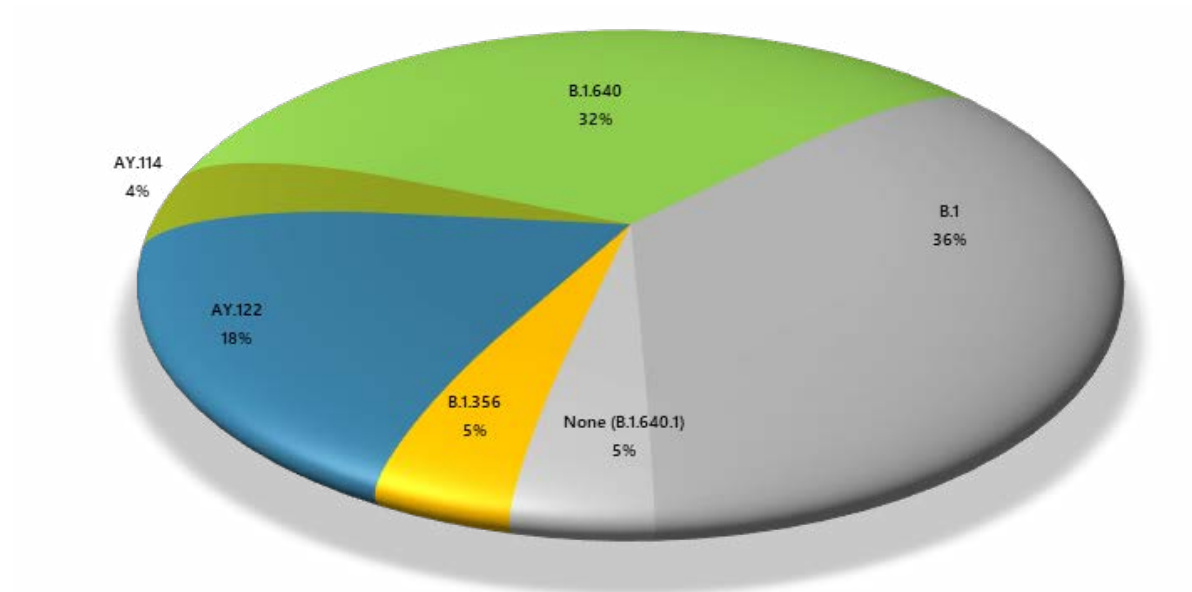
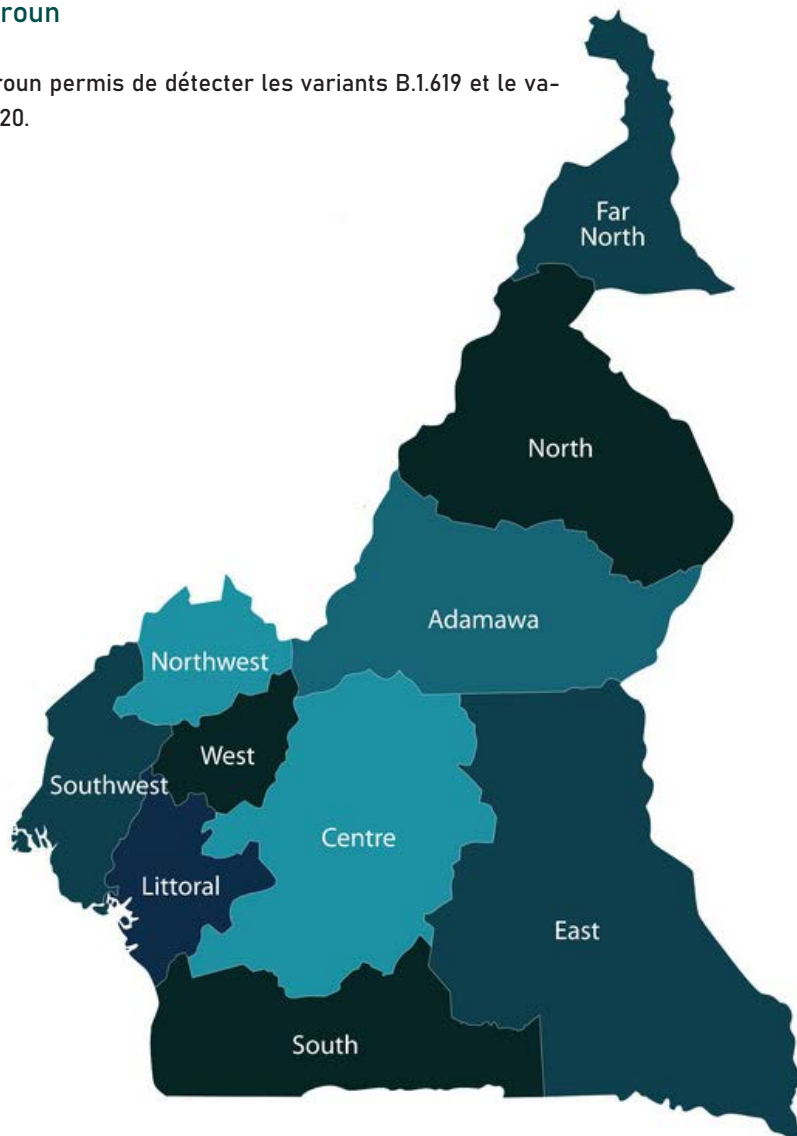


Figure 17 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 3e expédition de la RCA

d. Cameroun

Le Cameroun permis de détecter les variants B.1.619 et le variant B.1.620.



1ère expédition : 100 échantillons (29/04/21)

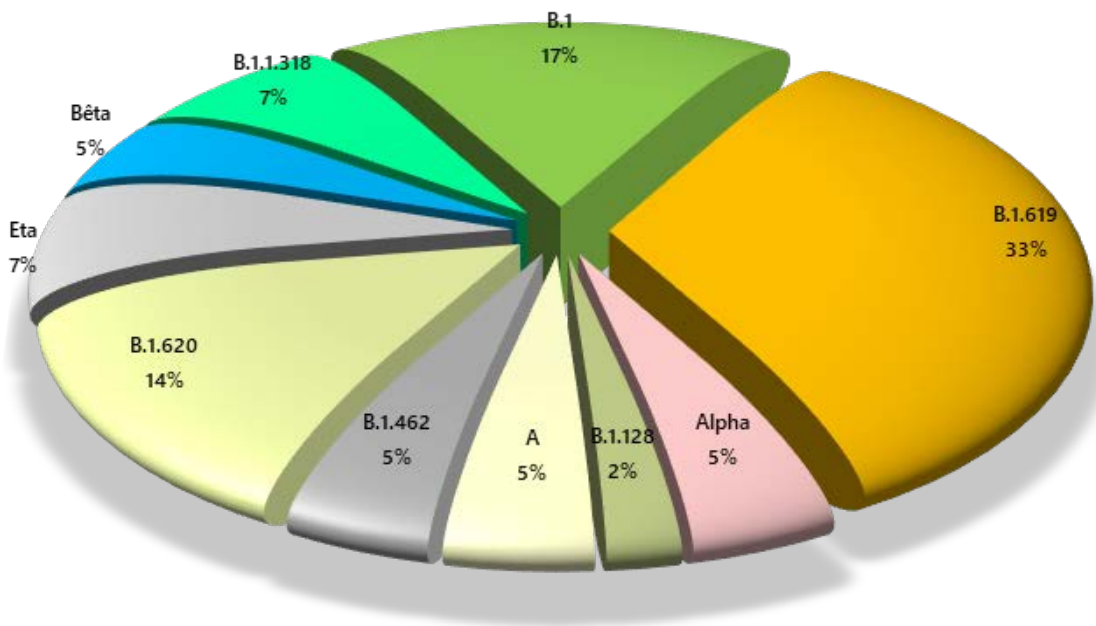


Figure 18 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 1e expédition Cameroun

2ème expédition : 488 échantillons (23/08/21)

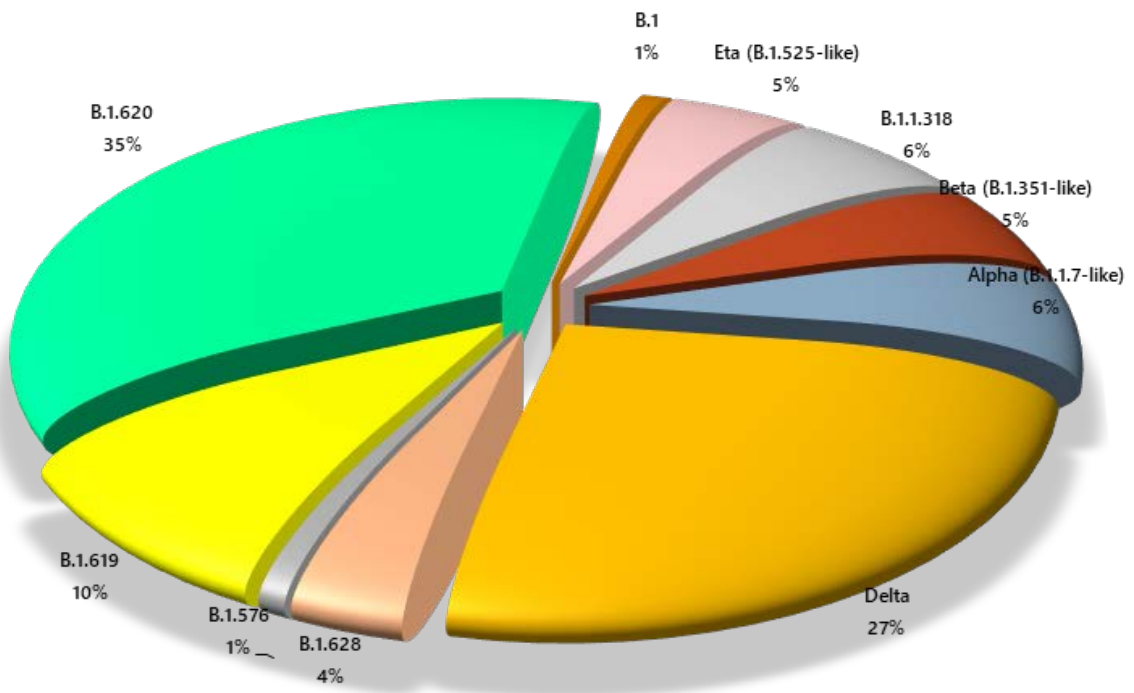
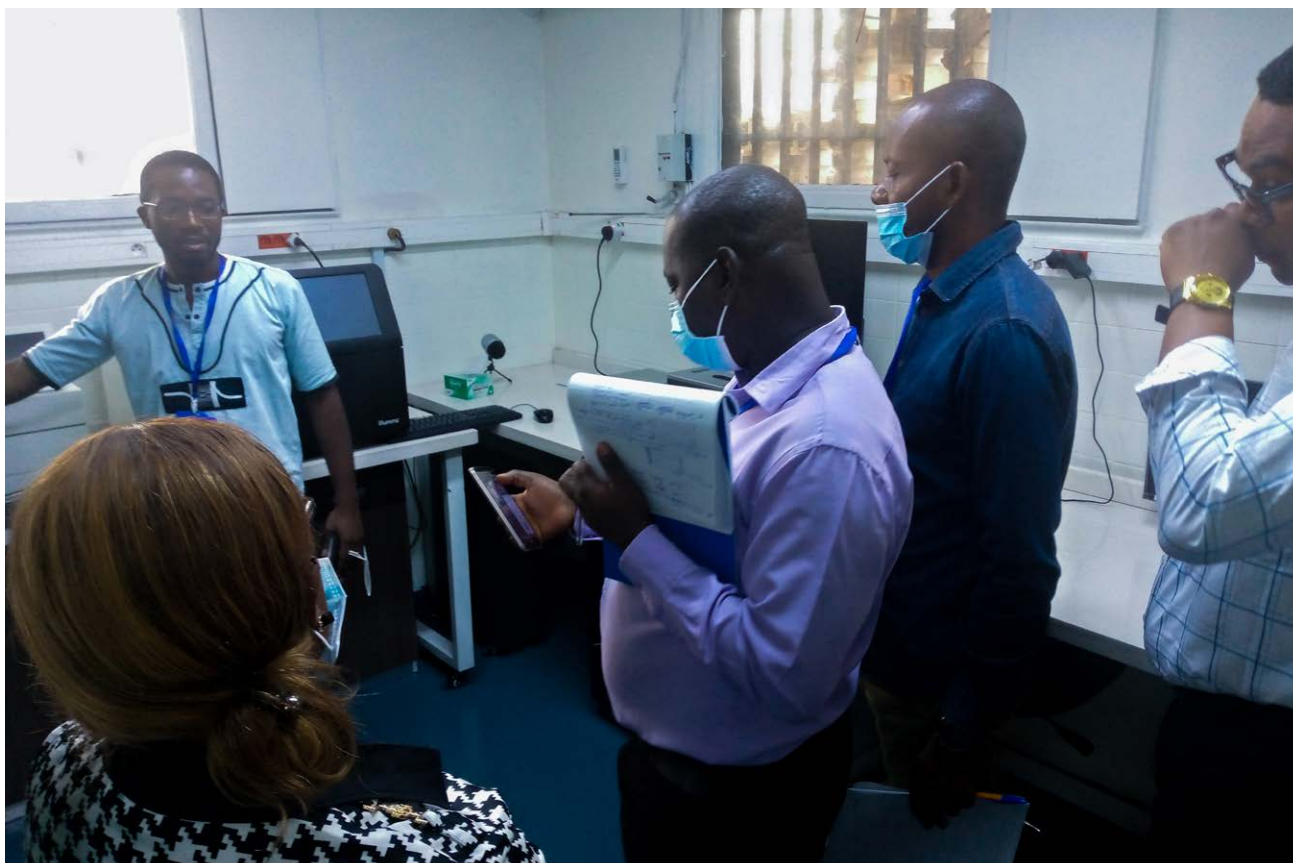


Figure 19 : Répartition des variants détectés dans les échantillons de la 2e expédition Cameroun

iii. Formation

Cette année, le laboratoire de séquençage a reçu successivement plusieurs hôtes en provenance du Tchad et de la République du Congo afin de renforcer les capacités dans la surveillance génomique SARS-CoV-2. Les participants ont été formés dans les manipulations de laboratoire conformément au protocole Midnight sur la plateforme Nanopore, et initiés aux analyses bio-informatiques sur le pipeline artic.



Pays	Nombre de personnes	Période de formation
Tchad	3	Du 13 au 31 octobre 2021
République du Congo	2	Du 20 octobre au 04 novembre 2021
République du Congo	1	Du 04 au 25 novembre 2021
République du Congo	1	Du 23 novembre 2021 au 11 janvier 2022
Inrb/ Goma	3	Du 21 au 30 novembre 2021

Tableau 5 : Répartition des pays en fonction de personnel formé au protocole Midnight (ONT) et aux analyses



Pays	Nombre de Séquences Soumises
République Démocratique du Congo	1381 (y compris 354 de 2020)
Cameroun	125
Tchad	41
République du Congo	241
République Centrafricaine	42

Tableau 6 : Nombre de Séquences Soumises par Pays

3. La détection moléculaire directe du Polio virus avec la plate-forme Nanopore.

Le poliovirus, agent infectieux qui affecte principalement les enfants de moins de cinq ans non complètement vaccinés, est responsable d'une maladie très contagieuse, la poliomyélite, provoquant une paralysie invalidante irréversible, de transmission oro-fécale et compte 3 sérotypes (PVS1, 2 et 3).

La RD.Congo, depuis le dernier cas de Polio Virus Sauvage notifié en 2011, fait face également aux plusieurs flambées d'épidémies de cVDPV marquant une circulation quasi-permanente et sans doute suite à sa faible couverture vaccinale et à une réponse tardive aux épidémies (Mbaeyi et al., 2019) (Democratique et al., 2015).

La surveillance poliovirus se fait actuellement en RDC grâce à la culture, dont les résultats sont confirmés par PCR et séquençage effectué à l'extérieur en Afrique du Sud. En aout 2021, Une équipe de l'unité polio et séquençages de gène des pathogènes infectieux de l'INRB a été formé sur la détection directe de poliovirus à partir des échantillons de selles par la technique de séquençage avec nanopore / MinION (DDNS) dans le cadre du projet de renforcement des capacités du laboratoire de l'INRB pour la surveillance en temps réel des maladies en partenariat avec la fondation Bill et Melinda Gate (FBMG).

Cette étude pilote a été précédée d'une formation en ligne et s'est déroulée en 2 phases : rétrospective et prospective et a permis d'analyser plus de 2000 échantillons de selles en 4 mois. Ceci a offert des avantages significatifs sur le plan logistique, sensibilité et spécificité. En effet, cette expérience a permis la réduction du délai du rendu de résultat en une moyenne d'environ 4 jours comparé à l'algorithme de la

culture cellulaire utilisé dans la surveillance de Paralysie flasque aiguë qui ne se fait jusque-là seulement qu'à l'INRB sur toute l'étendue du pays d'une superficie de 2.345.000 Km². Ce qui conduit à de longs intervalles entre la collecte des échantillons et la détection et la réponse à l'épidémie.

La sensibilité et la spécificité de ce Protocole de détection direct de poliovirus à partir des échantillons de selles basé sur la RT-PCR et PCR Imbriquée de VP1, suivie du séquençage de la région VP1 du Poliovirus avec un nanopore / MinION (DDNS), comparée aux tests actuels basés sur la culture cellulaire et qPCR a été évalué également au cours d'une étude menée au Pakistan. La conclusion pour cette expérience a conduit à une méthode potentielle de remplacer cet algorithme et offrant un nombre d'avantages significatifs (Shaw et al., 2020).

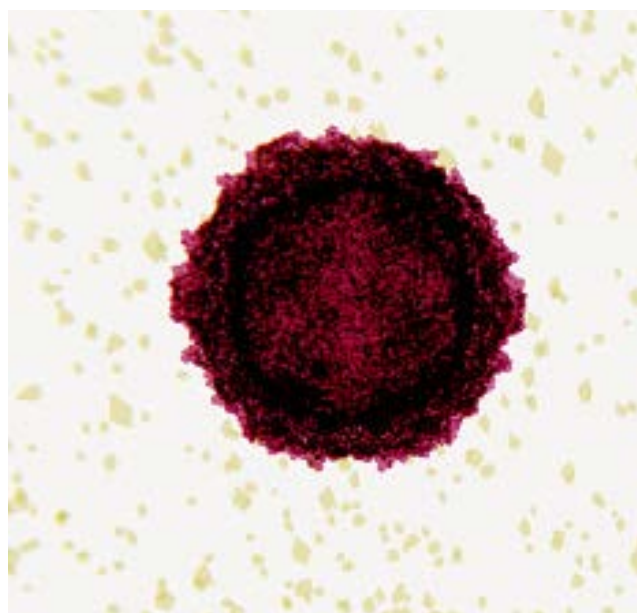


Illustration du Poliovirus

a. Résultats des analyses de cette étude pilote

La somme des échantillons analysés en 29 Runs pour une durée moyenne de 4 Jours entre le début des analyses de laboratoire et le rendu des résultats.

Echantillons analysés	Effectifs
RETROSPECTIVES	283
PROSPECTIVES	2089

Sérotype de Poliovirus	Sensibilité (%)	Nombre d'échantillons positifs par culture
1	100	13
2	100	4
3	83	24

Tableau 7 : Sensibilité par sérotype de l'étude rétrospective

Serotype 1		DDNS		Spec: 99.8% Sen: 75%
		-	+	
Culture, ITD and Sanger sequencing	-	2.081	4	
	+	1	3	

Serotype 2		DDNS		Spec: 99.9% Sen: 96%
		-	+	
Culture, ITD and Sanger sequencing	-	2.063	2	
	+	1	23	

Serotype 3		DDNS		Spec: 99.7% Sen: 93%
		-	+	
Culture, ITD and Sanger sequencing	-	2.067	7	
	+	1	14	

Tableau 8 : Sensibilité de la DDNS comparée à la culture par sérotype

Serotype 3		DDNS		Spec: 99.7% Sen: 93%
		-	+	
Culture, ITD and Sanger sequencing	-	2.063	2	
	+	1	23	

Tableau 9 : Sensibilité et spécificité de la DDNS VDPV2

b. Résultats des analyses de cette étude pilote

- Les coûts par échantillon diminuent à mesure que les cycles de séquençage incluent plus d'échantillons ;
- Un nombre d'échantillons plus élevé diminue le prix par échantillon, se stabilisant à environ 12-14 \$ par échantillon ;

Ce prix comprend des réactifs, des embouts de pipette, des plaques PCR, des kits de séquençage, etc. Prix basés sur les prix du site Web, sans aucune remise négociée.



4. La confirmation de l'épidémie de Monkeypox dans le Maniema

Le virus Monkeypox est un membre du genre Orthopoxvirus dans la famille des Poxviridae. Le Monkeypox est une maladie largement auto-limitante pour lequel il n'y a pas de traitement spécifique. Le premier cas humain a été enregistré en 1970, en RDC, où il évolue de manière endémique dans la forêt équatoriale avec une létalité pouvant aller jusqu'à plus de 11%.

Les provinces qui ont signalé le plus grand nombre de cas suspects sont le Sankuru, Mai-Ndombe, Equateur, Tshuapa et Mongala.

Cette année, une épidémie a sévi pour la première fois dans la province du Maniema, voisine du Sankuru, depuis le mois de novembre 2021. Des échantillons ont été transmis à l'INRB. Des lectures du génome de Monkeypox ont été détectés dans 5 des 6 échantillons de sang, diagnostiqués positifs aux orthopox. Cependant, ces échantillons avaient des charges virales assez faibles.



5. La confirmation de l'épidémie de Peste dans la province de l'Ituri

La peste est une zoonose bactérienne due à *Yersinia pestis*, que l'on trouve habituellement chez les petits mammifères et les puces qui les parasitent. Elle existe 2 formes cliniques principales : la peste bubonique et la peste pulmonaire. La première est la plus courante et se caractérise par une tuméfaction douloureuse des ganglions lymphatiques, les « bubons ».

La peste peut être très grave chez l'être humain, avec un taux de létalité de 30% à 60% pour la forme bubonique et elle est presque toujours mortelle dans sa forme pulmonaire en l'absence de traitement. Les 3 principaux pays d'endémie actuellement sont Madagascar, la République Démocratique du Congo et le Pérou.

En RDC, la province de l'Ituri a notifié 578 cas en 2020 et 2021, provoquant 44 décès.

Au cours du mois de septembre, l'INRB a reçu des échantillons dont 23 échantillons suspects et disponibles ont été séquencés. La préparation des bibliothèques s'est effectuée à l'aide du kit RPIP d'Illumina avec les sondes Illumina Respiratory Panel fournies avec le kit. Les fichiers fastq ont été téléchargés sur Illumina BaseSpace Sequence Hub et l'application Explify IDbyDNA en ligne pour l'assemblage de novo.

Parmi les 23 premiers échantillons, 3 étaient positifs par PCR Peste dont 1 avec une charge bactérienne élevée et dans lequel des lectures de *Yersinia pestis* ont été détectées.



IV. Difficultés rencontrées et Perspectives

Les défis majeurs demeurent :

- L'approvisionnement en réactifs et la logistique y afférent
- Le manque de promptitude dans la transmission des données épidémiologiques
- Le non-respect de la chaîne de froid pour les échantillons expédiés, occasionnant la dégradation et la détérioration des échantillons.

Face à ces défis, le laboratoire compte :

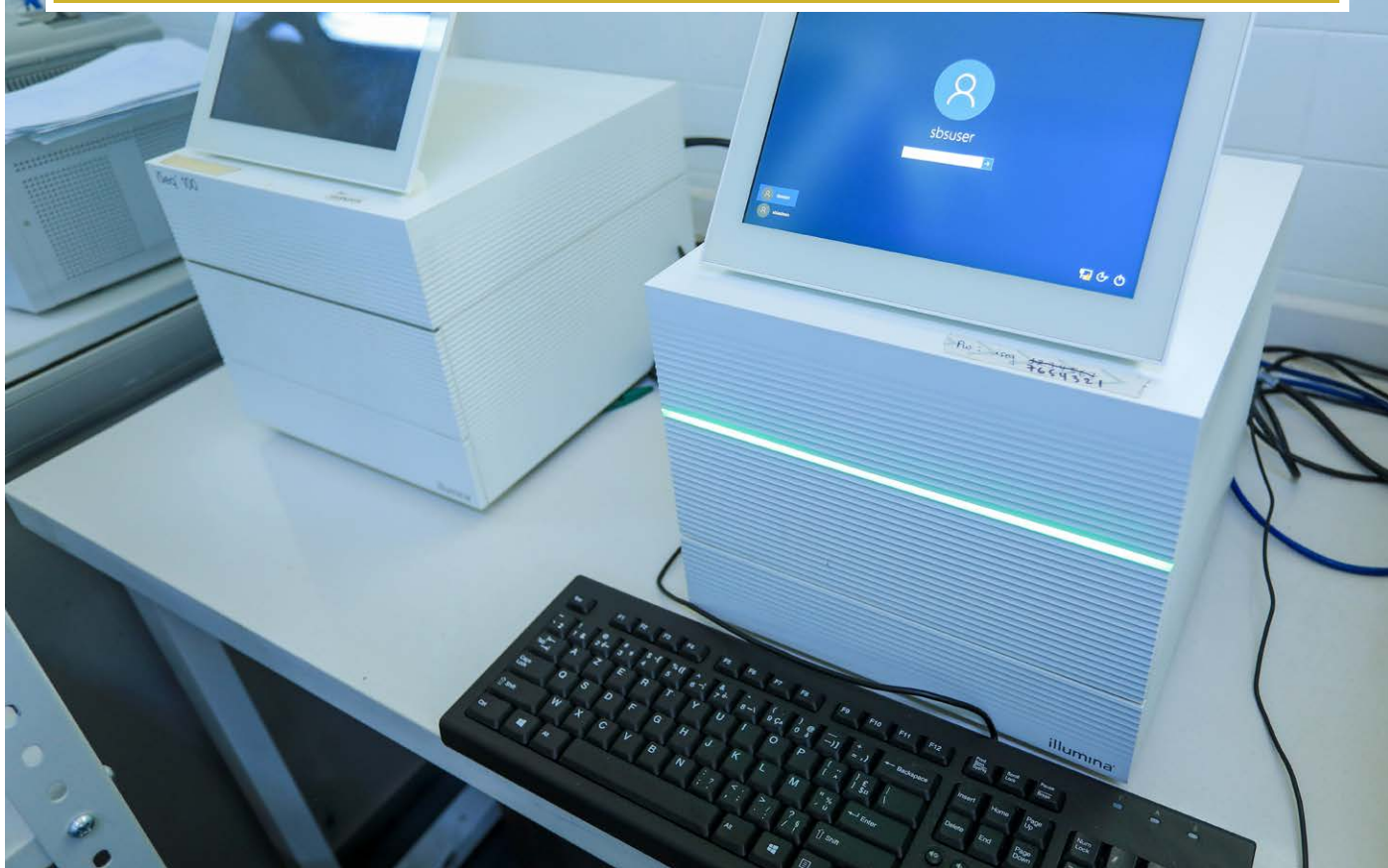
- Accroître la capacité de séquençage SARS-CoV-2,

- Etendre les activités de surveillance génomique SARS-CoV-2 et polio, en province et spécifiquement le Nord-Kivu. Ceci sera précédé par une remise à niveau en ce qui concerne la chaîne de froid et un état des lieux pour l'implémentation des activités ;
- La maîtrise et le déploiement de la détection Polio dans d'autres provinces qui serait un idéal parfait pour raccourcir encore d'avantage le délai de rendu des résultats ;
- Séquencer le génome complet du poliovirus ;
- Etendre le séquençage à la détection des entérovirus et autres virus de la sphère digestive ainsi des maladies évitables par la vaccination.



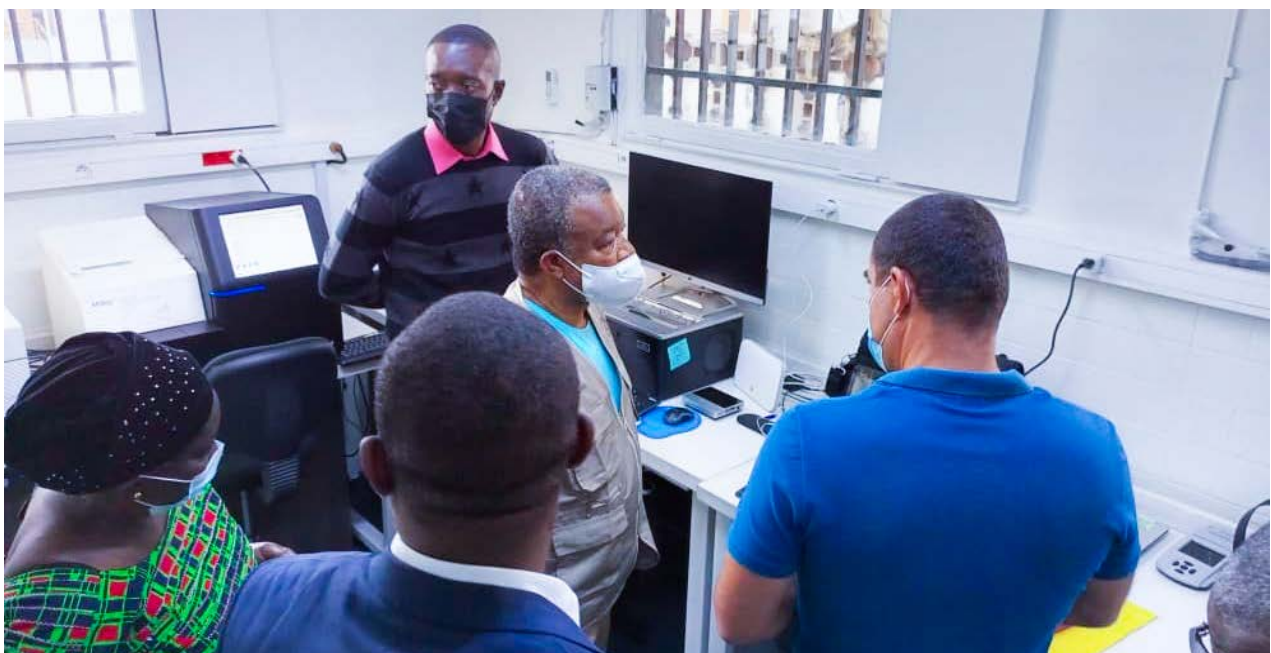
V. Conclusion

Le Laboratoire de séquençage de l'INRB a été d'un atout majeur dans la surveillance des pathogènes à potentiel épidémique au cours de l'année 2021. Malgré les difficultés rencontrées et les défis qui restent à relever, ce laboratoire se veut devenir un Centre d'Excellence Régionale et une référence mondiale dans la recherche en santé publique et ainsi contribuer au bien-être de l'humanité tout entière.



Remerciements

Le Laboratoire de Génomique des Pathogènes adresse ses mots de remerciements à tous ses partenaires, pour leur appui aux différentes activités réalisées en cette année. Nous pensons aux différents Laboratoires Nationaux de Santé Publique (Tchad, RCA, République du Congo et le Cameroun) pour leur collaboration. Nous pensons également à nos Départements collaborateurs de l'INRB (Virologie, Bactériologie) et le Secrétariat Technique de la Riposte contre la Covid-19 en République Démocratique du Congo.



Visite du Professeur Jean-Jacques Muyembe, Directeur Général de l'INRB au laboratoire de Séquençage



Placide Mbala Kingebeni
M.D, MPH, Ph.D.

Responsable du laboratoire de séquençage et Chef du Département d'Epidémiologie Moléculaire à l'Institut National de Recherche Bio-médicale

Sequencing Lab Team



Eddy Lusamaki

Medecin-Chercheur,
Doctorant UM/Trans VIH MI
Ass. CUK/ Microbiologie



Adrienne Amuri

Biologiste Médicale
Assistante CUK/ Sciences
de Bases



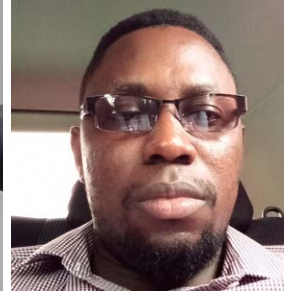
Raphael Lumembe

Medecin-Chercheur
Ass. CUK/ Microbiologie



Jean-Claude Makangara

Medecin-Chercheur
Ass. CUK/ Microbiologie



Emmanuel Lokilo

Data Manager



Gabriel Kabamba

Medecin-Chercheur
Ass. CUK/ Microbiologie



Francisca Muyembe

Medecin-Chercheur
Ass. CUK/ Microbiologie



Gradi Luakanda

Communication Officer



André Citenga

Technicien de Labo



Fanny Kisata

Medecin-Chercheur



Chloé Musuamba

Biologiste Médicale



Ola Mpumbe

Biologiste



Prince Akil

Biologiste



Sifa Kavira

Data Manager



Trésor Kabeya

Medecin-Chercheur



Bibiche Nsunda

Biologiste



Marceline Akonga

Biologiste



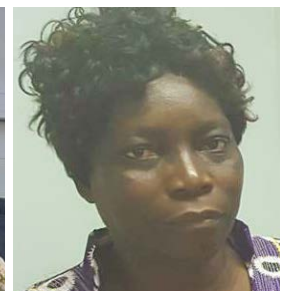
Yogolelo Riziki

Senior Biologiste



Yvonne Lay

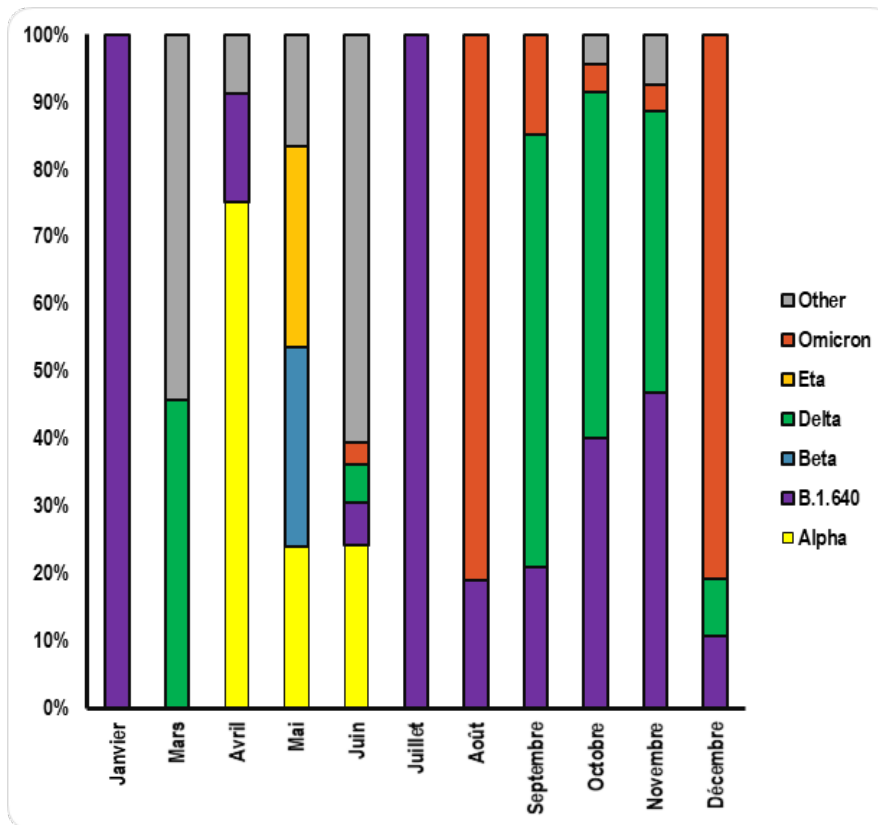
Biologiste Médicale et Epi-
démio-logiste



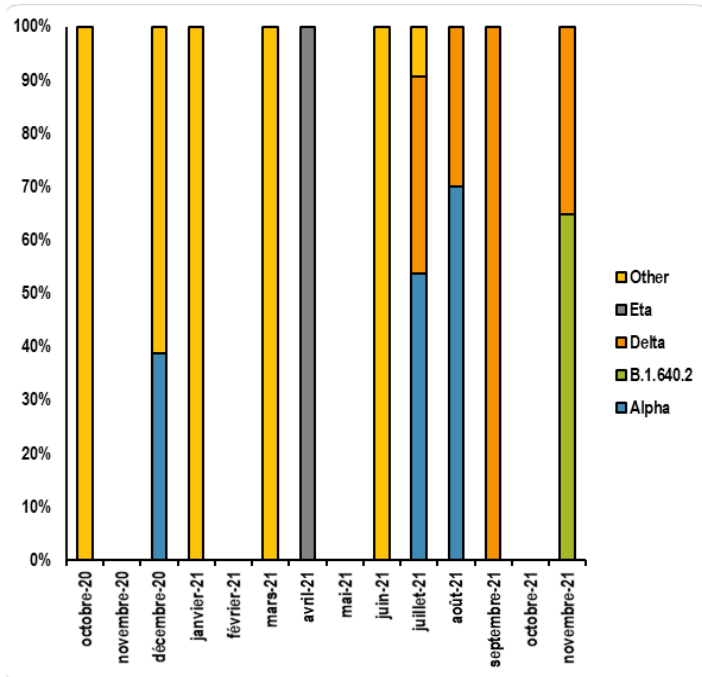
Elisabeth Pukuta

Senior Biologiste

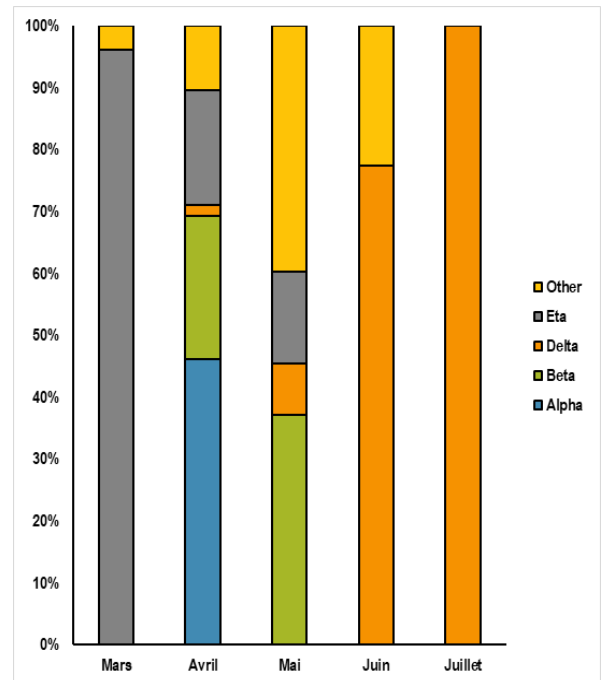
Annexes



République du Congo



Tchad



Cameroun



N° 5345, Avenue de la Démocratie (Ex Des Huileries)
Kinshasa/Gombe-B.P. 1197 Kinshasa 1
République Démocratique du Congo

E-mail: labgenpath@inrb.cd
Twitter: [@labgenpath](https://twitter.com/labgenpath)
Facebook: Laboratoire de Génomique des Pathogènes

