

**CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE
DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME**



Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines
Institut Pasteur, Paris

**LABORATOIRE ASSOCIE AU CNR
*CLOSTRIDIUM DIFFICILE***



Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales
Hôpital St Antoine, Paris

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2009

CNR bactéries anaérobies et Botulisme

Responsable : Michel-R. POPOFF

Responsables adjoints : Philippe BOUVET
Christelle MAZUET

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Responsable: Frédéric BARBUT

Responsable adjoint : Catherine Eckert

Mars 2010

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	4
1.1. Résumé des activités 2009	5
1.2. Equipes	6
1.3. Démarche qualité.....	6
2. ACTIVITES D'EXPERTISES	6
2.1. Capacités techniques du CNR	6
2.2. Capacités techniques du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	8
2.2.1. Techniques.....	8
2.2.2. Collection de souches	9
2.2.3. Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts	9
2.2.4. Techniques en développement.....	9
2.2.5. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	10
2.3. Activités d'expertise en bactériologie anaérobie 2009 (CNR).....	10
2.3.1. Souches d'origine humaine	10
2.3.2. Souches d'origine vétérinaire.....	12
2.3.3. Souches d'origine "industrielle"	13
2.4. Activités d'expertise sur <i>C. difficile</i> (Laboratoire associé)	13
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	14
3.1. Surveillance des infections à <i>C. difficile</i>	14
3.1.1. Réseau de partenaires	14
3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées.....	14
3.1.3. Analyse de la distribution des souches de <i>C. difficile</i> en fonction des critères pertinents et analyse des tendances.....	16
3.1.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (<i>échanges de données, périodicité, analyse commune</i>).....	18
3.2. Surveillance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux	18
3.2.1. Surveillance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR)	18
3.2.2. Surveillance de <i>C. difficile</i> aux anti-infectieux (Laboratoire associé)	19
3.3. Surveillance du botulisme	20
3.3.1. Botulisme humain.....	20
3.3.2. Botulisme agro-alimentaire et environnemental	24
3.3.3. Botulisme animal.....	24
3.4. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....	27
3.5. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens.....	28
3.6. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	29
4. ALERTES	30
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, ET DE CONSEIL	31
5.1. Enseignements	31
5.2. Stagiaires	32
5.3. Diffusion aux professionnels de santé :	32
5.4. Activités d'information, de formation et de conseil	32
6. ACTIVITES DE RECHERCHE.....	33
6.1. Activités de recherche en relation avec le CNR bactéries anaérobies et botulisme	33

6.2.	Activités de recherche du laboratoire associé.....	33
6.3.	Activités de recherche de l'unité bactéries anaérobies et toxines	35
7.	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	35
7.1.	CNR et Unité des Bactéries anaérobies et Toxines	35
7.2.	Publications du Laboratoire associé	38
8.	ANNEXES	41

1. INTRODUCTION

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à l'InVS des affections graves à anaérobies (notamment à *C. difficile*) et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec l'InVS. De plus, des actions plus spécifiques sur la toxine botulique et le diagnostic du botulisme ont été attribuées à ce Centre, notamment la production des antisérums spécifiques permettant la caractérisation des toxines botuliques.

Depuis avril 2007, le laboratoire d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Hôpital St Antoine (responsable, F. Barbut) a été nommé par l'InVS comme laboratoire associé au CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridium difficile*.

Le laboratoire associé a pour principales missions les expertises et le développement des techniques d'identification, de typage et d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de *Clostridium difficile*, ainsi que la contribution à la surveillance et à l'alerte des infections nosocomiales à cette bactérie. Le laboratoire associé participe à la rédaction de recommandations concernant les techniques de prélèvements et de diagnostic ainsi que la rédaction des aspects cliniques des infections dues à *C. difficile* en collaboration avec la D.G.S. et l'InVS qui en assure la diffusion.

Le CNR des Bactéries anaérobies conduit des thèmes de recherche en relation avec ses activités d'expertise, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *C. difficile*.

L'Unité d'Expertises et de Recherche des Bactéries anaérobies et Toxines (BAT), à laquelle est rattaché le CNRAB, a été évaluée et reconduite en 2006. L'Unité BAT a pour principaux thèmes de recherche : *Clostridium botulinum* (régulation de la toxinogénèse et passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale) et les toxines de *Clostridium* modifiant le cytosquelette d'actine ou formant des pores à travers les membranes cellulaires. Elle bénéficie en plus des crédits Institut Pasteur de financement du ministère de la Défense (DGA), du ministère de la Recherche, et de contrats industriels.

L'Unité BAT et le CNRAB ont déménagé en avril-mai 2008 et occupent des nouveaux locaux dans le bâtiment Guérin de l'Institut Pasteur, qui ont fait l'objet d'un contrôle de l'AFSSAPS à propos de la détention, cession, acquisition, et manipulation de microorganismes pathogènes et toxines (MOT) en juin 2008.

1.1. Résumé des activités 2009

Le CNR a participé à la surveillance du botulisme en France en 2009 (209 échantillons de sérums, 48 de selles, 27 agro-alimentaires). Un total de 23 cas de botulisme correspondant à 8 foyers ont été identifiés. Le botulisme de type B est le plus fréquent (7 foyers), mais deux foyers de type A et un de type E ont été également diagnostiqués. Dans trois cas, il s'agissait de botulisme infantile (2 de type A et un de type B), dont deux formes sévères. L'origine du botulisme a été précisée dans trois foyers de type B (jambon dans deux foyers et terrine de sanglier dans un autre). Dans un autre foyer de type B concernant 40 personnes, dont 6 d'entre elles ont révélé de la toxine botulique B dans leur sérum, une terrine à base de viande de sanglier a été incriminée, mais celle-ci n'a pu être analysée par manque d'échantillon. Un poisson fumé d'origine canadienne, acheté en Finlande et consommé en France été suspectée d'être à l'origine du foyer de botulisme de type E (3 personnes).

Le botulisme animal de type C, D ou mosaïque C/D (292 analyses de prélèvements animaux et 105 d'environnement) a été identifié dans, 35 foyers (45 cas) d'élevage aviaire, 23 foyers (32 cas) d'oiseaux sauvages, et chez 9 bovins. Le botulisme animal notamment dans les élevages de volaille reste une situation préoccupante.

La surveillance des affections nosocomiales à *C. difficile* est assurée par le laboratoire associé, le CNR, avec l'appui de 5 laboratoires hospitaliers experts (réseau *Clostridium difficile*). Parmi les 486 souches de *C. difficile* toxinogènes, 119 (24,5%) ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les souches épidémiques 027 se répartissent essentiellement dans le Nord de la France. Les souches de toxinotype V présentent des caractéristiques de virulence similaires aux souches épidémiques 027 (toxines TcdA, TcdB, toxine binaire). Après avoir connu une augmentation inquiétante en 2008 (ayant motivé une alerte auprès des autorités sanitaires, la proportion de souches de toxinotype V semble se stabiliser en 2009.

Le CNR a identifié 168 souches de bactéries anaérobies d'origine humaine et 62 d'origine vétérinaire ou industrielle. Les affections à bactéries anaérobies se manifestent généralement sous forme de cas isolés. Des formes sévères avec mortalité à *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* et *Clostridium sordellii* ont été identifiées. Le syndrome de Lemierre (angine à *Fusobacterium necrophorum* accompagnée de complications vasculaires) est diagnostiqué régulièrement. Des espèces de bactéries anaérobies beaucoup plus rares comme *Leptotrichia goodfellowii*, *Clostridium celerecrescens* et *Solobacterium moorei* ont été retrouvées à l'origine de cas pathologiques.

La surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches de bactéries anaérobies analysées n'a pas présenté d'antibiorésistance particulière. Des antibiorésistances ont été trouvées principalement chez les bactéries du genre *Bacteroides* et chez *C. difficile*.

Des travaux d'expertise ont porté sur la préparation de sérums et d'anticorps monoclonaux neutralisants des toxines botuliques (A à G) à l'aide d'antigènes recombinants, et le géotypage des souches de *C. botulinum*. De nouvelles techniques d'identification et de titrage des toxines botuliques sont en cours de développement.

Les travaux de recherche de l'Unité concerne les toxines botuliques (passage à travers la barrière intestinale, entrée dans les cellules intestinales), caractérisation des toxines de *Clostridium* formant des pores (toxine epsilon de *C. perfringens*) et signalisations cellulaires induites par la toxine létale de *C. sordellii* et toxines de *C. difficile*.

1.2. Equipes

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme

Cadres de recherche (scientifiques, ingénieurs) : 3 (ETP global : 1,5)

Techniciens : 3 (ETP : 3)

Autres : 2 (ETP : 1,575)

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Personnel médical : 4 (ETP global : 1,8)

Personnel non médical : 3 (ETP global : 2,3)

1.3. Démarche qualité

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme

L'ensemble des modes opératoires et des procédures utilisés par le CNR est sous Assurance Qualité, ainsi que la gestion des réactifs, la gestion documentaire et le matériel. Les démarches "Qualité" concernant la métrologie (contrôle des températures des chambres chaudes et froides, congélateurs, réfrigérateurs et bain marie, ainsi que le contrôle de volume des pipettes automatiques) ont également été mises en place.

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Les modes opératoires et les procédures utilisés par le laboratoire associé ont été rédigés et validés

2. ACTIVITES D'EXPERTISES

2.1. CAPACITÉS TECHNIQUES DU CNR

Liste des techniques de référence

Techniques disponibles

- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturaux et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques), analyse des produits du métabolisme et des acides gras cellulaires par chromatographie phase gazeuse.
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique. Ces techniques ont été développées au CNR sur la base de gènes de toxines caractérisées dans notre Unité ou sur des gènes publiés.
- Identification des gènes de *Clostridium botulinum* A, B, E, C et D par PCR temps réel.
- Mise en évidence de toxine létale par le test sur souris et identification par séroneutralisation à l'aide de sérums neutralisants.

- Mise en évidence de cytotoxine à l'aide de culture cellulaire de différents types
- Amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage.
- Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).
- Dosage de certaines toxines par ELISA (comme toxine epsilon de *C. perfringens*, toxine LT de *C. sordellii*, toxines botuliques)

Techniques des marqueurs épidémiologiques de *C. difficile*

1. Technique de PCR-ribotypage qui est actuellement la technique principale permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de différencier les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés.
2. Mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : un protocole d'amplification par PCR d'un fragment de 300 paires de bases (pb) interne au gène *tcdC* (150 bases de part et d'autre de la zone où les différentes délétions surviennent) a été élaboré au CNR et retenu par le réseau de laboratoires experts. Cette technique permet par amplification puis séparation sur un gel haute résolution en s'entourant de témoins, de différencier aisément les différents types de délétion du gène *tcdC* existants : 18 pb et 39pb déjà décrits dans la littérature ainsi qu'une nouvelle délétion de 54pb non encore décrite et identifiée au CNR. Des études récemment publiées ayant identifié d'autres délétions (délétion ponctuelle à la position 117, délétion de 36bp...), le CNR confronté à une délétion du gène détermine systématiquement la séquence du gène *tcdC* en entier.
3. Amplification par PCR de l'opéron codant pour la toxine binaire CDT permettant la mise en évidence d'opérons tronqués et de nouveaux variants.
4. Détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, vancomycine, tétracycline).
5. Détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire, amplification des fragments A3 (gène *tcdA*), et B1 (gène *tcdB*) puis restriction par différentes enzymes pour détermination du toxinotype.

Technique ELISA de détection de la toxine LT de *C. sordellii*

La recherche de toxine LT de *C. sordellii* dans certains échantillons, comme des contenus intestinaux ou selles est occasionnellement demandée. Une technique ELISA basée sur des anticorps spécifiques de LT obtenus chez le lapin et la souris, a été développée.

Liste des marqueurs épidémiologiques

Couples d'amorces pour identifier les gènes de toxines et flagellines suivant:

- gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques
- gènes des toxines de *C. perfringens* : alpha, bêta1, bêta2, iota, entérotoxine, delta, epsilon, cytotoxine TpeL, netB.
- gènes des toxines de *C. difficile* et de marqueurs épidémiologiques (voir ci-dessus)
- gènes des toxines de *C. sordellii* (LT, HT), neuraminidase
- gènes des toxines alpha de *C. septicum*, *C. oedematiens*
- gènes des flagellines de *C. oedematiens*, *C. chauvoei*
- gène de l'entérotoxine de *Bacteroides fragilis*

Couples d'amorces pour autres gènes d'intérêt

- gène codant l'ADN ribosomal 16S
- gènes de l'espace intergénique ARNr 16S – 23S
- gènes de ménage *hsp60*, *hsp70* et *recA*
- gènes de sporulation
- gènes de résistance au métronidazole
- gènes de résistance aux β -lactamines (chez *Bacteroides fragilis*, gènes *cepA*, *cfxA*, *cfiA*...)

Collection de souches, sérums de référence

- Collection de souches de bactéries anaérobies, comprenant les souches types pour chaque espèce. Ces souches sont conservées en azote liquide. Les souches types ainsi que les souches d'intérêt médical sont déposées à la Collection de l'Institut Pasteur. Les souches des espèces nouvellement décrites par le CNR sont également déposées dans une collection internationale étrangère (Culture Collection, University of Göteborg).
- Sérums de référence anti-toxine botulique (voir chapitre "activités d'expertises")
- Sérums anti-toxine *C. difficile* et *C. sordellii*, notamment sérum anti toxine LT de *C. sordellii* qui neutralise spécifiquement la cytotoxicité de *C. difficile* ToxB.
- Sérums anti-toxine de *C. perfringens*, anti-toxine alpha, bêta1, bêta2, epsilon, iota Ia et iota Ib.
- Sérums anti-toxine alpha de *C. septicum*
- Sérum anti-toxine alpha de *C. oedematiens*
- Sérum anti *C. chauvoei*

2.2. CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE ASSOCIE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

2.2.1. Techniques

Dans le cadre du réseau de laboratoires experts mis en place par le CNR des Bactéries Anaérobies et Botulisme pour la surveillance des infections à *C. difficile*, un recueil de protocoles standardisés pour la caractérisation des souches de *C. difficile* a été rédigé par le CNR en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Saint-Antoine (UHLIN, Frédéric Barbut) et adressé à tous les laboratoires experts.

Les techniques de référence disponibles pour la caractérisation des souches de *C. difficile* sont :

- la détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, tétracycline, vancomycine)
- la détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée)
- la détection par PCR des fragments A3 du gène *tcdA* et B1 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B

- la détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes.
- la mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : les différents types de délétion du gène *tcdC* existants (18 pb, 39 ou 36 pb et 54 pb) sont déterminés après amplification puis séparation sur un gel haute résolution et comparaison à des souches témoins.
- le typage par PCR-ribotypage qui est actuellement la technique principale permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de différencier les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés. En plus du PCR-ribotype 027, l'identification de 10 PCR-ribotypes fréquents (001, 002, 014, 017, 020, 053, 077, 078, 106 et 126) en France est maintenant possible par le réseau de laboratoires experts.
- l'amplification de l'ARN 16S et l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) permettent l'identification de *C. difficile*.

2.2.2. Collection de souches

Toute souche de *C. difficile* reçue au laboratoire associée « *Clostridium difficile* » ainsi que les souches de référence sont conservées en milieu glycérolé à -80°C.

L'ADN des souches est conservé à -20°C.

2.2.3. Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts

Les techniques utilisées par tous les laboratoires experts pour caractériser les souches de *C. difficile* reçues sont :

- la détection des fragments A3 et B1 des toxines TcdA et TcdB
- la PCR ribotypage pour identifier la souche 027 (Oui/Non) ainsi que 10 PCR-ribotypes fréquents en France (001, 002, 014, 017, 020, 053, 077, 078, 106 et 126); le caractère clonal ou non peut également être précisé
- l'antibiogramme (érythromycine, clindamycine, moxifloxacine, métronidazole, vancomycine, tétracycline)

Une page web est disponible sur le site du CNR pour informer les centres de santé (hôpitaux, laboratoires...) des modalités de fonctionnement de ce réseau et des procédures à suivre lors d'une infection à *C. difficile* (<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/anaer/frame-anaer-activites.html#collaborations>).

2.2.4. Techniques en développement

La technique du MLVA (« Multilocus Variable-number tandem-repeat Analysis ») a été évaluée au laboratoire associé. Il s'agit d'une technique basée sur la détection, par PCR puis séquençage, de la variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem situés sur plusieurs loci. Cette méthode a montré un pouvoir discriminant élevé mais reste longue et onéreuse (séquençage) ; l'application de cette technique avec détection directe de la taille des fragments amplifiés sur gel d'agarose est en cours de développement.

La mise au point d'une technique de diagnostic rapide des infections à *C. difficile* par **PCR en temps réel** à partir des selles est finie ; la phase d'inclusion l'est également. Les résultats sont en cours d'analyse.

2.2.5. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Une technique de **rep-PCR semi-automatisée** a été évaluée (Diversilab™). Il s'agit d'une méthode de typage rapide, semi automatisée, basée sur l'amplification par PCR de régions spécifiques entre des séquences répétées non codantes REP du génome.

Un **test ELIFA** (enzyme linked immuno-fluorescent assay) pour la détection des toxines de *C. difficile* à partir de colonies a également été évalué (VIDAS® CD A&B; bioMérieux, France).

L'évaluation du **système Xpert® C.difficile (Cepheid)** pour le diagnostic des infections à *C. difficile* (ICD) est terminée.

2.3. ACTIVITES D'EXPERTISE EN BACTERIOLOGIE ANAEROBIE 2009 (CNR)

2.3.1. Souches d'origine humaine

Quarante-six départements métropolitains ont envoyé des souches au CNR : 37 souches (22%) par les laboratoires d'Ile-de-France et 119 (70%) par les laboratoires des autres régions. Les départements ultra-marins envoient également des souches très régulièrement pour identification (12 souches soit 8%).

La distribution des souches de bactéries anaérobies selon les sites d'infections est présentée au Tableau 1. Dans plus de la moitié des cas (68%), l'origine médicale des souches n'a pas été précisée. La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provient principalement d'hémoculture (19%) et de coproculture (7%). Le reste des souches provient de différentes localisations : infections intra-abdominales, infections hépatiques/pancréatiques, suppurations cutanées, musculaires ou osseuses, urologie, gynécologie).

Les souches de bactéries anaérobies identifiées se répartissent en 22 genres différents (Tableau 2). Le pourcentage assez élevé de souches n'ayant pu être étudiées (22% en 2009 soit 37 souches) est assez constant d'une année sur l'autre et reflète bien la difficulté que représente ces souches anaérobies pour nombre de laboratoires (contaminations, problème de viabilité au cours du transport etc...).

Les *Clostridium* sont de loin les plus fréquemment rencontrés (44 %) parmi lesquels les souches de *C. difficile* envoyées pour toxinotypage. Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Fusobacterium-Leptotrichia* (5 %), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Alloscardovia*, *Eubacterium*) (9 %), *Bacteroides-Prevotella* (9%), et divers. Quatre souches n'étaient pas des anaérobies strictes (genres *Abiotrophia*, *Bacillus*, *Campylobacter* et *Streptococcus*)

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 3. Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage et caractérisation de la pathogénicité.

Clostridium perfringens

- Quatre souches de *Clostridium perfringens* isolées de 4 patients d'un foyer de toxi-infection alimentaire ne possédaient pas le gène de l'entérotoxine et étaient même différentes (2 souches sur les 4 étaient dépourvues du gène de la toxine thêta).
- Un jeune enfant né en 2006 a été hospitalisé conscient avec un tableau d'iléus considérable d'origine septique digestive. Puis une bradypnée brutale, une bradycardie à 60 et des marbrures sur l'abdomen sont brutalement apparues. Un premier arrêt cardio-respiratoire a succédé qui a pu être récupéré puis quelques heures plus tard est survenu un deuxième arrêt qui a abouti au décès du patient. Cette souche malgré une virulence importante ne possédait que le gène de la toxine alpha. (toxine thêta trouvée négative).
- Un adulte de 55 ans est décédé à la suite d'un sepsis (isolement d'hémocultures d'une souche de *Clostridium perfringens* de toxinotype α , β 2, θ).

Clostridium septicum

- Une souche de *C. septicum* a été caractérisée. Elle possédait le gène de la toxine alpha et ne présentait pas de résistance particulière aux antibiotiques. Cette souche a été isolée d'hémocultures chez un patient atteint d'un cancer intestinal. *C. septicum* est un agent de myonécrose brutale qui peut se développer à partir de carcinomes intestinaux.

Clostridium sordellii

- Une souche a été isolée à partir d'un ascite chez un patient de 63 ans. Le gène de la toxine létale (LT) n'a pas été détecté (*C. sordellii* perd très rapidement le gène de cette toxine après isolement). La souche possédait le gène de la neuraminidase. *C. sordellii* est un agent de myonécrose qui peut être rapidement fatale.

Syndrome de Lemierre

La recrudescence du syndrome de Lemierre (infection par *Fusobacterium necrophorum* responsable d'angines se compliquant en thrombophlébite des jugulaires et survenant surtout chez des adolescents et des jeunes adultes) est toujours d'actualité. Cette recrudescence observée dans de nombreux pays serait peut-être liée à l'arrêt du traitement systématique des angines par les antibiotiques.

Deux cas très graves ont été enregistrés au CNR en 2009 :

- un premier cas âgé de 43 ans est décédé : début à type de syndrome grippale puis méningo-encéphalite avec œdème cérébral important. Mise en évidence d'un abcès parajugulaire.
- un deuxième cas âgé de 18 ans a dû subir une réanimation lourde : début par une angine douloureuse puis leucopénie et thrombopénie fébrile (recherche de Streptocoque A négative) se compliquant ensuite d'une thrombophlébite des jugulaires. Au début traitement par anti-inflammatoires pendant une semaine puis seulement après, admission au SAMU. Le traitement a nécessité une intubation, ventilation et oxygénation extracorporelle (ECMO).

Apport du séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S).

Le spectaculaire développement des méthodes de biologie moléculaire incluant le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S, ou l'étude d'autres marqueurs moléculaires tels que les gènes *recA*, *rpoB*, *gyrB*, etc., a révolutionné la phylogénie bactérienne apportant en permanence de nouvelles données génétiques. Des bactéries inconnues jusqu'à présent sont régulièrement isolées et caractérisées par ces nouvelles méthodes.

Le recours au séquençage devient de plus en plus souvent une nécessité car les caractères phénotypiques à notre disposition en nombre limité ne permettent souvent pas d'obtenir un diagnostic de certitude. C'est plus particulièrement le cas dans le groupe des bactéries anaérobies facultatives *Actinomyces* et *Bifidobacterium*, et également chez des bactéries retrouvées dans l'environnement (*Clostridium...*).

En 2009 les séquences du gène ADNr 16S ont été déterminées pour 53 souches. Elles ont permis d'identifier 19 genres et 36 espèces parmi lesquelles des espèces non encore individualisées (*Clostridium* sp. (2) *Fusobacterium* sp. (1) ainsi que plusieurs espèces très rares de diagnostic difficile :

Quelques exemples :

- Identification à partir d'un prélèvement vaginal d'une espèce très rare *Alloscardovia omnicolens* (identifiée par la phénotypie *Bifidobacterium* sp.).

- Identification d'un bacille anaérobie sporulé isolé à partir d'une plaie traumatique de la jambe (provoquée par l'entrée d'un éclat métallique provenant d'un coin pour fendre le bois) à une espèce de l'environnement exceptionnellement isolée chez l'homme *Clostridium celerecrescens*.

- Identification d'un bacille anaérobie à Gram négatif isolée d'une hémoculture chez une femme à la suite de l'expulsion d'un fœtus mort-né à 25 semaines d'aménorrhée à une espèce rare *Leptotrichia goodfellowii*.

- Identification d'un bacille à Gram positif non sporulé isolé d'un abcès claviculaire chez un homme de 27 ans à une espèce très rare *Solobacterium moorei*.

- Identification d'un bacille à Gram négatif isolé du liquide céphalorachidien d'un patient de 40 ans éleveur de bovins et d'ovins à *Campylobacter fetus*

- Identification d'un bacille à Gram négatif isolé d'un abcès tubaire chez une jeune femme de 35 ans à *Campylobacter showae*.

2.3.2. Souches d'origine vétérinaire

Les souches d'origine vétérinaire qui nous sont adressées sont essentiellement des *Clostridium*, la majorité étant des *C. perfringens* (70 %) (Tableau 4). Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par le test sur souris et amplification génique.

Les types toxiques de *C. perfringens* responsables d'affections chez les animaux sont généralement différents de ceux rencontrés chez l'homme. Mais, les animaux peuvent être porteurs de types de *C. perfringens* potentiellement pathogènes pour l'homme, comme les souches entérotoxigènes à l'origine des toxi-infections alimentaires. La surveillance de telles souches dans les élevages est un moyen de prévenir les risques.

Le typage des souches toxigènes de *Clostridium* en particulier de *C. perfringens* est réalisé par PCR à partir des séquences des gènes de toxines connus. Les nouveaux gènes de toxines comme les gènes des toxines Beta2 et delta qui ont été identifiés et caractérisés dans notre laboratoire, ainsi que les gènes des toxines NetB et Tpel plus récemment identifiés, sont inclus dans le toxinotypage de routine.

2.3.3. Souches d'origine "industrielle"

Un total de 19 souches, classées "industrielles", c'est à dire non médicales et non vétérinaires, nous ont été adressées par divers laboratoires, tels que laboratoires de collections, laboratoires du secteur agroalimentaire, laboratoires pharmaceutiques, laboratoires départementaux. Ces demandes d'analyse concernaient des confirmations d'identification, toxinotypie, identification de souches toxigènes au cours d'enquêtes épidémiologiques pour préciser l'origine d'intoxications alimentaires botuliques ou dues à des *C. perfringens*, identification de contaminants dans des préparations pharmaceutiques, caractérisation de souches à usage vaccinal ou industriel. Egalement, des souches nous sont adressées par des industriels de l'agro-alimentaire pour évaluer leur éventuelle pathogénicité. Ce sont des souches isolées d'aliments traités par la chaleur, le plus souvent des *Clostridium* thermophiles ou apparentés à *C. botulinum* qui peuvent présenter un risque de santé publique.

2.4. ACTIVITES D'EXPERTISE SUR *C. DIFFICILE* (LABORATOIRE ASSOCIE)

Au cours de l'année 2009, 561 souches ont été reçues par les différents laboratoires experts, contre 617 en 2008 (-9%). Parmi celles-ci, **499** ont été confirmées comme étant du *C. difficile* et analysées ; 13 (2,6%) souches étaient des souches de *C. difficile* non toxigènes et 486 (97,4%) correspondaient effectivement à des souches toxigènes.

- La PCR ribotypage a été effectuée pour 498 souches, permettant d'identifier les souches appartenant au PCR-ribotype 027.

- La recherche des fragments A3 et B1 a été effectuée pour 391 et 386 souches respectivement ; la taille des fragments A3 et B1 a été déterminée pour 14 souches et 13 souches respectivement; le toxinotype a été rendu pour 257 souches (tous effectués par le laboratoire associé).

- La recherche de la toxine binaire a été effectuée pour 434 souches et la recherche d'une forme tronquée (pseudogène) a été recherchée pour 270 souches.

- La recherche d'une délétion dans le gène *tcdC* a été réalisée pour 462 souches.

- Un antibiogramme a été rendu dans 497 cas

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1. Surveillance des infections à *C. difficile*

3.1.1. Réseau de partenaires

Le CNR des Anaérobies (Institut Pasteur, Paris), son laboratoire associé « *Clostridium difficile* » (Hôpital Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI) et un réseau de 5 laboratoires experts (Rouen, Nice, Nancy, Montpellier, Toulouse) couvrant chacun une région, assurent une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées

Le laboratoire associé et les laboratoires experts assurent le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un **signalement** aux autorités sanitaires. Les cas signalés correspondent soit à des formes sévères d'infections (*cf* définitions de la sévérité dans le guide « [Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridium difficile*](#) » InVs 2006) soit à des cas groupés (épidémies). Cependant il est fréquent que les souches reçues n'aient pas fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires. Le motif d'envoi des souches qui doit être précisé sur la feuille d'accompagnement (infection communautaire motivant l'hospitalisation, transfert en réanimation pour infection à *C. difficile*, décès lié à l'infection à *C. difficile* dans les 30 jours, hyperleucocytose >20 000/mm³, traitement chirurgical de l'infection à *C. difficile* épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours noté. Le tableau 1 montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (ces critères ne sont pas exclusifs).

Tableau 1 : Motifs d'envoi des souches de *C. difficile*

Motifs d'envoi (non exclusif)	oui	non	Non renseigné
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	91	206	264
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	26	260	275
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	13	256	292
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	71	206	284
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	9	265	287
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	145	191	225

Le nombre de prélèvements reçus par chaque laboratoire est détaillé dans le tableau 2.

Tableau 2 : Répartition par laboratoire des prélèvements reçus en 2007, 2008 et 2009

Laboratoire	Nombre de prélèvements reçus en 2009	Nombre de prélèvements reçus en 2008	Nombre de prélèvements reçus en 2007
CNR (Institut Pasteur)	6	4	25
Laboratoire associé (Hôpital Saint Antoine)	291	348	475
Laboratoire expert Nancy	10	21	35
Laboratoire expert Montpellier	27	28	35
Laboratoire expert Toulouse	63	59	18
Laboratoire expert Rouen	96	77	75
Laboratoire expert Nice	68	80	117
Total	561	617	780

La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la figure 1.

Le plus grand nombre de demandes observés dans certains départements est en relation avec le nombre et l'importance de Centres Hospitaliers dans ces régions et aussi avec l'intérêt particulier porté par certains microbiologistes aux bactéries anaérobies.

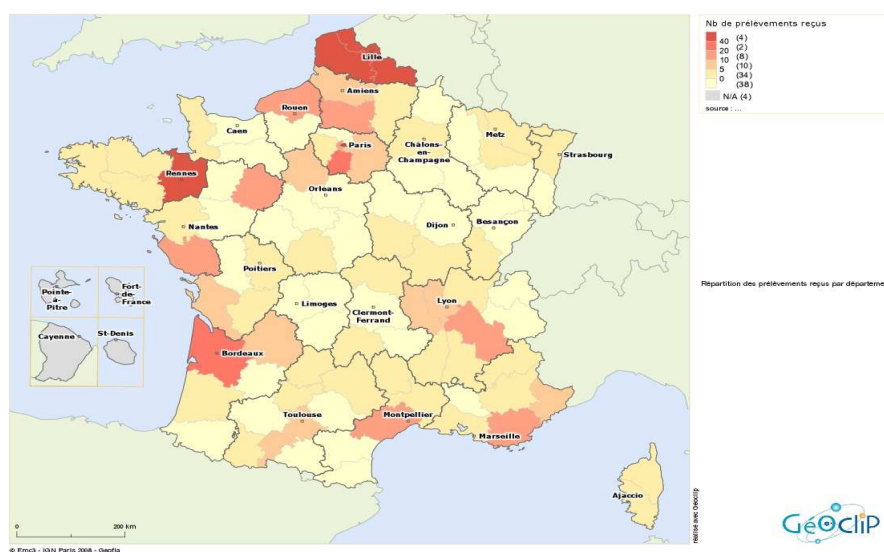


Figure 1 : Représentation schématique de la répartition des prélèvements envoyés par département

3.1.3. Analyse de la distribution des souches de *C. difficile* en fonction des critères pertinents et analyse des tendances

Les 476 souches de *C. difficile* toxinogènes pour lesquelles l'origine du prélèvement a été renseignée provenaient de selles à l'exception de 1 souche qui provenait d'une biopsie rectale. Dans 10 cas l'origine du prélèvement de la souche toxinogène n'était pas renseignée.

291 (61%) souches de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes, 186 (39%) chez des hommes. Le sexe n'est pas renseigné dans 9 cas.

L'âge des patients, renseigné dans 476 cas, chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représenté dans la figure 2. **Au total, 76,3% des patients ont plus de 65 ans.**

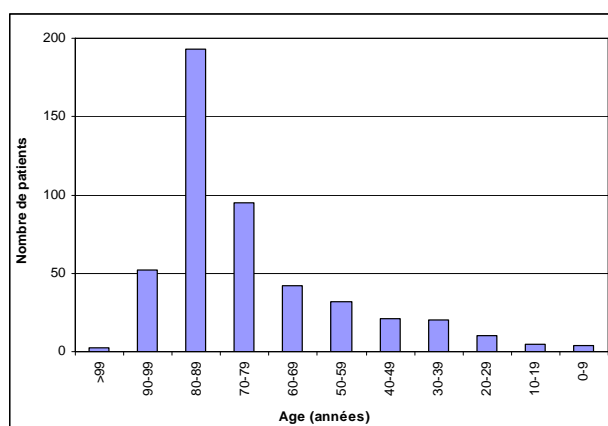


Figure 2 : Représentation schématique du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxinogène a été isolée en fonction de l'âge.

Parmi les 486 souches de *C. difficile* toxinogènes, 119 (24,5%) ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027 ; parmi celles-ci, 6 souches sont des PCR-ribotype 027 dits « historiques » c'est-à-dire sensibles à l'érythromycine et à la moxifloxacine (souches isolées en Aveyron, Haute-Garonne, Morbihan, Seine-et-Marne et Somme). Les souches épidémiques 027 ont été isolées dans l'Aisne, en Gironde, en Ile et Vilaine, dans le Nord, le Pas-de-Calais, à Paris, dans l'Essonne et le Val de Marne (figure 3). La plupart des souches 027 restent toujours localisées dans la partie Nord de la France.

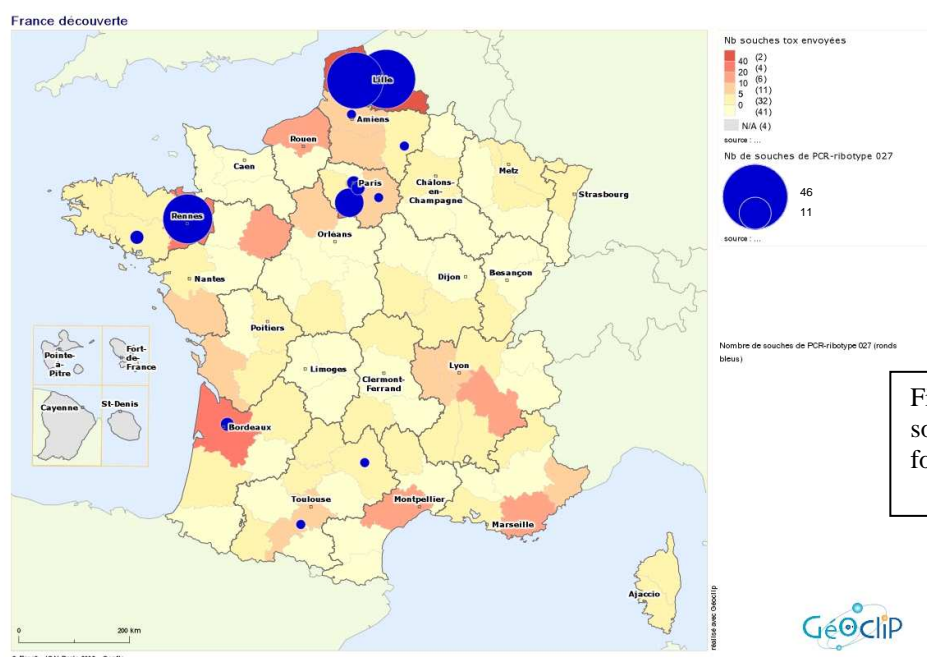


Figure 3 : Répartition des souches PCRribotype 027 en fonction des départements.

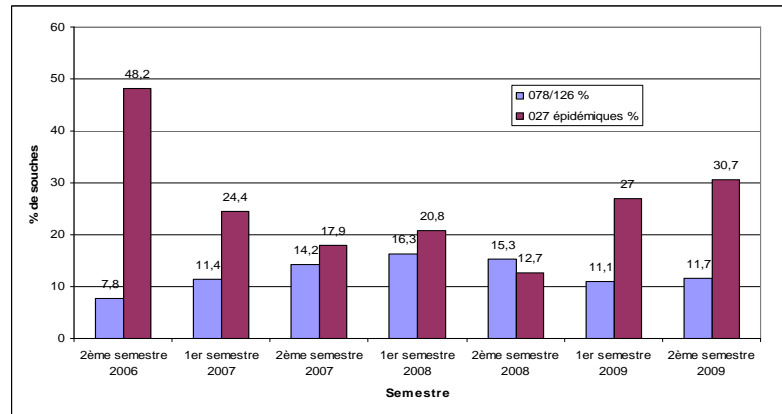
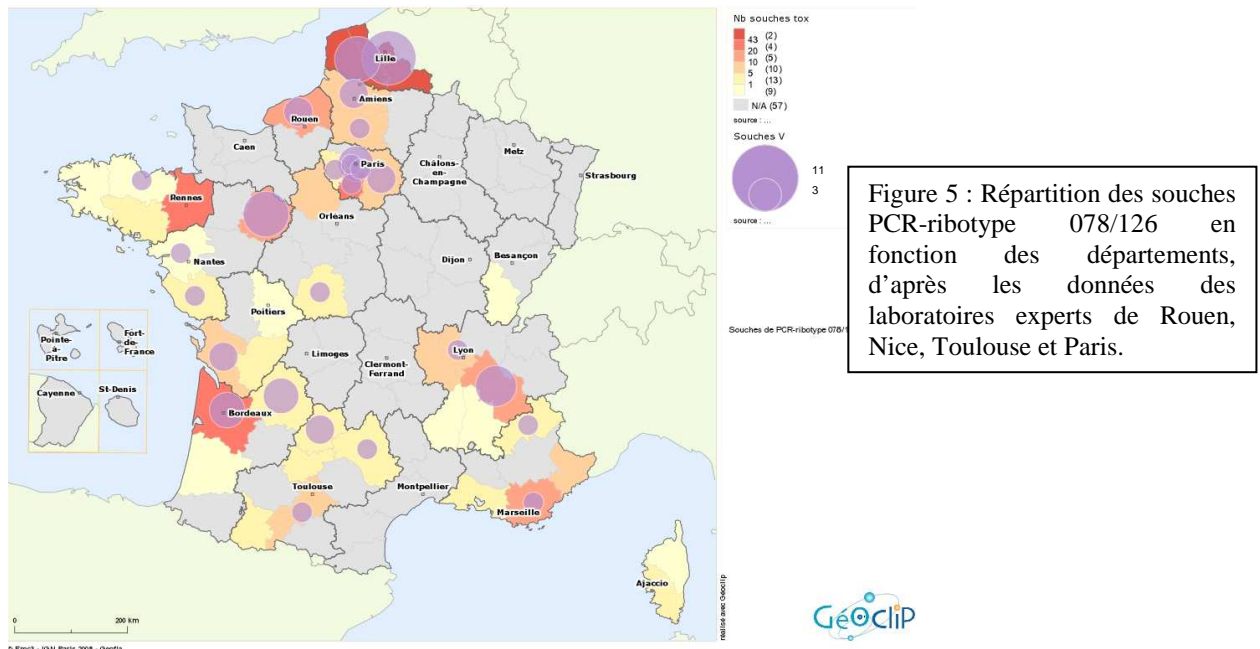


Figure 4 : Evolution de la fréquence d'isolement des souches épidémiques 027 et des souches de PCR-ribotype 078/126 (en %), d'après les données des laboratoires experts de Rouen, Nice et Paris

L'évolution des souches de toxinotype V (toxine binaire positive, délétion dans le gène *tcdC* de -39 pb) est représentée sur la figure 4. Les souches de toxinotype V présentent des caractéristiques de virulence similaires aux souches épidémiques 027 : présence des gènes codant pour les toxines A (*tcdA*) et B (*tcdB*) et des gènes codant pour la toxine binaire ou ADP-ribosyl transférase spécifique de l'actine (*cdtA* et *cdtB*). Les souches de toxinotype V sont également caractérisées par la présence d'une délétion de 39 pb et d'un codon stop dans le gène régulateur *tcdC*. Elles appartiennent le plus souvent au PCR-ribotype 078/126.

Entre le 2^{ème} semestre 2006 et le 2^{ème} semestre 2009, le pourcentage de souches de toxinotype V est passé de 7,8% à 11,7% d'après les données des laboratoires experts de Nice, Rouen et Paris. Le laboratoire expert de Toulouse a détecté 12 souches de PCR-ribotype 078/126 parmi les 60 souches toxinogènes reçues en 2009 (20%). D'après les données des laboratoires experts de Rouen, Nice, Toulouse et Paris, ces souches sont retrouvées dans la plupart des régions (figure 5). Après avoir connu une augmentation inquiétante en 2008 (ayant motivé une alerte auprès des autorités sanitaires, la proportion de souches de toxinotype V semble se stabiliser en 2009.

En revanche, le nombre de souches de PCR-ribotype 027 (toxinotype III) réaugmente (figure 4).



3.1.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé (https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf). Ce site permet à chaque laboratoire expert ou associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats. Ce site est consultable dans sa totalité par l'Institut de Veille Sanitaire, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les CCLIN, les DDASS et les laboratoires experts ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site a été modifié au cours de l'année 2009 permettant d'enregistrer de nouveaux paramètres (ajout des diamètres de la vancomycine et de la tétracycline, identification possible de plusieurs PCR-ribotypes, précision du type d'établissement et de la ville).

L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à l'InVS.

Les demandes de renseignements ou de conseils se font directement par téléphone ou e-mail auprès des responsables du CNR.

Le CNR et son laboratoire associé ont réuni le 05 mars 2009 à Paris les représentants des laboratoires experts et de l'InVS.

L'InVS, les 5 CCLIN et le laboratoire associé *C. difficile* ont lancé en 2009 une surveillance nationale prospective multicentrique des infections à *C. difficile* (ICD RAISIN) afin de connaître l'incidence des infections en France, de déterminer la répartition des différents PCR ribotypes et les méthodes diagnostiques utilisées dans les laboratoires.

3.2. SURVEILLANCE DES BACTERIES ANAEROBIES AUX ANTI-INFECTIEUX

3.2.1. Surveillance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR)

Les laboratoires ne nous demandent que très rarement la réalisation d'un antibiogramme. Dix-neuf antibiogrammes ont été réalisés au cours de l'année 2009. En effet, les bactéries anaérobies ne présentent généralement pas de résistance aux anti-infectieux, le métronidazole étant une thérapeutique de choix contre les affections à bactéries anaérobies.

Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta-lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

En 2009, parallèlement aux tests phénotypiques nous avons effectué sur **61 souches** un antibiogramme standard selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les résultats sont repris dans le tableau 5.

Amoxicilline et association amoxicilline/ac. clavulanique

Cette année, les seules résistances observées ont été classiquement retrouvées dans le genre *Bacteroides*.

Imipénème

Une souche de *Bacteroides fragilis* était résistante.

Moxifloxacine

Deux souches étaient résistantes : *C. difficile* (R) et *Eggerthella lenta* (I).

La résistance à la moxifloxacine est fréquente chez *Clostridium difficile* (voir l'antibiogramme spécifique à cette espèce effectué dans le cadre de la surveillance de l'émergence éventuelle de clones épidémiques – tableau 5). Quinze souches sur 29 testées (51,7%) présentaient une sensibilité intermédiaire ou une résistance à cet antibiotique.

Clindamycine

Des résistances à la clindamycine ont été trouvées chez une souche d'*Actinomyces*, cinq *Bacteroides*, cinq *Clostridium* et une *Eggerthella lenta*.

Métronidazole

Aucune résistance au métronidazole autres que celles trouvées chez des espèces normalement résistantes n'a été trouvée.

Chez quelques souches de *Clostridium difficile* reçues au CNR, le rapport des souches résistantes / souches étudiées était : pour la clindamycine (23/29), pour l'érythromycine (13/29), pour la moxifloxacine (15/29), pour le métronidazole (0/29), pour la tétracycline (2/18) et pour la vancomycine (0/15) (tableau 5).

3.2.2. Surveillance de *C. difficile* aux anti-infectieux (Laboratoire associé)

La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, au métronidazole, à la tétracycline et à la vancomycine a été testée pour 484, 484, 480, 484, 121 et 139 souches de *C. difficile* toxigènes respectivement, par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques). Le plus faible nombre de souches testées pour la vancomycine et la tétracycline s'explique par le fait que ces antibiotiques n'ont été ajoutés à l'antibiogramme qu'au cours de l'été 2009.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22mm) de 43,8%, pour la clindamycine (diamètre < 15mm) de 79,5%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21mm) de 43,1% ; aucune souche ne présentait de résistance au métronidazole (diamètre < 21mm), ni à la vancomycine (diamètre < 17mm). Une souche de *C. difficile* non productrice de toxines présentait un diamètre au métronidazole à 19 mm. En 2008, les taux de résistance étaient respectivement de 41,3%, 81,9%, 38,9% et aucune souche n'était résistante au métronidazole. La vancomycine et la tétracycline n'étaient pas testées en 2008.

3.3.SURVEILLANCE DU BOTULISME

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2009 est le suivant:

Botulisme humain

- sérums (recherche de toxine botulique)	209
- selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>)	48
- sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	27

Echantillons agro-alimentaires

- en relation avec une suspicion de botulisme humain	17
- autres	22

Botulisme animal

- sérums et contenus intestinaux	292
----------------------------------	-----

Echantillons d'aliment pour animaux

et échantillons environnementaux	105
---	------------

Total	720
--------------	------------

3.3.1.Botulisme humain

Réseau de partenaires

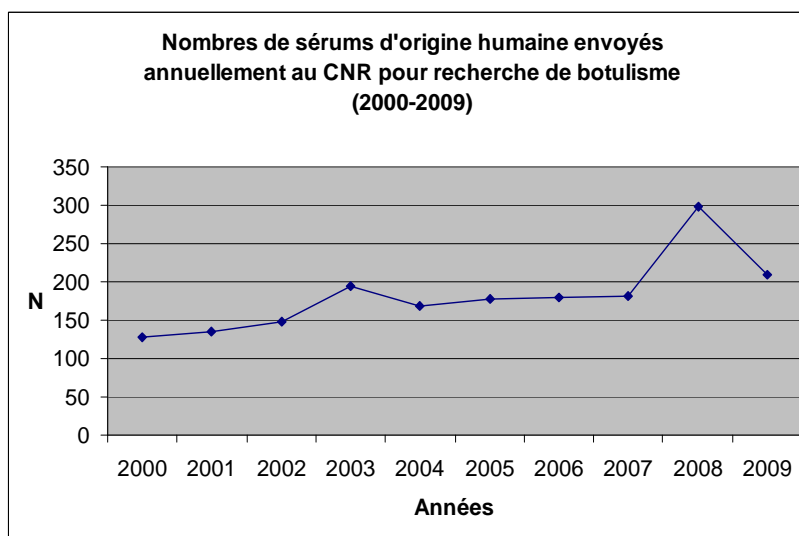
Les échantillons, en majorité sérums humains et plus occasionnellement selles, nous sont adressés par l'intermédiaire des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés sur demande du clinicien ou praticien traitant dans le cadre d'une suspicion de botulisme clinique ou pour étayer un diagnostic différentiel d'un syndrome neurologique de paralysie flasque descendante.

La répartition des partenaires s'étend sur toute la France. Certaines demandes d'analyse de botulisme proviennent de l'étranger.

Lors d'alerte botulisme, le bureau "alerte" de la DGS et la DGAL coordonnent des conférences téléphoniques entre les principaux partenaires (hospitaliers, InVS, DASS, Services vétérinaires, AFSSA, AFSSAPS, ..) y compris le CNR qui participe activement à la gestion de la situation. Il faut souligner la coordination entre l'InVS et le CNR sur la gestion des foyers de botulisme et les enquêtes pour en déterminer l'origine.

Analyse des cas de botulisme humain

Un total de 209 sérums et de 48 selles ou liquides gastriques de patients suspects de botulisme ont fait l'objet d'identification de botulisme en 2009 (Tableau 6).



La présence de toxine botulique est recherchée dans le sérum ainsi que dans les échantillons d'aliment par le test de létalité sur souris et de séro-protection à l'aide d'anticorps neutralisants spécifiques. Les tests *in vitro*, tels que ELISA proposés pour la recherche de toxine botulique ont une sensibilité inférieure à celle du test sur souris, et ils ne sont pas utilisables pour ce type d'échantillons. D'autres tests *in vitro*, comme le vesicle chip mis au point par l'équipe de M. Seagar à Marseille et avec qui nous collaborons, ont une sensibilité proche du test sur souris pour le type B. Dans la mesure où les échantillons de sérum sont en volume suffisant, nous mettons en route les deux types de tests pour évaluer cette nouvelle méthodologie dans les conditions d'analyses de routine. L'adaptation de ce type de test pour les toxines botuliques de type A et E est en cours.

C. botulinum est recherché dans les selles et les aliments suspects par culture d'enrichissement amplification génique, et caractérisation des toxines produites selon un protocole développé au laboratoire. La détection de *C. botulinum* directement dans l'échantillon par extraction d'ADN et PCR en temps réel a été développée. Etant donné que la sensibilité de cette approche n'est pas toujours suffisante elle est dans tous les cas accompagnée de la recherche de *C. botulinum* après culture d'enrichissement. L'isolement des souches de *C. botulinum* est entrepris pour chaque échantillon positif de façon à obtenir une caractérisation détaillée des souches et du type de botulisme en cause.

Au cours de l'année 2009, 23 cas de botulisme (10 foyers) ont été identifiés et 3 cas (3 foyers) ont été suspectés (présence d'un titre faible en toxine dans le sérum et signes cliniques des patients évocateurs d'un botulisme) (Tableau 6). L'incidence du botulisme en 2009 en France est double de celle de l'année précédente et est comparable à celle des années 2005 et antérieures:

2009	23 cas, 3 suspicions (13 foyers)
2008	8 cas, 6 suspicions (11 foyers)
2007	11 cas, 2 suspicions (8 foyers)
2006	8 cas, 2 suspicions (7 foyers)
2005	25 cas (20 foyers)
2004	19 cas (15 foyers)
2003	41 cas (23 foyers)
2002	21 cas (14 foyers)

Si le botulisme humain est une maladie rare, il reste une affection très sévère justifiant une surveillance attentive de la part des autorités médicales et sanitaires. En 2009, au moins 3 cas (3 foyers) ont évolué sous une forme très grave de botulisme.

Dans la majorité des foyers et des cas, il s'agissait de botulisme de type B (7 foyers, 18 cas), le botulisme de type A (2 foyers, 2 cas) et de type E (1 foyer, 1 cas) étaient moins représentés.

Les deux cas de botulisme de type A étaient des botulismes infantiles (nourrisson fille de 2.5 mois dans le département 31, et nourrisson fille de 6 mois dans le département 38. Dans les deux cas, le botulisme a évolué sur une forme sévère.

Dans le cas du botulisme infantile dans le département 38, la toxine botulique de type A a été retrouvée dans le sérum (2 DL/ml) et dans les selles (1000 DL/g) au 2^{ème}-3^{ème} jour après l'apparition des symptômes. *C. botulinum* de type A a été détecté dans les selles et une souche a été isolée (sous type A1). Cette enfant avait reçu du miel en petites quantités, mais l'échantillon de miel analysé n'a pas montré la présence de ce pathogène.

Le botulisme infantile dans le département 31 a été diagnostiqué assez tardivement (une dizaine de jours après l'apparition des symptômes) du fait d'une évocation tardive de botulisme par les cliniciens du Centre Hospitalier. La toxine botulique A n'a pas été détectée dans le sérum, mais uniquement dans les selles (20 DL/g). *C. botulinum* de type A a été détecté et isolé des selles. Cette enfant a été nourrie exclusivement au sein et n'a pas reçu de miel.

Un troisième cas de botulisme infantile a été identifié dans le département 33. Il s'agissait d'une enfant de 18 mois ayant présenté un tableau clinique modéré de botulisme. La recherche de toxine botulique dans les échantillons de sérum, selles et liquide gastrique a été négative. *C. botulinum* de type B a été retrouvé dans un deuxième échantillon de selles après une culture d'enrichissement prolongé (6 jours). C'est à dire que *C. botulinum* B était présent à un faible taux dans le tube digestif de cet enfant avec production de quantité limite de toxine rendant compte de l'évolution chronique et relativement bénigne de ce cas. Des échantillons d'aliments à risque (conserves familiales de légumes: chou fleur, épinards, carottes) se sont révélés négatifs dans la recherche de *C. botulinum*.

Deux foyers de botulisme de type B ont eu pour origine la consommation d'un jambon de préparation artisanale. L'un des foyers dans le département 95 a concerné trois personnes d'une même famille (43, 42 et 11 ans). La toxine botulique B a été détectée dans le sérum de deux de ces personnes à un titre de 2 DL/ml (enfant de 11 ans) et 16 DL/ml (personne de 32 ans). Le sérum de la troisième personne contenait un titre faible en toxine (< 1 DL/ml) et le faible volume d'échantillon de ce sérum que nous avons reçu (environ 1 ml) n'a pas permis de réaliser le typage. Un échantillon de liquide gastrique de l'enfant de 11 ans s'est révélé négatif pour la recherche de toxine botulique et de *C. botulinum*. Le jambon contenait de la toxine botulique de type B (40 DL/g) ainsi qu'une souche de *C. botulinum* type B.

Le deuxième foyer de botulisme de type B dû à la consommation d'un jambon a concerné trois personnes (49, 48 et 27 ans) d'une même famille également dans le département 69. La toxine botulique B a été retrouvée à un titre de 8 DL/ml dans le sérum de la personne de 27 ans. La toxine botulique a été mise en évidence dans le sérum des deux autres personnes, mais du fait d'un volume insuffisant d'échantillon le titrage précis (environ 1 DL/ml et > 1 DL/ml) ainsi que le typage n'ont pas pu être réalisés. Le jambon, de préparation familiale, contenait de la toxine botulique de type B (147 DL/g) ainsi qu'une souche de *C. botulinum* de type B.

L'origine de botulisme a été identifié dans un troisième foyer de botulisme de type B concernant deux personnes (37 et 36 ans) dans le département 77. La toxine botulique de type B a été détecté dans le sérum de chacune de ces personnes à un titre de 2 DL/ml. Deux

échantillons de terrine de sanglier de préparation familiale qui avaient été consommés par les patients, contenaient de la toxine botulique de type B (20 et 2000 DL/g, respectivement). *C. botulinum* B a été détecté dans ces échantillons d'aliment par culture d'enrichissement et PCR, mais aucune souche toxique de *C. botulinum* n'a été isolée. Ceci est probablement dû au fait que le gène de la neurotoxine botulique B soit localisé sur un élément génétique mobile. En effet, il a été montré que certaines souche de type B possèdent leur gène de toxine botulique sur un plasmide de grande taille et qu'elles sont relativement instables par perte de ce plasmide.

Un autre foyer de botulisme de type B est probablement dû à la consommation d'une terrine de sanglier lors d'un repas de chasseurs réunissant 40 personnes dans le département de l'Aube (10). Cinq personnes (33, 33, 30, 50, 59 ans) ont développé un forme bénigne de botulisme et une sixième personne (57 ans) a nécessité une hospitalisation, mais de courte durée. La toxine botulique de type B a été détecté dans le sérum de ces six personnes à un titre de 2 DL/ml chez une personne, 1 DL/ml chez 2 personnes et inférieur à 1 DL/ml chez les trois autres. L'analyse des selles de deux de ces personnes a été négative pour la recherche de toxine botulique et de *C. botulinum*. L'analyse de la terrine de sanglier incriminé n'a pas pu être réalisée, car aucun échantillon de cet aliment n'a été récupéré.

Un cas isolé de botulisme de type B s'est déclaré chez une personne de 49 ans dans le département du Doubs. La toxine botulique de type B a été détecté dans son sérum à un titre de 16 DL/ml. Des échantillons d'aliments suspects de préparation familiale (charcuterie : saucisses) se sont révélés négatifs pour la recherche de toxine botulique et de *C. botulinum*.

Un foyer de botulisme de type B comprenant deux personnes de 68 ans chacune et de la même famille a été identifié dans le département de la Sarthe. La toxine botulique de type B a été identifié dans le sérum de chacune de ces personnes à un titre de 1 DL/ml et < 1 DL/ml respectivement. Les selles d'un de ces patients contenait de la toxine botulique de type B (200 DL/g) et une souche de *C. botulinum* de type B a été isolée. Une conserve familiale d'asperges a été suspectée, mais deux échantillons de cet aliment n'ont pas révélé la présence de toxine botulique ni de *C. botulinum*.

Un foyer de botulisme de type E a concerné trois personnes d'une même famille, le père (52 ans) la mère et un enfant de 11 ans dans le département des Alpes maritimes. Le père a été hospitalisée en réanimation avec ventilation assistée. La toxine botulique de type E a été détectée dans son sérum (8 DL/ml) ainsi que dans un échantillon de liquide gastrique (environ 20 DL/ml). *C. botulinum* de type E a été détecté et isolé de l'échantillon de liquide gastrique. Le sérum des deux autres personnes qui ont développé une forme très légère de botulisme n'a pas révélé la présence de toxine botulique. Une conserve industrielle de poisson fumé et emballé sous vide, fabriqué au Canada, acheté en Finlande au cours d'un voyage de cette famille dans ce pays, et consommé en France a été suspectée d'être à l'origine de ce foyer. Aucun échantillon de cet aliment à risque n'a été conservé pour analyse. Ce foyer de botulisme de type E inhabituel en France reflète l'implication de la multiplication des échanges commerciaux entre continents sur la dissémination d'affection d'origine tellurique.

Dans trois autres cas isolés (Tableau 6), un diagnostic de botulisme n'a pas pu être confirmé du fait d'une présence de toxicité à un titre faible dans le sérum rendant les résultats de neutralisation par les sérums antibotuliques ininterprétables et des volumes d'échantillon en quantité insuffisante limitant les essais de recherche de toxine.

De nombreuses demandes d'analyse de botulisme sont adressées au CNR dans le cadre d'un diagnostic différentiel de paralysie flasque descendante. Le test de recherche de toxine botulique par injection de sérum du malade chez la souris permet aussi de détecter une activité toxique liée à la présence d'auto-anticorps impliqués dans les neuropathies auto-immunes. Dans ce cas, l'activité toxique chez la souris se traduisant par une insuffisance respiratoire associée ou non à une paralysie musculaire plus ou moins prononcée n'est pas neutralisable par les sérums spécifiques anti-toxines botuliques. Ceci se rencontre dans les neuropathies auto-immunes (syndrome de Guillain-Barré, Miller-Fisher ..., auto-anticorps anti-gangliosides) ou la myasthénie (auto-anticorps anti-récepteur de l'acétyl-choline). En 2009, huit cas ont pu ainsi être réorientés vers un diagnostic de neuropathie auto-immune (syndrome de Guillain Barré notamment, myasthénie). Dans 10 autres cas, il s'agissait de neuropathie avec paralysie d'origine indéterminée dont deux probablement suite à un accident vasculaire cérébral.

Recherche et titrage d'anticorps anti-toxine botulique A

La toxine botulique A est de plus en plus employée pour traiter des myoclonies telles que blépharospasme, torticolis, paralysie hémifaciale, autres dystonies out troubles dysautonomiques. Il faut noter que les indications d'utilisation de toxine botulique s'élargissent de plus en plus. Cependant, certains sujets acquièrent une résistance à ce traitement après plusieurs injections de toxine botulique.

Dans certains cas, cette résistance est attribuée à l'apparition d'anticorps neutralisants au cours du traitement.

En 2009, nous avons analysé 27 sérums de malades traités à la toxine botulique pour la recherche d'anticorps neutralisants.

Des anticorps neutralisants anti-toxine botulique A ont été détectés dans 7 sérums, 4 à un titre faible et 3 à un titre relativement élevé; Chez un patient, des anticorps neutralisants ont été détectés à la fois vis à vis de la toxine botulique de type A et de type B

3.3.2. Botulisme agro-alimentaire et environnemental

En plus des analyses d'aliment directement suspecté dans des cas de botulisme humain (voir précédemment), des échantillons agro-alimentaires nous ont été adressés pour recherche de botulisme.

Il s'agissait de contrôles de l'industrie agro-alimentaire. Aucun des 22 échantillons n'a révélé la présence de *C. botulinum*.

Des recherches de botulisme ont également été réalisées sur des aliments pour animaux soit pour identifier l'origine de foyers de botulisme animal, notamment en élevage aviaire, soit pour des contrôles d'exportation. Parmi les 103 échantillons analysés, aucun n'a été trouvé positif. Un seul échantillon d'environnement a été adressé et il était négatif.

3.3.3. Botulisme animal

Un total de 277 analyses a été réalisé (235 en 2008), correspondant à des suspicions de botulisme animal, toutes espèces confondues (Tableau 7).

Réseau de partenaires

Les demandes de diagnostic de botulisme animal nous sont adressées par les Laboratoires vétérinaires départementaux, les Laboratoires vétérinaires privés ou de coopératives agricoles, des Vétérinaire praticiens, des Fédération d'élevage ou de chasseurs, l'AFSSA.

Botulisme bovin

Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. Il faut noter que cette affection est essentiellement localisée en Bretagne, Normandie et pays de la Loire. Cependant depuis ces dernières années, des foyers de botulisme bovin sont régulièrement détectés dans d'autres régions comme dans le département du Pas de Calais.

La forte densité des animaux d'élevage dans ces départements est favorable à la persistance de cette maladie. Un des principaux facteurs de risques concerne la proximité d'élevages industriels de volailles avec ceux de bovins, et en particulier les épandages de lisiers de volailles sur les pâtures destinées aux bovins. Contrairement aux bovins, les poulets sont résistants au botulisme de type D, mais ils peuvent être des porteurs sains et contaminer les lisiers. Ces derniers ainsi que les cadavres d'oiseaux botuliques constituent les principales matières infectieuses ou toxiques.

Un total de 59 échantillons correspondant à 45 bovins (42 foyers) ont été analysés en 2009. Ces chiffres sont comparables à ceux de 2008. Neuf cas de botulisme bovin (7 foyers) ont été identifiés: 4 cas de type C, 3 de type C/D et 2 de type indéterminé du fait d'une activité toxique faible dans ces échantillons ne pouvant pas être typée avec précision. Dans quatre de ces cas (2 de type C et 2 de type indéterminé) l'identification a été réalisée par mise en évidence de la toxine dans des échantillons de sérum. La présence d'une toxémie botulique est l'examen biologique le plus probant d'un botulisme. Cependant, la toxine botulique n'est détectable dans le sérum que chez 25 à 30% des bovins botuliques seulement. Il est donc possible que des résultats de recherche de toxine botulique dans le sérum de bovins soient faussement négatives ou ne reflètent pas un botulisme clinique. Pour cette raison, des analyses de contenus intestinaux sont réalisées, car chez les animaux le botulisme résulte le plus souvent d'une toxi-infection dont le site initial est l'intestin grêle. Ainsi, la toxine botulique et *C. botulinum* peuvent être recherchés dans le contenu intestinal. *C. botulinum* est mis en évidence après culture d'enrichissement par toxicité et par PCR. L'amélioration de la méthode PCR pour les types C et D (développement d'une méthode de PCR en temps réel et sélection d'amorces appropriées) a rendu plus efficace cette méthodologie dans le diagnostic du botulisme animal. Parmi 17 échantillons de contenu intestinal, quatre se sont révélés positifs pour la recherche de *C. botulinum* à la fois par mise en évidence de toxicité et par PCR. Dans deux cas, il s'agissait de type C et dans deux autres cas de type D. Il faut noter qu'étant donné la très proche communauté antigénique entre les toxines botuliques de type C et D, la séroneutralisation ne permet pas toujours d'identifier ces deux types de toxine. Dans trois cas, la séroneutralisation a conclu par un type C ou D et la PCR a permis de préciser le typage (un type C et deux types D).

Jusqu'à présent, le botulisme identifié chez les bovins en France est de type C ou D et ne correspond pas à un type de botulisme habituellement rencontré chez l'homme (A, B, ou E). Le nombre de ces analyses est équivalent à celui de 2008 (63 échantillons) et en augmentation par rapport aux années précédentes (18 échantillons en 2007, 35 en 2006, 37 en 2005, 41 en 2004, 25 en 2003, 28 en 2002, 78 en 2001). Ces données reflètent davantage les préoccupations des partenaires de la filière bovine sur le diagnostic du botulisme que des valeurs épidémiologiques réelles. Nous intervenons essentiellement à la demande de certains

laboratoires, pour expertiser des cas litigieux, ce type de diagnostic étant réalisé aussi par certains laboratoires vétérinaires.

Botulisme des oiseaux d'élevage

Le botulisme est une affection de plus en plus préoccupante en élevage industriel de volaille avec des risques croissants en santé publique humaine. Un arrêté ministériel, dont nous avons participé à la rédaction, doit prochainement paraître sur la gestion du botulisme en élevage aviaire. Les années 2006 et 2007 avaient connu une élévation très importante des foyers de botulisme, probablement à cause d'hivers particulièrement doux. *C. botulinum* C ou D a une température optimum de croissance relativement élevée (37-40°C).

Le nombre d'examen (138 en 2009) est en augmentation par rapport à 2008 (95) mais en dessous de ceux des années 2007 (238 analyses) et 2006 (156 analyses) qui avaient connu un pic épidémiologique important. Cependant ce nombre d'analyses est supérieur à celui des années antérieures (81 en 2004, 69 en 2003, 54 en 2002, 46 en 2001, 54 en 2000, 73 en 1999 et 71 en 1998).

Ceci dénote une progression des foyers botuliques en élevage aviaire depuis 1998 avec une incidence exceptionnellement élevée entre 2005 et 2007, ainsi qu'une meilleure connaissance du botulisme clinique par les professionnels de l'élevage aviaire.

Parmi les 42 foyers de botulisme en élevage industriel de volaille, 22 étaient de type D, 19 de type C ou D, 1 de type C et 3 de type indéterminé. Les résultats notés type C ou D proviennent du fait que l'activité toxique était neutralisée à la fois par le sérum C et le sérum D. Ces deux types de toxines sont très homologues et partagent de nombreux épitopes communs d'où les réactions de neutralisation croisée avec les sérums C et D. L'analyse génétique des souches de *C. botulinum* isolées de volaille par séquençage du gène de la neurotoxine (travail en cours), montre que la plupart de ces souches possèdent un gène mosaïque C/D. La toxine botulique mosaïque C/D produite par ces souches est neutralisée par le sérum D et non par le sérum de type C. Ces résultats rendent compte du nombre élevé des foyers identifiés type D contre un seul foyer de type C, y compris chez les poulets alors que ceux-ci sont résistants au type D contrairement aux palmipèdes. La nouvelle méthodologie de PCR en temps réel que nous avons développé permet de différencier les types C, D, et les mosaïques C/D ou D/C des souches de *C. botulinum* détectées dans les échantillons de contenu intestinal. Cette procédure a été mise en routine au CNR au cours de 2009 et des résultats complets pourront être présentés en 2010.

Aucun foyer de botulisme E n'a été diagnostiqué en élevage de volailles en 2008.

Le botulisme de type C ou D est rarement rencontré chez l'homme. Cependant, il a été montré que l'homme est sensible à ce type de botulisme. Il n'est pas exclu qu'une progression de l'incidence de botulisme C chez les oiseaux avec des risques de contamination des aliments, entraîne des cas humains.

Le botulisme des oiseaux d'élevage se déclare tout au long de l'année avec une plus forte incidence au printemps et en été et concerne des élevages répartis sur tout le territoire.

Botulisme des oiseaux sauvages

La demande d'examens concernant les cas de botulisme d'oiseaux sauvages est fluctuante d'une année sur l'autre, 57 en 2009, du même ordre que celle des années antérieures (54 en 2008, 34 en 2007, 72 en 2006, 109 en 2005, 86 en 2004, 138 en 2003, 43 en 2002, 29 en 2001, 57 en 2000, 111 en 1999 et 56 en 1998). Ces demandes d'analyse sont fonction des conditions climatiques et de la motivation des intervenants de la faune sauvage à réaliser des examens complémentaires pour étayer une suspicion de botulisme.

Ceci traduit probablement une meilleure connaissance de la maladie sur le terrain et un meilleur ciblage des échantillons qui nous sont envoyés pour analyse.

Un total de 23 foyers de botulisme des oiseaux sauvages ont été identifiés par rapport à 34 foyers suspectés. Les types de botulisme identifiés étaient D dans 18 cas, mosaïque C/D dans 13 cas et indéterminé dans un cas. Le botulisme de type D est majoritairement rencontré chez les palmipèdes. La distribution des foyers de botulisme d'oiseaux sauvages concerne les départements côtiers mais aussi ceux riches en plans d'eau.

La mise en évidence de toxine botulique dans le sérum des oiseaux apparaît comme un indicateur fiable de diagnostic de botulisme. La distinction entre les types C ou D n'est pas toujours possible, étant donné les communautés antigéniques entre les deux toxines et l'existence de toxines hybrides entre C et D. Mais, la toxine botulique n'est pas toujours détectable chez les oiseaux botuliques. Pour cette raison, une recherche de *C. botulinum* dans le contenu intestinal est souvent entreprise. La détection de *C. botulinum* dans les cultures d'enrichissement de contenus intestinaux est plus fréquemment positive par caractérisation de la toxicité que par PCR: 44 détections de *C. botulinum* par toxicité versus 23 par PCR. Cependant, la nouvelle procédure de PCR a été mise en place au CNR qu'en cours d'année. L'avantage de la PCR est de discriminer de façon précise entre les types C, D, mosaïque C/D ou D/C.

3.4. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Une fiche d'alerte a été émise au mois de juin 2009 dans le cadre d'infections à *C. difficile* 027 au CHU de Rennes (35). Il s'agit des premiers cas groupés d'infection à *C. difficile* de PCR-ribotype 027 épidémique (souche identique à celle du Nord - Pas de Calais) identifiés dans un établissement de santé de l'interrégion Ouest (voir http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/bilan_national_2008/index.htm pour le bilan national de la surveillance de ces infections au 31 décembre 2008). Depuis février 2009, plusieurs souches de *C. difficile* de PCR-ribotype 027 épidémique ont été identifiées chez des patients hospitalisés dans plusieurs services du CHU de Rennes (35). Le premier cas date du 18/02/09; depuis cette date, 8 autres cas ont été identifiés jusqu'au 20/05/09. Sur ces 9 cas, 7 sont considérés comme des cas nosocomiaux acquis et 2 sont des cas communautaires hospitalisés en raison de leur infection. Ils ont été hospitalisés dans 6 services différents. Sur les 7 cas nosocomiaux, 3 décès (dont 1 non imputable et 2 en cours d'investigation) sont recensés.

Depuis août 2009, l'identification des 10 PCR-ribotypes les plus fréquemment retrouvés en France a été mise en place. Les souches de référence correspondant aux PCR-ribotypes 001, 002, 014, 017, 020, 053, 077, 078, 106 et 126 ont été envoyées aux différents laboratoires experts et le serveur de résultat de l'Institut Pasteur a été modifié afin d'intégrer dans les résultats l'identification de ces différents PCR-ribotypes. 146 PCR-ribotypes ont été renseignés : 5 PCR-ribotypes 001, 14 PCR-ribotypes 002, 2 PCR-ribotypes 017, 2 PCR-ribotypes 053, 41 PCR-ribotypes 078/126, 46 PCR-ribotypes 014/020/077 et 36 PCR-ribotypes autres ont été mis en évidence (dont les PCR-ribotypes 003, 015, 023 et 070).

3.5. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX EN PARTICULIER EUROPEENS

- F. Barbut est membre du comité exécutif de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*) et occupe les fonctions de trésorier depuis 2009.
- F. Barbut a été coordonateur pour la France de la deuxième étude européenne de surveillance des infections à *C. difficile*, organisée sous l'égide de l'ECDC.
- F. Barbut a collaboré aux travaux de l'**ECDC** concernant « les recommandations pour le diagnostic des ICD » (*Crobach M. et al., Clin Microbiol Infect.* 2009 Dec;15(12):1053-66.)
- F. Barbut a participé à l'Advisory board des laboratoires Optimer (USA) et Merck (USA) pour le développement de deux molécules destinées au traitement des infections à *C. difficile*

3.6. ENQUÊTES OU ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE

Caractéristiques épidémiologiques et microbiologiques des infections à *Clostridium difficile* en France : résultats de l'étude ICD-Raisin 2009 (SFHH 2010, soumis ; ECCMID 2010, soumis)

B. Coignard, C. Eckert, D. Rahib, M. Hébert, S. Boussat, P. Jarno, K. Blanckaert, A. Carbonne, C. Bernet, L. Cavalié, B. Hubert, B. Tilmont, O. Bajolet, D. Lepelletier, P. Vanhems, F. Barbut.

Contexte :

Suite à l'émergence du clone épidémique de PCR-ribotype 027 en 2006, la surveillance des infections à *Clostridium difficile* (ICD) en France a été renforcée par le signalement des cas groupés ou sévères dans les établissements de santé (ES). En complément, l'Institut de veille sanitaire et le laboratoire *C. difficile* associé au CNR Anaérobies ont proposé en 2009 une étude prospective, multicentrique et nationale.

Objectifs :

Evaluer l'incidence des ICD, les caractéristiques et la distribution géographique des souches responsables d'ICD dans les ES français.

Méthodes :

De mars à août 2009, les ES inscrits au volet épidémiologique (VE) déclaraient chaque mois sur un questionnaire en ligne le nombre de nouveaux cas d'ICD (selon leur origine et sévérité), d'admissions et de journées d'hospitalisation (JH). Les cas étaient définis selon les recommandations de l'ECDC et les données stratifiées par type de séjour. Les ES inscrits au volet microbiologique (VM) transmettaient au CNR les souches isolées en mars de patients infectés.

Résultats :

105 ES de court-séjour (CS) et 95 de moyen-long séjour (MLS) ont participé au VE. En CS, 1332 cas étaient rapportés : 837 (63%) nosocomiaux (dont 93% acquis dans l'ES déclarant), 372 (28%) communautaires et 46 (3%) importés d'un EHPAD. Dans les 70 ES avec suivi actif des patients à 30 jours (SA), 136 (14%) des 944 cas étaient sévères et 135 (14%) décès étaient rapportés, dont 35 (4%) liés à l'ICD. L'incidence des ICD nosocomiales était de 1,44 cas pour 10000 JH (médiane : 0,99) ou de 0,69 cas pour 1000 admissions (médiane : 0,47). En MLS, 297 cas étaient rapportés : 256 (86%) nosocomiaux (dont 95% acquis dans l'ES déclarant), 10 (3%) communautaires et 17 (6%) importés d'un EHPAD. Dans les 63 ES avec SA, 6 (3%) des 223 cas étaient sévères et 28 (13%) décès étaient rapportés, dont 5 (2%) liés à l'ICD. L'incidence des ICD nosocomiales était de 0,97 cas pour 10000 JH (médiane : 0,47). Le CNR a reçu 245 souches de 54 ES sur 78 participant au VM ; 235 (96%) étaient confirmées *C. difficile* : 25 (11%) étaient de PCR-ribotype 078/126 et 8 (3%) de PCR-ribotype 027 ; les souches 027 provenaient du Pas-de-Calais, d'Ille-et-Vilaine ou de Saône-et-Loire.

Conclusions :

Ces résultats confirment une incidence des ICD en France moins élevée que celle rapportée ailleurs en Europe et une diffusion limitée du clone 027, ce qui suggère un impact positif des recommandations de contrôle de 2006. Cependant, la proportion élevée de cas communautaires en CS et l'émergence du PCR-ribotype 078/126 soulignent l'importance d'études complémentaires.

4. ALERTES

Les bactéries anaérobies ne sont généralement pas à l'origine de phénomènes épidémiques. Hormis le botulisme (maladie à déclaration obligatoire) et les infections sévères ou épidémiques à *C. difficile*, il n'y a donc pas de procédure d'alerte pour les affections à bactéries anaérobies.

Botulisme : Chaque cas de botulisme confirmé biologiquement par le CNR fait l'objet d'une déclaration par fax à l'InVS. En outre, des contacts téléphoniques ou par courrier électronique ont lieu régulièrement entre l'InVS et le CNR pour faire le point sur les foyers de botulisme en cours et sur des suspicions de botulisme. L'alerte est déclenchée lorsqu'il y a un risque de santé publique, notamment avec un produit alimentaire du commerce.

Au cours de 2009, une alerte botulisme due à un produit alimentaire d'origine industrielle a été signalée (foyer de botulisme de type E dans le département 06 suite à la consommation de poisson fumé acheté en Finlande et fabriqué au Canada). Cette alerte a été également signalée dans Eurosurveillance.

Une alerte botulisme a été signalée suite à des patients atteints de botulisme et ayant pris part à un repas rassemblant 40 personnes.

Le signalement des cas individuels ou des petits foyers de botulisme à l'InVS qui a ensuite transmis aux services départementaux de santé a permis d'identifier l'origine alimentaire de quelques cas de botulisme. Les aliments en cause étaient des préparations familiales.

***Clostridium difficile* (Laboratoire associé)**

Clone de PCR-ribotype 027 de *C. difficile* : les laboratoires experts du réseau *C. difficile* saisissent directement leurs résultats sur le site web du CNR spécifique à la surveillance de *C. difficile*. Ce site est réservé aux laboratoires du réseau, à l'InVS et aux Cclin. Les données sont accessibles en temps réel au responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de l'InVS. De plus chaque responsable des Cclin a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée (voir ci-dessous le fonctionnement de ce réseau).

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (DDASS et Cclin) des épidémies et des cas sévères d'infections (cf guide Raisin, http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/). Il s'agit d'une surveillance ciblée. Les établissements réalisant un signalement doivent envoyer au laboratoire expert de leur région les souches isolées de l'épisode signalé afin de déterminer s'il s'agit du clone épidémique 027 ou non.

L'année 2009 a été marquée par le suivi de l'épidémie d'infections à *C. difficile* de PCR ribotype 027 dans la région Nord Pas-de-Calais et par sa dissémination limitée dans d'autres régions de France. Une fiche d'alerte a été émise au mois de juin 2009 dans le cadre d'infections à *C. difficile* 027 au CHU de Rennes (35).

Il s'agit des premiers cas groupés d'infection à *C. difficile* de PCR-ribotype 027 épidémique identifiés dans un établissement de santé de l'interrégion Ouest. Les souches de PCR-ribotype 078/126 ainsi que les PCR-ribotypes fréquents en France font également l'objet d'un suivi.

5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, ET DE CONSEIL

5.1. ENSEIGNEMENTS

Cours (P. Bouvet, M. Popoff) Différents cours de Master et autres formations notamment:

- Cours « Bactériologie médicale » de l'Institut Pasteur 2009 (semaine du 16 au 20 mars 2009). Semaine consacrée aux bactéries anaérobies. Deux matinées de cours et organisation / encadrement des travaux pratiques toute la semaine.

Cours (F. Barbut)

Master 2, semestres P5, P6, P7, Spécialité Microbiologie (Paris VI)
Cours de Bactériologie médicale de l'Institut Pasteur

DIU « Hygiène Hospitalière et Infections Nosocomiales » (Paris V, VI, VII)

DURPI (Diplôme Universitaire de Réanimation en Pathologie Infectieuse) (Paris VII)

DIU « Physiopathologie et thérapeutique des maladies infectieuses » (Paris VI)

DU « Hygiène Hospitalière, Prévention et Lutte contre les Infections Nosocomiales »
(Université de Picardie Jules Verne)

DU « Techniques de biologie moléculaire applicables au diagnostic médical » (Paris VI)

Licence professionnelle biohygiène, (Ecole Nationale de Chimie, Physique, Biologie, UPMC, Paris VI)

Cours (C. Eckert)

Master 1, M1 Santé, DCEM1 (Paris VI)

Master 2 IMVI, Spécialité Microbiologie, (Paris V, VI, VII)

5.2. STAGIAIRES

Différents stagiaires de Master M2, doctorants, post-doctorants et formation professionnelle

5.3. DIFFUSION AUX PROFESSIONNELS DE SANTE :

Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/anaer-index.html>

Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile*. Site réservé aux laboratoires du réseau, à l'InVS et aux Cclin.

Site web RAISIN : <http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/index.htm>

Les demandes de renseignements ou de conseils se font directement par téléphone ou e-mail auprès des responsables du CNR

Collaboration à la plaquette d'information destinée au patient (<http://www.cclinparisnord.org/Usagers/PlaquettePATIENT.pdf>) [2006]

Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* »

(http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/) [2006]

5.4. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Le CNR est régulièrement contacté par téléphone par des cliniciens, biologistes de laboratoires hospitaliers ou de ville sur le diagnostic bactériologique des affections à anaérobies, conduite à tenir, traitement notamment choix des antibiotiques. Egalement, le CNR est régulièrement consulté par des vétérinaires, biologistes de laboratoires vétérinaires, industriels de l'agro-alimentaire sur les risques d'affections à bactéries anaérobies, le diagnostic et la conduite à tenir des affections à ces bactéries et plus particulièrement botulisme et entérotoxémies.

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition un numéro de téléphone (01 40 01 13 88) et une adresse email (frederic.barbut@sat.aphp.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostiques, hygiène). Bien que le nombre d'appels ne soit pas formellement enregistré, on peut estimer leur fréquence à un minimum de 1 appel par jour ouvrable soit environ 250 appels en 2009.

6. ACTIVITES DE RECHERCHE

6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN RELATION AVEC LE CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME

Développement d'un système de typage de type MLST chez *Clostridium butyricum*

Des souches de *Clostridium butyricum* sont régulièrement isolées de selles de grands prématurés atteints d'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) et sont suspectées d'être responsables de la survenue de cette pathologie qui est souvent une urgence chirurgicale. Il serait intéressant de pouvoir comparer des souches de cette espèce isolées d'enfants atteints d'ECUN et d'enfants sains. Actuellement aucun système de typage n'existe. La technique MLST (Multilocus Sequence Typing) outre son intérêt dans les études de génétique de population permet également de disposer d'un outil de typage performant.

Des couples d'amorces ont été dessinées permettant d'amplifier des fragments internes de plusieurs gènes de ménage chez *Clostridium butyricum* ainsi que chez les espèces apparentées *C. beijerinckii* et « *C. neonatale* ». Sept gènes candidats ont déjà été identifiés et les premiers résultats montrent une certaine variabilité de séquence qui devrait permettre une bonne discrimination des souches entre elles.

6.2. ACTIVITES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE ASSOCIE

1-Développement de techniques de biologie moléculaire permettant un diagnostic plus rapide des ICD due à la souche épidémique 027

Objectifs

Mise au point d'une technique de diagnostic rapide des infections à *C. difficile* par PCR en temps réel (détection du gène *tcdB* de la toxine B) à partir des selles et d'identification du clone épidémique 027 par mise en évidence de la mutation en position 117 dans le gène *tcdC*.

Mise au point d'une technique multiplex de PCR en temps réel pour la détection des différentes formes de la toxine binaire (forme complète, forme tronquée, absence du gène).

Partenaires

Docteur Bruno Dupuy, Unité de Génétique moléculaire, Institut Pasteur de Paris

Financement

PHRC Régional

Etat d'avancement

La mise au point technique à partir des selles des différentes méthodes ainsi que la phase d'inclusion (1589 selles criblées, 881 selles de patients suspects d'ICD analysées) sont terminées. Les techniques sont évaluées par rapport aux méthodes de référence (test de cytotoxicité des selles et culture toxigénique pour le diagnostic de *tcdB*, PCR ribotypage et

antibiogramme standard pour l'identification du clone épidémique 027, PCR conventionnelle à partir de colonies pour la toxine binaire). Les calculs de spécificité et sensibilité de la PCR en temps réel et l'intervalle de confiance à 95% ainsi que des valeurs prédictives positive et négative et du taux d'échec sont en cours.

2-Etude du polymorphisme du gène *cdtR* régulant l'expression de la toxine binaire de *C. difficile*

Contexte et objectif

Certaines souches de *C. difficile* (dont la souche épidémique 027) produisent en plus des toxines A et B, une ADP-ribosyltransférase spécifique de l'actine (CDT ou toxine binaire) qui pourrait être un facteur de virulence additionnel. Récemment Carter *et al.* ont montré que les gènes *cdtA* (partie enzymatique) et *cdtB* (partie ligand) codant pour la toxine binaire sont sous la dépendance d'un gène régulateur *cdtR* appartenant à la famille *LyfTR*. Nous avons étudié la variabilité du CdtLoc, en particulier des gènes *cdtR* et *cdtA* de 67 souches toxigènes qui provenaient de différents hôpitaux français ou qui étaient des souches de référence. L'alignement des séquences du gène *cdtA* a permis de définir 8 groupes (1 à 8). L'alignement des séquences du gène *cdtR* a permis d'identifier 7 allèles (A à G). L'étude du polymorphisme de ces gènes *cdtA* et *cdtR* a permis d'établir des associations : 2A, 2G, 2D, 2F, 8E, 4B, 5B, 6B et 3C. Le groupe 6 est notamment caractérisé par la présence d'une mutation ponctuelle en position 322 qui introduit un codon stop prématuré. Les souches du groupe 6 sont toutes des souches de toxinotype V. L'objectif de cette étude était de voir si le polymorphisme du gène *cdtR* et notamment la présence du codon stop, avait un impact sur la transcription du gène *cdtA*. Pour cela, une technique d'extraction de l'ARN et une RT-PCR multiplex ont été mises au point.

Financement

EA2392

Méthodes

Treize souches de *C. difficile* ont été sélectionnées. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 6 mL de culture bactérienne grâce au kit d'extraction Trizol Max Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen). Les ARN ont été dosés sur NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech) avant et après purification à l'aide d'une DNase I (Deoxyribonuclease I, Invitrogen). La présence du transcrit du gène *cdtA* a été mise en évidence par transcription inverse (obtention du cDNA) suivie d'une PCR classique à l'aide d'amorces spécifiques. L'amplification du gène *rrs* a servi de contrôle interne. Pour chaque échantillon d'ARN, l'absence de contamination par l'ADN a été contrôlée en réalisant une PCR sur l'ARN. La détection des transcrits a été visualisée par électrophorèse après migration pendant 45 minutes à 135V sur gel d'agarose à 1%.

Résultats et conclusion

La transcription du gène *cdtA* a permis de mettre en évidence un transcrit chez toutes les souches, quelque soit le polymorphisme présent dans les gènes *cdtR* et *cdtA*. Il y a notamment présence d'un transcrit *cdtA* pour les souches présentant un codon stop dans le gène *cdtR* (allèle 6).

Une quantification des ARN est maintenant envisagée (en utilisant la technique de PCR en temps réel (SybR green)). Pour étudier l'impact du polymorphisme du gène *cdtA*, il est prévu de tester l'activité ADP-ribosyltransférase de la CDT sur l'actine G grâce au test d'ADP-ribosylation.

6.3. ACTIVITES DE RECHERCHE DE L'UNITE BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES

Voir liste de publications

7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

7.1. CNR ET UNITE DES BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- Couesnon A., Shimizu T., **Popoff M. R.** Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. **Cell. Microbiol.** 2009, 11: 289-308.
- Mounier J., **Popoff M. R.**, Enninga J., Frame M. C., Sansonetti P., Tran Van Nhieu G. The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. **PLoS Pathogens** 2009, 5: e1000271.
- Masson JB., Casanova D., Türkcan S., Voisinne G., **Popoff M. R.**, Vergasola M., Alexandrou A. Inferring maps of forces inside cell membrane microdomains. **Phys. Rev. Lett.** 2009,102: 048103-1 -4.
- **Popoff M. R.**, **Geny B.** Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. **Biochim. Biophys. Acta** 2009, 1788: 797-812.
- **Geny B.**, **Popoff M. R.** Activation of a c-Jun-NH₂-terminal kinase pathway by the lethal toxin from *Clostridium sordellii*, TcsL82, occurs independently of the toxin intrinsic enzymatic activity and facilitates small GTPase glucosylation. **Cell. Microbiol.** 2009, 11: 1102-1113.
- Trollet C., **Pereira Y.**, Burgain A., Litzler E., Mezrahi M., Seguin J., **Manich M.**, **Popoff M. R.**, Scherman D., Bigey P. Generation of high-titer neutralizing antibodies against *botulinum* toxins A, B, and E by DNA electrotransfer. **Infect. Immun.** 2009, 77: 2221-2229.
- Poras H., Ouimet T., Orng S.V., Fournié-Zaluski M. C., **Popoff M. R.**, Roques B. P. Detection and quantification of *botulinum* neurotoxin type A by a novel rapid *in vitro* fluorescent assay. **Appl. Environ. Microbiol.** 2009, 75: 4382-4390.
- Fach P., Micheau P., **Mazuet C.**, Perelle S., **Popoff M.** Development of real-time PCR tests for detecting *botulinum* neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* **J. Appl. Microbiol.** 2009, 107: 465-473.
- Stahl C., Unger L., **Mazuet C.**, **Popoff M.**, Straub R., Frey J. Immune response of horses to vaccination with the recombinant Hc domain of botulinum neurotoxin types C and D. **Vaccine** 2009, 27: 5661-5666.

- Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T. D., Sebahia, M., Quail, M. A., Rose, G., Gerding, D. N., **Gibert, M., Popoff, M. R.**, Parkhill, J., Dougan, G., Wren, B. W. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. **Genome Biol** 2009, 10: R102
- Hilger, H., Pust, S., von Figura, G., Kaiser, E., Stiles, B. G., **Popoff, M. R.**, Barth, H. The long-lived nature of clostridium perfringens iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. **Infect. Immun.** 2009, 77: 5593-5601.
- **Knapp, O.**, Maier, E., Benz, R., **Geny, B., Popoff, M. R.** Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* Epsilon-toxin (ETX). **Biochim Biophys Acta** 2009, 1788: 2584-2593.

- **Popoff M. R., Bouvet P.** Clostridial toxins. **Future Microbiol.** 2009, 4: 1021-1064.

- Alauzet, C., F. Mory, C. Teyssier, H. Hallage, **J. P. Carlier**, G. Grollier, and A. Lozniewski. 2009. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new nim gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Jan;54(1):60-4. Epub 2009 Oct 5.
- **Carlier, J. P., M. Bedora-Faure, G. K'Ouas, C.** Alauzet, and F. Mory. 2009. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Seguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982 with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov. and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009 Aug 4. [Epub ahead of print].
- Marchandin, H., C. Teyssier, J. Campos, H. Jean-Pierre, F. Roger, B. Gay, **J. P. Carlier**, and E. Jumas-Bilak. 2009. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov., and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009 Aug 10. [Epub ahead of print].

Chapitres de livre

- **S Raffestin, A Couesnon, Y Perreira, C Mazuet, M. R. Popoff.** Botulinum and tetanus neurotoxins: molecular biology, toxin gene regulation and mode of action. In *Clostridia Molecular Biology in the Post-Genomic Era*, H. Brüggenmann and G. Gottschalk (Eds), Caister Academic Press, Norfolk 2009, 1-28.
- B. G. Stiles, **M. R. Popoff** Binary bacterial toxins: evolution of a common intoxicating theme. In *Clostridia Molecular Biology in the Post-Genomic Era*, H. Brüggenmann and G. Gottschalk (Eds), Caister Academic Press, Norfolk 2009, 69-102.

- **Popoff M. R.** Toxines botuliques, génétique, microbiologie et aspects pathologiques. In Les Amis du *Clostridium*, Toxins botulinique: un quart de siècle de recherche et d'applications cliniques, B. Poulain, A. Nieoullon, O. Rascol, C. P. Jedynek, Y. Christen (Eds), Solal, Marseille 2009, 21-37.
- Jover E. , Doussau F., Longchamp E. , Wioland L., Dupont JL., Molgo J., **Popoff M.**, Poulain B. Intracellular actions of botulinum and tetanus neurotoxins: SNARE cleavage but not only! In Les Amis du *Clostridium*, Toxins botulinique: un quart de siècle de recherche et d'applications cliniques, B. Poulain, A. Nieoullon, O. Rascol, C. P. Jedynek, Y. Christen (Eds), Solal, Marseille 2009, 13-21.
- **Geny B., Popoff M.** Lethal toxin from *Clostridium sordellii* modifies, sequentially and independently, several cellular signaling pathways. in Toxins and Signaling, Meeting on Toxinology 2009, Benoit E. , Goudey-Perriere F., Marchot P., and Servent D. (Eds), SFET Editions, <http://www.sfet.asso.fr>, 31-44.

Publications dans des revues nationales

- Poulain B., Longchamp E., Jover E., **Popoff M. R.**, Molgo J. Mécanismes d'action des toxines et neurotoxines botuliques. **Ann. Dermatol. Venereol.** 2009, 136 Suppl 4: S73-S76.

Congrès, workshops (CNR)

- 46th Annual Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting, Philadelphie USA, 18-23 oct 2009, participation de **C. Mazuet**.
- 8° Journées de la Recherche Avicole "Le botulisme – évolution des connaissances" , St Malo, 26 mars 2009, (MP, conférencier invité)
- Journées Nationales des GTV "Résistance des contaminants dans le milieu extérieur", Nantes, 13 mai 2009 (MP, conférencier invité).
- ETOX14, "Passage of the botulinum neurotoxin A through the intestinal barrier" Obernai, 27 juin-1 juillet 2009, (MP, conférencier invité).
- 6° Clospath Meeting, The impacts of genomics on Disease Control "Passage of the botulinum neurotoxin A through the intestinal barrier" Clostridia, , Rome, 19-23 octobre 2009, (MP, conférencier invité).
- 17° Rencontres en Toxinologie, SFET, "*Clostridium sordellii* Lethal Toxin and cell signaling" Institut Pasteur, Paris, 2-3 décembre 2009, (MP, conférencier invité).

Séminaire (MP)

"Passage of the botulinum neurotoxin A through the intestinal barrier" Université de Freiburg, Germany, invité par K. Aktories,

7.2. PUBLICATIONS DU LABORATOIRE ASSOCIÉ

Publications dans des revues internationales

Barbut F, Menuet D, Verachten M, Girou E.

Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of *Clostridium difficile* spores.
Infect Control Hosp Epidemiol. 2009 Jun;30(6):507-14.

Denève C, Bouttier S, Dupuy B, **Barbut F**, Collignon A, Janoir C.

Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains.
Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):5155-62.

Barbut F, Braun M, Burghoffer B, Lalande V, **Eckert C**.

Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools by real-time PCR.
J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1276-7.

Spigaglia P, Barbanti F, Louie T, **Barbut F**, Mastrantonio P.

Molecular analysis of the gyrA and gyrB quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected in vitro.
Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2463-8.

Bouttier S, Barc MC, **Felix B**, Lambert S., Collignon A., **Barbut F**.

Clostridium difficile in ground meat, France.
Emerging Infect Dis. 2010 sous presse

Blanckaert K., Birgand G., Coignard B., Carbonne A., **Barbut F**, **Eckert C**, Grandbastien B., Khadi Z., Desenclos J.C., Astagneau P.

Control of a large outbreak of *Clostridium difficile* 027 ribotype-associated infection in France, 2006-2007
J. Hosp. Infection, soumis.

Landelle C., Legrand P., Goubard A., Lesprit P., Girou E., **Barbut F**.

First isolation of clostridium difficile PCR ribotype 027 from Serbia.
Eurosurveillance, soumis.

Publications dans des revues de langue française

Birgand, G. et **C. Eckert**.

Dynamique des souches de *Clostridium difficile* en Europe. Bulletin semestriel n°35
déc 2009 CCLIN Paris Nord

Eckert C. et F. Barbut.

Clostridium difficile : quels signes d'appel ? Quelle prise en charge ? La Revue du Praticien Médecine Générale Tome 12 n°830 24 novembre 2009.

Meneret A, Tassart M, Khalil A, Roques S, **Barbut F**, Bachmeyer C.

A recurrent diarrhea

Rev. Med. Interne. 2009, 30, 67-68

Eckert C. et F. Barbut.

Infections à *Clostridium difficile*.

Medecine Sciences, 2010 (sous presse)

Publications dans des revues internationales sans comité de lecture

Pons JL et **Barbut F.**

Gram positive anaerobes

In « Antibiogram »

Courvalin P., Leclercq R., Rice LB. Eds, ASM Press, 2009

Soutenance de thèse

Amélie Audion.

Détermination par méthode immuno-enzymatique du caractère toxigène de *C. difficile* obtenu en culture.

Thèse de Pharmacie, soutenue le 4 juin 2009.

Communications nationales

L. Lemée, S. Brisse, B. Dupuy, **F. Barbut**, E. Bernard, C. Tran, J.M. Thiberge, **C. Eckert**, J.L. Pons.

Suivi macroépidémiologique des infections à *Clostridium difficile* par MultiLocus Sequence Typing (MLST) : développement et mise en ligne d'une base de données sur le site de l'institut Pasteur. RICAI 179/44o.

Eckert C., J. Van Broeck, P. Spigaglia, **B. Burghoffer**, M. Delmée, P. Mastrantonio, **F. Barbut**.

Comparaison d'une méthode semi-automatisée de rep-PCR avec le PCR-ribotypage pour la caractérisation des souches de *Clostridium difficile*. RICAI 286/67a.

F. Vromman, **C. Eckert**, **A. Halkovich**, D. Trivier, **F. Barbut**.

Génotypage des souches de *Clostridium difficile* par MLVA. RICAI 287/67a.

V. Lalande, C. Eckert, H. Huang, A. Weintraub, J.P. Canonne, C.E. Nord, D. Chassaing, F. Barbut.

Évaluation bi-centrique du système Xpert® *C.difficile* (Cepheid) pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD). RICAI 285/67a.

Communications internationales

Eckert C., J. Van Broeck, P. Spigaglia, B. Burghoffer, M. Delmée, P. Mastrantonio, and F. Barbut.

Comparison of a semi-automated rep-PCR system with PCR-ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. P8 Clostpath 2009, Rome, Italie.

Vromman F., C. Eckert, A. Halkovich and F. Barbut.

Genotyping of *Clostridium difficile* strains by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. P9 Clostpath 2009, Rome, Italie.

Barbut F., C. Eckert, D. Chassaing, L. Lemée, J.L. Pons, L. Cavalie, N. Marty, F. Mory, A. Lozniewski, H. Marchandin, F. Gerard-Pipau, P. Bouvet, M.R. Popoff, J.M. Thiolet and B. Coignard.

Successful control of *Clostridium difficile* 027 in France. P10 Clostpath 2009, Rome, Italie.

L. Lemée, S. Brisse, B. Dupuy, F. Barbut, E. Bernard, C. Tran, J.-M. Thiberge, C. Eckert, J.-L. Pons.

Multilocus sequence typing (MLST) of *Clostridium difficile* : establishment of a publicly accessible web database hosted at the Pasteur Institute (Paris, France) P16 Clostpath 2009, Rome, Italie.

Conférences sur invitations

F.Barbut, C. Eckert and B. Coignard

Surveillance of *Clostridium difficile* infections in France
Stockholm , ECDC September 2009

Eckert C. et F. Barbut (2009).

Infections à *Clostridium difficile*

6ème Journée Régionale de la Lutte contre les Infections Nosocomiales ARLIN CCLIN Sud-Est Languedoc-Roussillon.

Barbut F.

Pathogénie et diagnostic des infections à *Clostridium difficile*

Congres de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) 2009

Communication orale

8. ANNEXES

TABLEAU 1

Répartition des souches d'origine humaine par sites d'infections

Pour la période du 01/01/2009 au 31/12/2009

	NOMBRE
INFECTIONS INTRA-ABDOMINALES (Pus, redon etc...)	1
COPROCULTURE	11
INFECTIONS HEPATIQUES / PANCREATIQUES	2
GYNECOLOGIE	2
HEMOCULTURE	32
INFECTIONS OSSEUSES	2
INFECTIONS CUTANÉES et MUSCULAIRES (abcès, suppurations...)	1
INFECTIONS PLEURO-PULMONAIRES	1
UROLOGIE/NEPHROLOGIE	1
NON PRECISE	115
TOTAL	168

TABLEAU 2

Répartition des souches d'origine humaine par genres

Période du 01/01/2009 au 31/12/2009

GERME	NOMBRE
ABIOTROPHIA	1
ACTINOBACULUM	1
ACTINOMYCES	6
ALLOSCARDOVIA	1
BACILLUS	1
BACTEROIDES	12
BIFIDOBACTERIUM	1
CAMPYLOBACTER	1
CLOSTRIDIUM	74
DIALISTER	1
EGGERTHELLA	6
EIKENELLA	1
EUBACTERIUM	1
FUSOBACTERIUM	7
LACTOBACILLUS	3
LEPTOTRICHIA	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS	3
PREVOTELLA	2
PROPIONIBACTERIUM	5
SOLOBACTERIUM	1
STREPTOCOCCUS	1
VEILLONELLA	1
DIVERS (aérobie, non poussé, etc.)	37
TOTAL	168

TABLEAU 3

Répartition des souches d'origine humaine par espèces

Période du 01/01/2009 au 31/12/2009

GERME	NOMBRE
ABIOTROPHIA DEFECTIVA	1
ACTINOBACULUM SCHAALII	1
ACTINOMYCES GERENCSERIAE	1
ACTINOMYCES ISRAELII	2
ACTINOMYCES ODONTOLYTICUS	1
ACTINOMYCES du groupe RADINGAE/TURICENSIS	1
ACTINOMYCES SP.	1
ALLOSCARDOVIA OMNICOLENS	1
BACILLUS CIRCULANS	1
BACTEROIDES FRAGILIS	7
BACTEROIDES NORDII	1
BACTEROIDES OVATUS	2
BACTEROIDES THETA IOTAOMICRON	2
BIFIDOBACTERIUM SP.	1
CAMPYLOBACTER SP.	1
CLOSTRIDIUM BIFERMENTANS	2
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type A	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type B	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	1
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	13
CLOSTRIDIUM CELERECRESCENS	1
CLOSTRIDIUM COLICANIS	1
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	33
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	14
CLOSTRIDIUM RAMOSUM	1
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	2
CLOSTRIDIUM SORDELLII	1
CLOSTRIDIUM SP.	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	1
CLOSTRIDIUM TERTIUM	1
DIALISTER PNEUMOSINTES	1
EGGERTHELLA LENTA (ancien EUBACTERIUM LENTUM)	6
EIKENELLA CORRODENS	1
EUBACTERIUM TENUE	1
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM	4
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM subspecies FUNDULIFORME	1
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	1
FUSOBACTERIUM SP.	1
LACTOBACILLUS CATENAFORMIS	1
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS	1
LACTOBACILLUS SP.	1
LEPTOTRICHIA GOODFELLOWII	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS ANAEROBIUS	1
FINEGOLDIA MAGNA (ancien Peptostreptococcus magnus)	1
PEPTONIPHILUS SP.	1

PREVOTELLA BIVIA	1
PREVOTELLA SP.	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	3
PROPIONIBACTERIUM AVIDUM	1
PROPIONIBACTERIUM GRANULOSUM	1
SOLOBACTERIUM MOOREI	1
STREPTOCOCCUS SP.	1
VEILLONELLA SP.	1
DIVERS (aérobie, non poussé, etc.)	37
TOTAL	168

TABLEAU 4**Souches d'origine vétérinaire : répartition par espèces**

(période du 01/01/2009 au 31/12/2009)

GERME	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	2
CLOSTRIDIUM LITUSEBURENSE	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	24
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	4
CLOSTRIDIUM SORDELLII	2
CLOSTRIDIUM SP.	1
ABSENCE DE BACTERIES SPECIFIQUES	1
DIVERS (aérobie, non poussé, etc.)	2
ANALYSE NON EFFECTUEE	1
CULTURE POLYMICROBIENNE	5
TOTAL	43

Tableau 5
Résistance (R+) aux antibiotiques des souches isolées en 2009
 Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme
 de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

		Amoxicilline	Amoxicilline/acide clavulanique	Impénème	Clindamycine	Métronidazole	Vancomycine	Chloramphénicol	Moxifloxacine
<i>Actinomyces</i>	2	0	0	0	1	2*	0	0	0
<i>Propionibacterium</i>	2	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Bacteroides</i>	12	8 (7R+1I)	5(4R+ 1I)	1R	5R	1R (<i>Bacteroides</i> sp.)	11R (1NT)	1R (7NT)	
<i>Bifidobacterium</i>	2	0	0	0	0	2*	0	0	0
<i>Campylobacter</i>	2	0	0	0	0	1*	3*	0	0
<i>Clostridium</i>	22	0	0	0	5 (3I)	0	1 (<i>C. bifermentans</i>)	1 (I - <i>C. difficile</i>)	1 (<i>C. difficile</i>) (4NT)
Bacilles Gram positif non sporulés	9	0	0	0	1 (<i>Eggerthella lenta</i>)	0	0	0	1 (I - <i>E. lenta</i>) (4NT)
<i>Fusobacterium</i>	6	0	0	0	0	0	6*	1 (<i>F. necrophorum</i>)	0
Cocci Gram +	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Cocci Gram - (<i>Veillonella</i> sp.)	1	0	NT	0	0	0	1*	0	NT
<i>Prevotella bivia</i>	1	0	0	0	0	0	1*	0	0
TOTAL	61								

* Espèces naturellement résistantes

NT: non testé

Antibiogramme spécifique à *Clostridium difficile*

	Clindamycine	Erythromycine	Moxifloxacine	Métronidazole	Tétracycline	Vancomycine	Erythromycine / clindamycine	Erythromycine / clindamycine / moxifloxacine
Nombre de souches R ou I	23/29	13/29	15/29	0/29	2/18	0/15	19/29	17/29

TABLEAU 6

**Botulisme humain: Nombre de cas et de foyers
Période du 01/01/2009 au 31/12/2009**

DEPT	Foyer	Nombre de cas	Typage de toxine botulique dans le sérum					Aliment suspect
			A	B	AB	E	Indéterminé	
6	Nice	3	0	0	0	1	0	Poisson pêché au Canada, fumé en Finlande et emballé sous vide. Consommé à Nice. (Eurosurveillance, Volume 14/45, 12 Novembre 2009)
10	Troyes	6	0	6	0	0	0	Repas de chasseurs (40 personnes)
25	Besançon	1	0	1	0	0	0	Préparation familiale : charcuterie (saucisses - négatives)
31	Toulouse	1	1	0	0	0	0	
33	Bordeaux	1	0	1	0	0	0	Epinards / chou- fleur : négatif Chou-fleur : négatif Chou-fleur / carotte : négatif
38	Grenoble	1	1	0	0	0	0	Miel : absence de <i>Clostridium botulinum</i> mais présence d'un <i>Clostridium perfringens</i> toxique (toxines alpha et thêta)
69	Lyon	3	0	2	0	0	1	Jambon cru - préparation familiale : toxine botulique B, 147 DL/g → isolement souche <i>C. botulinum</i> type B
72	La Flèche	2	0	2	0	0	0	Conserves familiales d'asperges (négatives)
77	Melun	2	0	2	0	0	0	Terrine sanglier faite maison : toxine B : 20 DL/g et 2000 DL/g. Présence de <i>C. botulinum</i> B
95	Cergy-Pontoise	3	0	2	0	0	1	jambon : toxine B, 40 DL/g
Totaux pour l'année 2009		23	2	16	0	1	2	

TABLEAU 7**BOTULISME ANIMAL.**

Répartition par espèces
Période du 01-1-2009 au 31-12-2009

Espèce	Nombre total d'échantillons ¹	Foyers positifs (cas)		Foyers négatifs	Nombre total de foyers (nombre total de cas)
Oiseaux sauvages	57	23 (34)	Type C / D : 10 Type D : 12 Présence de toxine botulique : 1	13	36 (52)
Oiseaux d'élevage	138		42 (48) Type C : 1 Type D : 17 Type C / D : 18 Activité toxique non identifiée : 4 Suspicion toxine botulique : 2		
Bovins	59	7 (14)	Type C : 4 Type C / D : 3	33	40 (47)
Cheval/ poney / âne	6	0		4	4 (4)
Caprins	3	0		3	3 (3)
Ovins	1		Volume insuffisant		1 (1)
Animaux sauvages/zoo	4	1 (1)	Type C : 1	3	4 (4)
				74	148 (177)

¹Plusieurs prélèvements concernent parfois un même cas ou un même foyer