

# Rapport d'activité annuel 2018

## Année d'exercice 2017



**Centre National de Référence**  
**des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella***  
***Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques***

*et*

***Laboratoire associé***  
***Service de Microbiologie***  
***Hôpital Robert Debré - Paris***

**Responsables :**

**CNR-IP :**

François-Xavier WEILL  
Simon LE HELLO  
Sophie LEFEVRE  
Charlotte RENAUDAT  
Secrétariat

**[colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr)/[salmonella@pasteur.fr](mailto:salmonella@pasteur.fr)**

Tél : 01 45 68 83 45 [francois-xavier.weill@pasteur.fr](mailto:francois-xavier.weill@pasteur.fr)

Tél : 01 40 61 37 24 [simon.le-hello@pasteur.fr](mailto:simon.le-hello@pasteur.fr)

Tél : 01 45 68 83 44 [sophie.lefevre@pasteur.fr](mailto:sophie.lefevre@pasteur.fr)

Tél : 01 40 61 35 88 [charlotte.renaudat@pasteur.fr](mailto:charlotte.renaudat@pasteur.fr)

Tél : 01 45 68 83 39 Télécopie : 01 45 68 88 37

**Laboratoire associé (HRD) :**

Stéphane BONACORSI  
Patricia MARIANI-KURKDJIAN  
Secrétariat

**[e.coli@aphp.fr](mailto:e.coli@aphp.fr)**

Tél : 01 40 03 57 92 [stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr](mailto:stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr)

Tél : 01 40 03 23 41 [patricia.mariani@rdb.aphp.fr](mailto:patricia.mariani@rdb.aphp.fr)

Tél : 01 40 03 23 40 Télécopie : 01 40 03 24 50

## Table des matières

<b>RESUME ANALYTIQUE</b> .....	<b>1</b>
<b>1/ SALMONELLA</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 ACTIVITES D'EXPERTISE</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2017 .....	5
1.2.1.1 LISTE DES TECHNIQUES DEVELOPPEES.....	5
1.2.1.2 LISTE DES TECHNIQUES EN DEVELOPPEMENT.....	5
1.2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES .....	5
1.2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	6
1.2.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....	6
1.2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE <i>SALMONELLA</i> EN 2017.....	6
1.2.5.1. ACTIVITE DE SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS.....	7
1.2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE .....	8
1.2.6.1 LE CNR A-T-IL EU ACCES A UNE PLATEFORME DE SEQUENÇAGE ? .....	8
1.2.6.2 LE CNR A-T-IL EU ACCES A UNE EXPERTISE BIO-INFORMATIQUE ?.....	8
1.2.6.3 LE CNR A-T-IL FAIT APPEL AUX TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE A DES FINS DE SANTE PUBLIQUE ? .....	8
1.2.6.4 DECRIRE LES OUTILS BIO-INFORMATIQUES ET LES ANALYSES CONDUITES .....	9
1.2.6.5 NOMBRE DE SEQUENCES REALISEES A DES FINS D'INVESTIGATIONS D'ÉPIDEMIES.....	9
1.2.6.6 NOMBRE DE SEQUENCES REALISEES A DES FINS DE SURVEILLANCE.....	9
1.2.6.7 OU SONT DEPOSEES LES SEQUENCES BRUTES (FASTAQ FILES).....	9
<b>1.3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES <i>SALMONELLA</i></b> .....	<b>9</b>
1.3.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES.....	10
1.3.1.1 LE RESEAU DE LABORATOIRES CORRESPONDANTS DU CNR-ESS POUR <i>SALMONELLA</i> .....	10
1.3.1.2 DEFINITION DE L'ÉCHANTILLON DE SOUCHES ISOLEES.....	10
1.3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	11
1.3.2.1 ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES DIFFERENTS SEROTYPES ET ANALYSE DES TENDANCES.....	11
1.3.2.2 FOYERS DE CAS GROUPES A <i>SALMONELLA</i> .....	22
1.3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX.....	24
1.3.3.1 RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES CLINIQUES DE <i>SALMONELLA</i> .....	25
1.3.3.2 SOUCHES DE <i>SALMONELLA</i> PROSEDANT DES GENES DE RESISTANCE PARTICULIERS AUX ANTIBIOTIQUES, DETECTEES AU CNR-ESS.....	25
1.3.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX ET INTERNATIONAUX.....	32
1.3.4.1 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE NATIONALE EN INTERFACE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE .....	32
1.3.4.2 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX, HUMAINE ET VETERINAIRE .....	32
1.3.4.3 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX .....	33
1.3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE .....	34
<b>2/ SHIGELLA</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE</b> .....	<b>37</b>
2.2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2017 .....	37
2.2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES .....	37
2.2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	37
2.2.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....	37
2.2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE.....	38
2.2.5.1 INVENTAIRE GLOBAL DES SOUCHES REÇUES AU CNR-ESS EN 2017 .....	38
2.2.5.2 SOUCHES REÇUES DE FRANCE METROPOLITAINE .....	38
2.2.5.3 SOUCHES REÇUES DES DOM-TOM.....	41
2.2.5.4 FICHES D'INFORMATION REÇUES SANS ENVOI DE SOUCHES .....	41

2.2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE .....	42
<b>2.3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES SHIGELLA.....</b>	<b>42</b>
2.3.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES.....	42
2.3.1.1 RESEAU PARTENAIRE.....	42
2.3.1.2 DISTRIBUTION GLOBALE DES CAS DE SHIGELLOSE EN FRANCE METROPOLITAINE ET DOM-TOM.....	43
2.3.2 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	45
2.3.2.1 ANALYSE DE LA DISTRIBUTION EN FRANCE METROPOLITAINE ET ANALYSE DE TENDANCES.....	45
2.3.2.1.A REPARTITION PAR SEROTYPES.....	45
2.3.2.2 ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DANS LES DOM-TOM ET ANALYSE DE TENDANCES .....	50
2.3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES SHIGELLA AUX ANTIBIOTIQUES.....	53
2.3.3.1 SURVEILLANCE GLOBALE .....	53
2.3.3.2 RESISTANCES EMERGENTES CHEZ SHIGELLA SPP.....	56
2.3.4 INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	59
2.3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE .....	59
<b>3/ ESCHERICHIA COLI.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 ACTIVITES D'EXPERTISE.....</b>	<b>61</b>
3.2.1 ACTIVITE D'EXPERTISE EN 2016 .....	61
3.2.2 INVENTAIRE DES PRELEVEMENTS REÇUS POUR LA RECHERCHE D'EHEC EN 2017 .....	61
3.2.3 BILAN DES ACTIVITES CONCERNANT LES E. COLI ENTERO-HEMORRAGIQUES (EHEC) .....	62
3.2.3.1 ANALYSE DE LA REPARTITION DES SYMPTOMES DONNANT LIEU A UNE ANALYSE DE SELLES, SOUCHES OU SERUMS .....	62
3.2.3.2 RESULTATS OBTENUS SUR LES PRELEVEMENTS DE SELLES EN 2017 .....	63
3.2.3.3 SOUCHES DE E. COLI D'ORIGINE HUMAINE PRODUCTRICES DE SHIGA-TOXINES ISOLEES AU CNR-ESS ET LA-RD EN 2017 .....	64
3.2.3.3.6 ANALYSE DES MLST .....	73
3.2.3.4 ANALYSE DES PRELEVEMENTS (SELLES ET/OU SOUCHES) DANS L'ENTOURAGE DE PATIENTS PRESENTANT UN SHU (LA-RD) .....	74
3.2.3.6 SERODIAGNOSTIC DES SYNDROMES HEMOLYTIQUES ET UREMiques (CNR-ESS).....	74
3.2.4 BILAN DES ACTIVITES 2016 CONCERNANT LES SOUCHES DE E. COLI EXTRA INTESTINALES (EXPEC) (LA-RD).....	75
3.2.4.1 ETUDE DES FACTEURS DE PATHOGENICITE DES SOUCHES DE E. COLI RESPONSABLES DE MENINGITES.....	75
3.2.4.2 ETUDE DES FACTEURS DE PATHOGENICITE DES SOUCHES DE E. COLI EXTRA-INTESTINALES RESPONSABLES DE PATHOLOGIES AUTRES QUE LES MENINGITES .....	76
3.3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES ESCHERICHIA COLI.....	78
3.3.1 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS A EHEC .....	78
3.3.1.1 RESEAU PARTENAIRE.....	78
3.3.1.2 ANALYSE DES CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DES EHEC .....	78
3.3.1.3 RESULTATS MICROBIOLOGIQUES 2017 POUR LES CAS DE SHU PEDIATRIQUES.....	81
3.3.2 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX 2017.....	82
3.3.2.1 SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES EHEC (LA-RD) .....	82
3.3.2.2 SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE E. COLI RESPONSABLES DE PATHOLOGIES EXTRA INTESTINALES (LA-RD) .....	83
3.3.3 PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE .....	83
3.3.3.1 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE NATIONALE EN INTERFACE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE .....	83
3.3.3.3 COLLABORATION AVEC DES PARTENAIRES NATIONAUX EXERÇANT DANS LE DOMAINE ANIMAL, ALIMENTAIRE OU DANS L'ENVIRONNEMENT.....	84
3.3.4 DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS.....	84
3.3.4.1 TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE .....	84
3.3.4.2 DETECTION DES CAS PAR ANALYSE WGS .....	84
<b>4/ ALERTE.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1 CONTRIBUTION A L'ALERTE ET A L'INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX A SALMONELLA EN 2017 .....</b>	<b>85</b>

4.2 CONTRIBUTION A L'ALERTE ET A L'INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX A <i>SHIGELLA</i> EN 2017 .....	86
<b>5/ ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....</b>	<b>87</b>
<b>5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE .....</b>	<b>87</b>
5.1.1 ENSEIGNEMENTS ET FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE .....	87
5.1.2 ACCUEIL DE STAGIAIRES .....	87
5.1.3 LISTE DES GUIDES ELABORES (CONTENU, MODES DE DIFFUSION) .....	88
5.1.4 MODALITES ET CIBLES DE LA DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET DES PRODUCTIONS DU CNR .....	88
5.1.5 ACTIVITES DE CONSEIL AUX PROFESSIONNELS DE SANTE .....	89
<b>5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES .....</b>	<b>89</b>
<b>5.3 CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC ...) .....</b>	<b>89</b>
<b>6/ TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....</b>	<b>90</b>
<b>6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS LORS DE L'ANNEE 2017, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR.....</b>	<b>90</b>
<b>6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE L'ANNEE 2017, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR .....</b>	<b>92</b>
<b>7/ COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX... 95</b>	<b>95</b>
<b>7.1 SALMONELLA.....</b>	<b>95</b>
<b>7.2 ESCHERICHIA COLI.....</b>	<b>95</b>
<b>8.1 APPORTER UNE EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE .....</b>	<b>96</b>
8.1.1 INFECTIONS A <i>E. COLI</i> .....	96
8.1.1.1 INFECTIONS A <i>E. COLI</i> ENTERO-HEMORRAGIQUES .....	96
8.1.1.2 <i>E. COLI</i> RESPONSABLES D'INFECTIONS EXTRA-INTESTINALES (LA-RD) .....	96
8.1.1.3. ETUDE ET SUIVI DE LA RESISTANCE DES SOUCHES DE <i>E. COLI</i> AUX ANTIBIOTIQUES EN LIEN AVEC LE CNR DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (LA-RD) .....	97
8.1.2 INFECTIONS A <i>SHIGELLA</i> .....	98
8.1.3 INFECTIONS A <i>SALMONELLA</i> .....	98
<b>8.2 CONTRIBUER A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE, EN LIEN AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE.....</b>	<b>99</b>
<b>8.3 CONTRIBUER A L'ALERTE EN SIGNALANT A SANTE PUBLIQUE FRANCE, TOUT EVENEMENT INHABITUEL.....</b>	<b>101</b>
<b>ANNEXE 1/ MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR .....</b>	<b>103</b>
<b>A1.1 MISSIONS ET OBJECTIFS DU CNR-ESS ET DE SON LABORATOIRE ASSOCIE A L'HOPITAL ROBERT DEBRE .....</b>	<b>103</b>
<b>A1.2 ORGANISATION DU CNR ET DE SON LABORATOIRE ASSOCIE A L'HOPITAL ROBERT DEBRE .....</b>	<b>105</b>
A1.2.1 LE CNR-ESS: EFFECTIF / QUALIFICATION DU PERSONNEL.....	105
A1.2.2 LE LABORATOIRE ASSOCIE (LA-RD): EFFECTIF / QUALIFICATION DU PERSONNEL .....	107
<b>A1.3 LES LOCAUX ET EQUIPEMENTS.....</b>	<b>107</b>
A1.3.1 CNR-ESS (INSTITUT PASTEUR).....	107
A1.3.2 LA-RD .....	110
<b>A1.4 COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>111</b>
<b>A1.5 DEMARCHE QUALITE.....</b>	<b>111</b>
A1.5.1 DEMARCHE QUALITE DU CNR-ESS .....	111
A1.5.2 DEMARCHE QUALITE DU LA-RD.....	114
<b>ANNEXE 2/ CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>115</b>
<b>A2.1 POUR SALMONELLA.....</b>	<b>115</b>
A2.1.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE .....	115
A2.1.2 LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR.....	117
<b>A2.2 POUR SHIGELLA.....</b>	<b>117</b>
A2.2.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE .....	117
A2.2.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES .....	119
A2.2.3 COLLECTION DE SOUCHES .....	119
A2.2.4 TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR-ESS .....	120
<b>A2.3 POUR ESCHERICHIA COLI.....</b>	<b>120</b>
A2.3.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE .....	120

A2.3.1.1 AU CNR-ESS.....	120
A2.3.1.2 TECHNIQUES DU LA-RD.....	120
A2.3.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES .....	121
A2.3.3 COLLECTION DE SOUCHES .....	121
A2.3.4 TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR-ESS ET LA-RD.....	121
<b>ANNEXE SUPPLEMENTAIRE.....</b>	<b>122</b>

## SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1. Organigramme du CNR-ESS .....	4
Figure 2. Délai de rendu des sérotypages de salmonelles, CNR-ESS 2017 .....	7
Figure 3. Nombre annuel de souches de Salmonella d'origine humaine (total des souches reçues* et fiches d'informations), CNR-ESS, 1983-2017.....	11
Figure 4 : Répartition des souches de Salmonella * et des fiches d'information, 2000-2017.....	12
Figure 5 : Evolution des principaux sérotypes de Salmonella isolés chez l'homme, 1983-2017 .....	15
Figure 6 : Nombre de cas* et incidence* des salmonelloses par départements en 2017, données CNR-ESS.....	18
Figure 7. Organigramme du CNR.....	36
Figure 8: Nombre de cas et incidence des shigelloses par département en France en 2017.....	44
Figure 9 : Evolution des sérogroupe de Shigella (France métropolitaine, 2013-2017).....	47
Figure 10 : Principaux sérotypes de S. flexneri (France métropolitaine, 2013-2017).....	47
Figure 11: Principaux sérotypes de S. flexneri en fonction du sexe du patient (France métropolitaine, 2017) ...	48
Figure 12: Répartition des cas de shigellose par classe d'âge (France métropolitaine, 2017).....	49
Figure 13: Evolution des différents sérogroupe de Shigella spp. (DOM-TOM, 2013-2017).....	51
Figure 14: Evolution des principaux sérotypes de S. flexneri (DOM-TOM, 2013-2017).....	51
Figure 15: Principaux sérotypes de S. flexneri en fonction du sexe du patient (DOM-TOM, 2017).....	52
Figure 16: Répartition des cas de shigellose par âge dans les DOM-TOM en 2017 .....	52
Figure 17: Évolution du nombre de souches de Shigella spp. résistantes à l'azithromycine .....	56
Figure 18: Évolution des BLSE chez Shigella spp.....	58
Figure 19 : Répartition des sérogroupe de EHEC isolés toutes pathologies confondues en 2017 .....	65
Figure 20 : Répartition des sérogroupe de EHEC isolés au cours des SHU/MAT en 2017 .....	65
Figure 21: Distribution des différents profils de virulence des souches de EHEC isolées en 2017 .....	66
Figure 22: Classe d'âge et sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive CNR-ESS et LA-RD 2017.	79
Figure 23: Répartition départementale des souche de EHEC isolées en 2017 (n=250) sur le territoire .....	81
Figure 24: Répartition départementale des sérogroupe O26, O80 et O157 en 2017.....	81

## SOMMAIRE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Nombre de souches et de fiches d'information de salmonelles enregistrées au CNR-ESS en 2017.....</i>	<i>7</i>
<i>Tableau 2 : les 20 principaux sérotypes de Salmonella enregistrés au CNR-ESS au cours des années 2000, 2005, 2010, 2015 à 2017.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 3 : Nombre d'isolements annuels des principaux sérotypes en France de 2012 à 2017.....</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 4 : Répartition par sites de prélèvement de 2012 à 2017.....</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 5 : Distribution par classes d'âge de 2012 à 2017.....</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 6 : Nombre de souches de Salmonella reçues par régions de 2012 à 2017.....</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 7 : Origine géographique des souches de sérotype Typhi de 2012 à 2017.....</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 8: Origine géographique des souches de sérotype Paratyphi A de 2012 à 2017.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 9: Origine géographique des souches de sérotype Paratyphi B de 2012 à 2017.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 10: Foyers de cas groupés de Salmonella de 2012 à 2017.....</i>	<i>23</i>
<i>Tableau 11: Récapitulatif des différents foyers de cas groupés à Salmonella de 2012 à 2017.....</i>	<i>23</i>
<i>Tableau 12: Résistance aux antibiotiques des souches cliniques de Salmonella.....</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 13: Salmonella possédant des gènes codant pour les <math>\beta</math>-lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2017.....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 14 : Salmonella possédant des gènes codant pour des céphalosporinases reçues au CNR-ESS en 2017.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 15 : Salmonella possédant les gènes codant pour des carbapénémases et/ou résistantes aux carbapénèmes reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 16 : Salmonella possédant les gènes codant pour la résistance aux quinolones reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 17 : Salmonella possédant les gènes codant pour la résistance à l'azithromicine reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017.....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 18 : Salmonella possédant les gènes mcr conférant la résistance à la colistine.....</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 19: Distribution par sérotype des souches métropolitaines de Shigella spp. identifiées au CNR-ESS en 2017.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 20: Distribution des différents sérotypes de Shigella spp. reçues des DOM-TOM en 2017.....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 21: Bilan des fiches d'information de Shigella spp. en 2017.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 22: Répartition par site de prélèvement des souches de Shigella spp. reçues au CNR-ESS en 2017.....</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 23: Distribution des différents sérotypes de Shigella spp. entre 2013 et 2017.....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 24: Répartition par sexe des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017.....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 25: Répartition par classe d'âge des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017.....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 26: Incidence des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017.....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 27: Répartition par sexe des cas de shigellose dans les DOM-TOM en 2017.....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 28 : Incidence des cas de shigellose dans les DOM-TOM en 2017.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 29: Antibiotiques utilisés pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de Shigella spp.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 30: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de Shigella (France métropolitaine, 2017).....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 31: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de Shigella (DOM-TOM, 2017).....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 32: Caractérisation des principaux gènes de résistance aux antibiotiques détectés par WGS chez Shigella spp. en 2017.....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 33: Caractérisation des gènes de résistance détectés par WGS chez Shigella spp. (DOM-TOM, 2017).....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
<i>Tableau 34: Répartition des différents types de prélèvements, origine et nombre reçus au CNR-ESS et au LA-RD pour E. coli, année 2017.....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 35 : Les différents types de prélèvements.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau 36: Symptômes donnant lieu à une recherche de EHEC, souches, selles et sérums reçus au CNR-ESS et au LA-RD, année 2017.....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 37: Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les plus fréquemment isolés au CNR- ESS et au LA-RD en 2017.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 38: Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les moins fréquemment isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 39: Profil de virulence des EHEC non sérogroupables isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 40: Profil de virulence déterminé directement par PCR sur les selles sans isolement de souches. CNR-ESS et LA-RD 2017.....</i>	<i>68</i>

<i>Tableau 41: Résultats du sérogroupage par PCR directe sur selles en 2017 (LA-RD)</i> .....	69
<i>Tableau 42 : répartition globale des variants stx</i> .....	69
<i>Tableau 43: Répartition des profils de variants en fonction des sérogroupe de EHEC les plus fréquents des souches isolées au CNR-ESS et au LA-RD en 2017</i> .....	70
<i>Tableau 44: Répartition des profils de variants en fonction des sérogroupe de EHEC les plus rares isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017</i> .....	70
<i>Tableau 45: La répartition des variants en fonction du sérogrupe</i> .....	71
<i>Tableau46: Détails cliniques, sérotype et profil de virulence des souches porteuses du gène saa. CNR-ESS et LA-RD 2017</i> .....	72
<i>Tableau 47: Détails cliniques, sérotype et profil de virulence des souches porteuses du gène subA. CNR-ESS et LA-RD 2017</i> .....	73
<i>Tableau 48 : La répartition des ST en fonction du sérogrupe</i> .....	73
<i>Tableau 49: Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS positive</i> .....	74
<i>Tableau 50: Facteurs de virulence des E. coli responsables de méningites en 2016 (LA-RD)</i> .....	76
<i>Tableau 51: Caractéristiques des souches de ExpEC hors méningites en 2017 LA-RD</i> .....	77
<i>Tableau 52: Principal symptôme observé chez les patients ayant une recherche de EHEC positive (isolement d'une souche ou PCR positive). CNR ESS-LA 2017</i> .....	78
<i>Tableau 53: Répartition des différents sérogroupe de EHEC (souches isolées) par classe d'âge et par sexe des patients. CNR-ESS et LA-RD 2017</i> .....	79
<i>Tableau 54: Prévalence de la résistance (%) aux antibiotiques des souches EHEC en 2017 (LA-RD)</i> .....	82
<i>Tableau 55: CMI à l'azithromycine des souches EHEC isolées en 2017 au LA-RD</i> .....	83
<i>Tableau 56: Prévalence de la résistance (%) aux antibiotiques des souches EXPEC (2017, LA-RD)</i> .....	83

## Résumé analytique

Depuis le 1<sup>er</sup> avril 2017, date de début du nouveau mandat des CNR, l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques de l'Institut Pasteur héberge le CNR *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS). Le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Robert Debré, Paris (LA-RD) est le laboratoire associé au CNR-ESS pour les activités *E. coli*.

---

### *Salmonella*

Au cours de l'année 2017, le CNR-ESS a enregistré **11487** isollements de salmonelles (contre 10545 en 2016). Ceux-ci se répartissaient en **8159** souches de salmonelles typées (contre 9045 en 2016), **1600** souches non typées et **1728** fiches d'information (contre 1500 en 2016).

Depuis le nouveau mandat, le séquençage du génome entier (WGS) est devenu la technique de routine pour la surveillance et l'investigation des épidémies à *Salmonella*. Ainsi en 2017, 6046 souches ont été typées par WGS, soit 74% de l'ensemble des souches annuelles typées. Les autres souches typées l'ont été par sérotypage.

Plusieurs épidémies ont été détectées et investiguées dont certaines avec un fort retentissement médiatique (*Salmonella* Agona dans les poudres de lait infantile)

---

### *Shigella*

Au cours de l'année 2017, le CNR-ESS a reçu 1163 souches, dont 997 ont été confirmées comme étant des *Shigella* spp., toutes d'origine humaine (une souche par patient). Parmi ces 997 souches, 855 provenaient de France métropolitaine et 142 des DOM (92 souches de Guyane, 49 souches de Mayotte, et une souche de La Réunion). De plus, 214 cas de shigellose de France métropolitaine ont été signalés au CNR-ESS par l'intermédiaire de fiches d'information. En compilant les souches reçues et les souches déclarées dans les fiches d'information et après élimination des doublons, **un total de 1211 cas de shigellose a été répertorié au CNR-ESS en 2017.**

En mai 2017, le CNR-ESS, avec Santé publique France, a étudié une épidémie à *Shigella sonnei* g dans une école primaire à Macau (Gironde), avec 53 cas détectés. La souche épidémique était multi-résistante aux antibiotiques avec notamment une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, aux fluoroquinolones et à l'azithromycine.

---

### *E. coli*

En 2017, un total de 1423 prélèvements, dont 985 prélèvements de selles, 304 souches de *E. coli* ainsi que, 108 sérums au cours du premier trimestre uniquement. Le nombre de souches analysées est en constante diminution (304 versus 499 en 2016, 711 en 2015, 926 en 2014, 1124 en 2013) contrairement au nombre de selles analysées (985 versus 970 en 2016, 785 en 2015, 750 en 2014, 736 en 2013). En 2017, 250 souches d'EHEC ont été isolées et caractérisées par WGS. Les sérogroupes majoritairement isolés en France en 2017, au cours des SHU, sont le serogroupe O157 (28,8%), le serogroupe O80 (25,2%) et le serogroupe O26 (22,5%).

Une toxi-infection alimentaire collective survenue dans le Jura en octobre 2017, impliquant 44 cas parmi 150 participants a été étudiée et a mis en évidence une infection mixte à une salmonelle 4,5,12 :i :- (monophasique) et un STEC appartenant au serotype rare O8:H19.

## Analytic summary

Since April 1<sup>st</sup> 2017, the starting date of the new mandate for the National Reference Centres (NRCs), the Enteric Bacterial Pathogens Unit at the Institut Pasteur hosts the NRC for *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella* (CNR-ESS). The Bacteriology Laboratory at hospital Robert Debré, in Paris (LA-RD) acts as the associated laboratory for the activities on *E. coli*.

---

### *Salmonella*

In 2017, the CNR-ESS registered **11487** *Salmonella* spp. isolates (versus 10545 in 2016). Of those 11487 isolates, **8159** were typed (9045 in 2016), **1600** were not typed, and **1728** notifications were received (versus 1500 in 2016).

Since April 1<sup>st</sup> 2017, whole-genome sequencing (WGS) has been used as the routine technique for surveillance and outbreak investigation on *Salmonella*. Hence, 6046 isolates were typed by WGS in 2017, representing 74% of all typed isolates. The remaining typed isolates were serotyped.

In 2017, the CNR-ESS participated in the detection and investigation of several outbreaks including one outbreak of *Salmonella* Agona linked to the consumption of infant formula, and which was under heavy media scrutiny.

---

### *Shigella*

In 2017, the CNR-ESS received 1163 human isolates (one per patient), 997 of which were confirmed as *Shigella* spp. Of those 997 isolates, 855 were sent from laboratories in Metropolitan France, whereas 142 s were sent from the overseas regions (92 isolates from Guyane, 49 from Mayotte, and one from La Réunion). The CNR-ESS also received notifications of 214 cases of shigellosis, that were typed by local laboratories from Metropolitan France. Altogether, a total of 1211 cases of shigellosis was registered by the CNR-ESS in 2017.

In May 2017, the CNR-ESS, participated in the investigation of an outbreak of *Shigella sonnei* g in a primary school in Macau (Gironde), where 53 cases were detected. The outbreak strain was multiresistant to antibiotics, including extended-spectrum cephalosporins, fluoroquinolones, and azithromycin.

---

### *E. coli*

In 2017, a total of 1423 samples, including 985 stool samples, 304 *E. coli* strains and 108 sera (in the first trimester only for the sera) were received. The number of strains analyzed is constantly decreasing (304 versus 499 in 2016, 711 in 2015, 926 in 2014, 1124 in 2013), compared to the number of stools analyzed (985 versus 970 in 2016, 785 in 2015, 750 in 2014, 736 in 2013). In 2017, 250 strains of EHEC were isolated and characterized by WGS. Serogroups mainly isolated in France in 2017, during HUS, are serogroup O157 (28.8%), serogroup O80 (25.2%) and serogroup O26 (22.5%).

An outbreak community-acquired foodborne illness occurred in the Jura in October 2017, involving 44 cases among 150 participants. Two strains causing the outbreak were isolated: a monophasic *Salmonella* 4,5,12 :i :- and a rare STEC O8:H19.

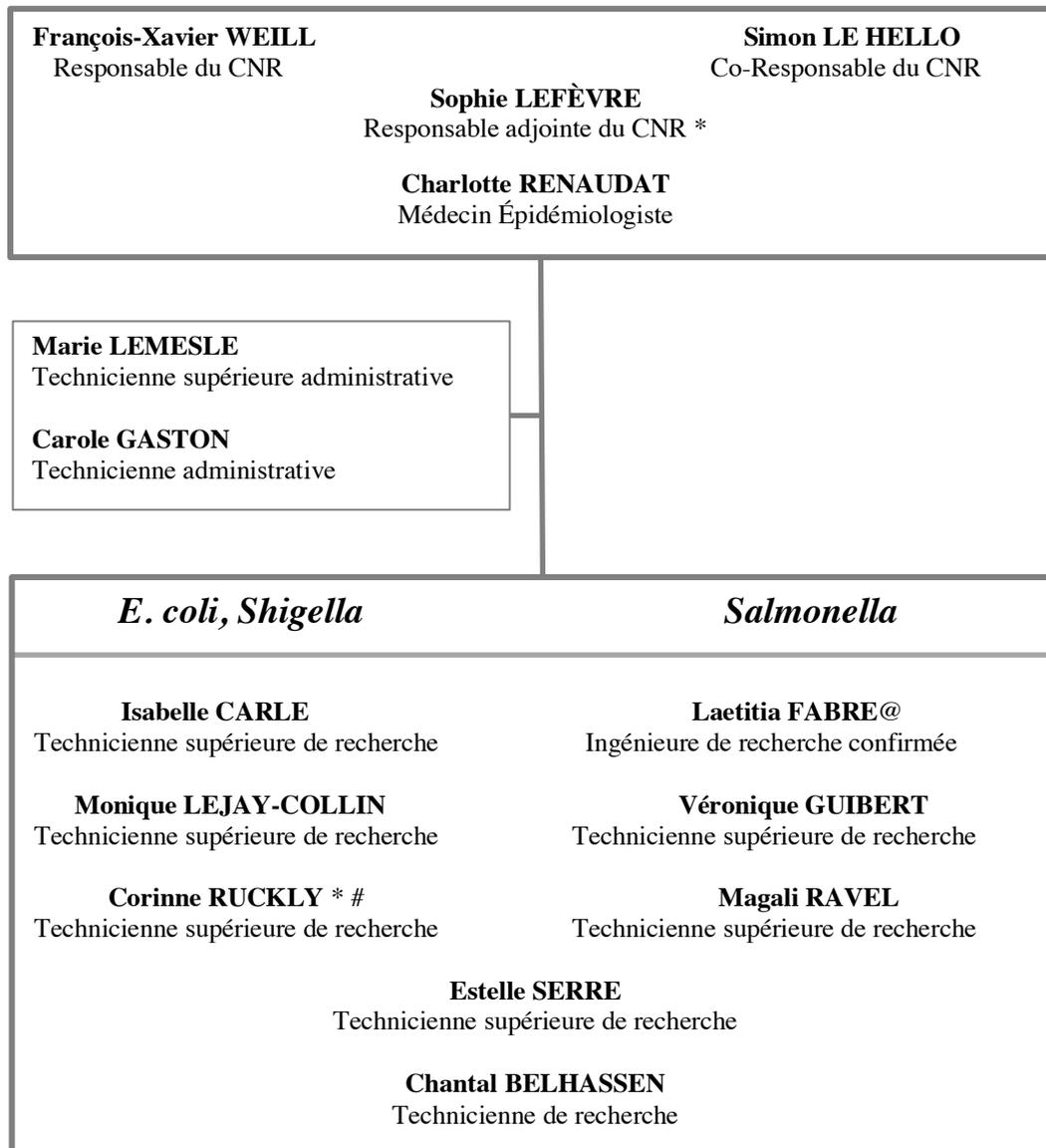
*Salmonella*

# 1/ *Salmonella*

## 1.1 Missions et organisation du CNR

Les missions et organisation du CNR sont présentées en annexe 1 du présent rapport.

Figure 1. Organigramme du CNR-ESS



@ Correspondant Hygiène et Sécurité

\* Correspondant Qualité du CNR

# Correspondant Métrologie et Matériel du CNR

## 1.2 Activités d'expertise

Les techniques de référence et disponibles au CNR sont présentées en annexe 2 du présent rapport.

## 1.2.1 Évolution des techniques au cours de l'année 2017

### 1.2.1.1 Liste des techniques développées

Le **sérotypage classique par agglutination** reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2600 sérotypes. De nombreuses techniques moléculaires permettaient de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique. Il s'agissait des techniques suivantes : **l'analyse MLST** (Multilocus sequence typing), **le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB*** et **l'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dont **une application CRISPOL**, méthode de sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques, avait été mise au point par le CNR-ESS (Fabre *et al.* PloS One 2012).

### 1.2.1.2 Liste des techniques en développement

Grâce à cette expertise et à ces bases de données, un dictionnaire sérotype/types moléculaires (ST, CRISPR) a été élaboré. Le sérotype peut maintenant être inféré à partir des séquences de génome entier (WGS pour whole-genome sequencing) et effectué en routine au CNR-ESS depuis le nouveau mandat (1<sup>er</sup> avril 2017) et a permis l'arrêt des anciennes méthodes moléculaires très largement utilisées auparavant pour sous-typer les souches telles la macrorestriction ADN par **électrophorèse en champ pulsé** (ou PFGE pour pulsed-field gel electrophoresis), **l'analyse MLVA** (pour Multi Locus VNTR [variable numbers of tandem repeats]) Analysis), le **MLST** par analyse PCR et **la méthode CRISPOL** par analyse Luminex.

En effet, le WGS prend une place prépondérante dans l'investigation microbiologique des populations de *Salmonella* que ce soit à l'échelle locale ou internationale. Les investigations des souches épidémiques ou sporadiques sont facilitées par une analyse des sites nucléotidiques polymorphiques du core-génome (SNPs pour single nucleotide polymorphisms) ou du génome accessoire (prophages, plasmides, îlots de virulence). Il permet aussi d'avoir une vue sur le résistome (l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques acquis) et sur le virulome (l'ensemble des gènes de virulence).

## 1.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2017, une technique MLVA pour le sérotype Dublin a été proposée (Vignaud *et al.* Front Microbiol 2017) et une autre pour Enteritidis a été validée (Peters *et al.* Euro Surveill 2017).

Chapitre 2 Une évaluation du **kit multiplex entérique** « Bacterial GE Mobidiag<sup>®</sup> » a été réalisée sur 149 souches de *Escherichia coli* (tous pathovars), 60 *Shigella* (tous sérotypes et biotypes), 90 *Salmonella* (couvrant la diversité d'espèce et sous-espèces) et 10 souches autres que *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*. L'objectif était de s'assurer que les PCR détectaient l'ensemble des variants des gènes ciblés (*eae*, *stx*, *aggR*, *invA*, *ipaH*...). Une présentation des résultats a été effectuée lors de la Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) en décembre 2017.

### 1.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

L'analyse MLVA pour le sérotype Typhimurium et Enteritidis étant standardisée sur le plan international, le CNR-ESS aide à sa mise en place sur demande de laboratoires français et étrangers.

La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques a été transféré au Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES, Maisons-Alfort).

Les analyses génomiques sont partagées avec l'ANSES et les autres pays membres participants au réseau européen de l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).

### 1.2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique sont présentées en annexe 1 du présent rapport.

### 1.2.5 Activités d'expertise *Salmonella* en 2017

Depuis le nouveau mandat (effectif depuis le 1er avril 2017), la surveillance microbiologique réalisée sur les salmonelles s'effectue d'abord par WGS. Afin de respecter les contraintes budgétaires, celui-ci n'est dorénavant réalisé que sur un échantillon de souches reçues du réseau national du CNR. En 2017, le CNR-ESS n'a donc pas réalisé le sérotypage systématique de la totalité des souches de *Salmonella* reçues des laboratoires collaborateurs de son réseau. Il a cependant continué à enregistrer les informations envoyées par les laboratoires collaborateurs ayant sérotypé localement leurs souches (**tableau 1**).

Au total, en 2017 le CNR-ESS a enregistré **11487** isollements de salmonelles en 2017 (contre 10545 en 2016). Celles-ci se répartissaient en **8159** souches de salmonelles qui ont été typées (contre 9045 en 2016), **1600** souches non typées et **1728** fiches d'information (contre 1500 en 2016).

Par ailleurs, depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2015, les souches redondantes (ou « doublons ») c'est-à-dire issues d'un même patient, d'un même type prélèvement et d'un même laboratoire sur une période de moins de 8 semaines ne sont plus analysées. En 2017, 172 doublons « souches » ont été identifiés. Selon la même méthode 191 doublons « fiches » ont également été exclus de l'analyse. Au total 2,1% des souches et 9,9% des fiches ont été reçus en doublon (contre 1,9% et 5,6% en 2016).

Il est à noter que 78 souches envoyées pour sérotypage de *Salmonella* se sont avérées être des bactéries autres que *Salmonella*.

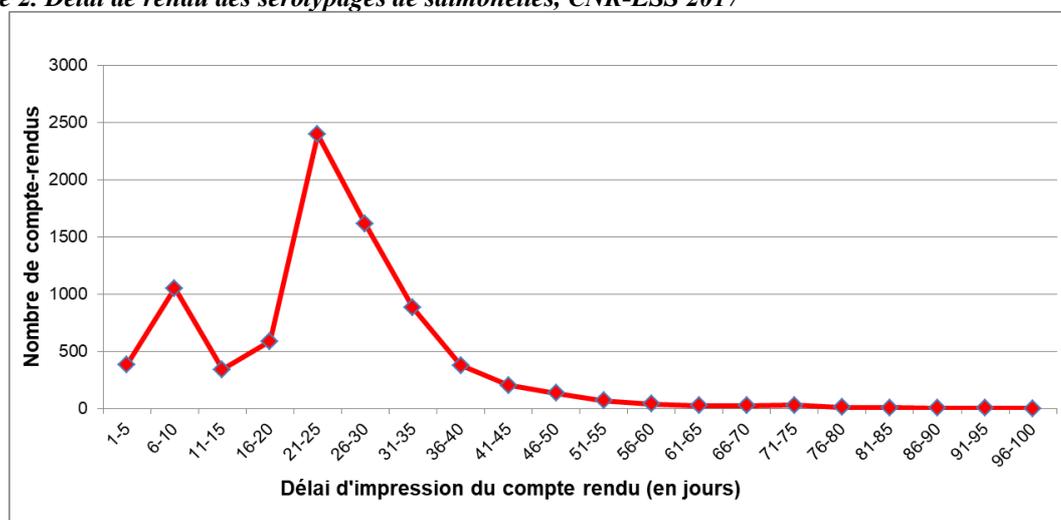
Le CNR-ESS a également réalisé le sérotypage de 114 souches non humaines isolées chez l'animal, dans des aliments ou dans l'environnement, en France et à l'étranger. Les souches ont été envoyées principalement par le laboratoire de sécurité des aliments de l'ANSES, Maisons-Alfort et d'autres laboratoires vétérinaires (publics et privés).

**Tableau 1 : Nombre de souches et de fiches d'information de salmonelles enregistrées au CNR-ESS en 2017**

Type d'enregistrement (humain dans le cadre de l'activité CNR)	N
Nombre total de souches sérotypées par le CNR-ESS	<b>8159</b>
sérotypes obtenus par agglutination	2113
sérotypes obtenus par WGS	5628
sérotypes obtenus par agglutination et WGS	418
Nombre de souches reçues et non typées (bouffée saisonnière)	<b>1600</b>
Nombre de souches reçues en doublon (exclues)	172
Nombre de souches reçues de « bactéries autres que <i>Salmonella</i> » (exclues)	78
<b>Nombre total de souches reçues</b>	10009
<b>Nombre de souches déclarées en ligne (« Fiches d'information »)</b>	<b>1728</b>
<b>Nombre de salmonelles annuelles dont le type est connu (souches + fiches)</b>	9887
<b>Nombre de souches de salmonelles reçues (typées ou non)</b>	9759
<b>Nombre total de salmonelles enregistrées</b>	<b>11487</b>

Le délai moyen de restitution des résultats de sérotypage du CNR aux laboratoires a été de 24,2 jours (médiane à 24 jours) avec des extrêmes entre 1 et 144 jours. Ce délai de restitution dépendait de la technique utilisée avec 2 pics, un à 6-10 jours et un à 21-25 jours (**figure 2**). La partie des résultats restitués en moins de 10 jours correspondait aux souches sérotypées par agglutination n'ayant posé aucun problème technique (si sérotype rare ou nouveau, ce délai pouvait être très important) alors que les résultats rendus majoritairement entre 21-25 jours correspondaient aux types obtenus par WGS.

**Figure 2. Délai de rendu des sérotypages de salmonelles, CNR-ESS 2017**



#### 1.2.5.1. Activité de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

Cette activité régulière permet de suivre les profils de résistance aux antibiotiques parmi une sélection d'isolats cliniques de *Salmonella*. En 2017, **986 souches de *Salmonella* ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques**, par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par une approche semi-automatisée (sensititre, Trek) en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM\_EUCAST ; communiqué 2016). Les résultats font l'objet d'un chapitre spécifique (**paragraphe 1.3.3**).

## 1.2.6 Activités de séquençage

### 1.2.6.1 Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

Oui, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

### 1.2.6.2 Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Comme la demande est très supérieure à l'offre (1,2 Equivalents-Temps-Plein (ETP) dédié), les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié.

Concernant le CNR-ESS, une ingénieure de recherche (Laetitia Fabre) est dédiée à 50% afin de faire le lien entre la Plate-forme pour la phase pré- et post-analytique (organisation pour la préparation des échantillons, vérification de la qualité des séquences, écriture de scripts automatiques, formation de l'équipe du CNR-ESS, phylogénies).

Les analyses de génotypage en routine sont réalisées par BLAST contre des banques de données internes (*fliC*, *fliB*, CRISPOL) ou publiques (MLST 7 gènes d'Enterobase <http://enterobase.warwick.ac.uk>, resistome, virulome du Center for Genomic Epidemiology <http://www.genomicepidemiology.org/>). Ces génotypes sont obtenus à l'aide de scripts écrits en interne et automatisés au sein d'un pipeline propre au CNR-ESS.

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

Oui, le WGS est devenu la technique de première ligne au CNR-ESS. Les données sont utilisées tant pour la surveillance que pour les investigations d'épidémies. Le CNR-ESS a proposé son expertise pour les laboratoires vétérinaires et/ou étrangers lors d'investigations d'épidémies nationales ou internationales (voir paragraphe Alerte). Par exemple, lors de l'épidémie à *S. enterica* sérotype Agona liée à de la poudre de lait infantile, l'approche génomique a permis d'effectuer une investigation microbiologique immédiate dans le but de

confirmer l'identité de la souche chez les nourrissons puis de la relier à celle de l'épisode de 2005. Enfin, le CNR-ESS a séquencé et/ou analysé les souches et/ou séquences isolées du côté vétérinaire et des pays étrangers concernés.

#### 1.2.6.4 Décrire les outils bio-informatiques et les analyses conduites

En plus du génotypage de routine décrit précédemment, des méthodes de mapping (bowtie2, samtools, RAxML, IQ-tree, logiciels disponibles sur le cluster) et/ou de cgMLST (Enterobase) sont utilisées pour l'analyse des séquences génomiques.

#### 1.2.6.5 Nombre de séquences réalisées à des fins d'investigations d'épidémies

Toutes les souches impliquées dans une épidémie sont séquencées. Ainsi lorsqu'un phénomène est détecté, les souches qui ont été initialement sérotypées sont ensuite séquencées.

#### 1.2.6.6 Nombre de séquences réalisées à des fins de surveillance

En 2017, le CNR-ESS a généré 6046 séquences de salmonelles à des fins de surveillance ou d'investigation, soient 74% des souches analysées et 62% des souches reçues.

#### 1.2.6.7 Où sont déposées les séquences brutes (fastaq files)

Toutes les séquences brutes sont dans des bases au CNR-ESS. Elles sont déposées sur des banques de données publiques telles le European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) ou Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) dans le cadre d'investigations d'épidémie sur le plan international ou de publications scientifiques. Les nouveaux allèles MLST sont assignés par Enterobase après soumission des données brutes (« short-reads »).

### 1.3 Activités de surveillance des *Salmonella*

En 2017,

- le séquençage du génome entier (WGS) est devenu la technique de routine utilisée par le CNR-ESS pour la surveillance et l'investigation des épidémies à *Salmonella* : 6046 séquences ont été générées à des fins de surveillance, soit 74% des souches analysées
- les laboratoires ont désormais un accès à une plate forme web leur permettant de déclarer les fiches de renseignement (<https://epidemiopasteur.fr/salm-shig>), 39% des fiches ont été saisies par les laboratoires eux-mêmes, une communication est lancée afin d'accélérer le processus de dématérialisation
- la diminution du sérotype Typhimurium comme responsable de salmonelloses humaines est confirmée, laissant la place à son variant monophasique et à Enteritidis
- une épidémie internationale à sérotype Agona est survenue chez les enfants de moins de 1 an ayant consommé de la poudre de lait infantile. La détection et l'investigation microbiologique ont été réalisées par le CNR-ESS.

### 1.3.1 Description du réseau de partenaires

#### 1.3.1.1 Le réseau de laboratoires correspondants du CNR-ESS pour *Salmonella*

L'Unité des Entérobactéries à l'Institut Pasteur (Paris) a été renommée en 2001 « Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes » (BBPE) puis Laboratoire des Bactéries Pathogènes Entériques (LBPE) le 1<sup>er</sup> janvier 2008 et, depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2010, Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques (UBPE). Cette unité a développé, depuis le début des années 1950 sous l'impulsion de Léon Le Minor, un réseau de laboratoires collaborant sur une base volontaire à la surveillance des infections dues aux entérobactéries (*Salmonella*, EPEC et *Shigella*). De nombreux directeurs de laboratoires de biologie médicale (LBM) correspondants sont des anciens élèves des cours de l'Institut Pasteur.

Ce réseau de surveillance par les LBM est unique en France pour plusieurs raisons :

- son ancienneté (depuis l'après-guerre),
- le nombre important et stable de LBM participants,
- l'adhésion volontaire des LBM au système de surveillance des infections dues aux *Salmonella*, soit par l'envoi de souches pour sérotypage, soit par l'envoi de compte rendu de sérotypage si celui-ci a été fait dans le laboratoire expéditeur (fiche d'information).

La participation des LBM est essentielle à la surveillance des infections dues aux *Salmonella* survenant en France. Sa pérennité dans la durée est une préoccupation de tous les instants pour les biologistes du CNR-ESS : conseils techniques par téléphone ou réponse aux demandes précises des LBM (bibliographie, données épidémiologiques...).

**En 2017, 1097 LBM** de France métropolitaine et des DOM-TOM (contre 1185 en 2016) ont adressé au CNR-ESS, 9759 souches de *Salmonella* qui ont été typées (8159) ou non (1600). Ils se répartissaient en **398 laboratoires de centres hospitaliers** (contre 397 en 2016) envoyant 3351 souches (contre 3089 en 2016) et **699 LBM privés** (contre 788 en 2016) envoyant 6408 souches (contre 5956 en 2016). Le nombre de laboratoires du réseau est stable depuis 2003 pour les centres hospitaliers mais en diminution pour les LBM privés. Le regroupement d'activité des laboratoires qui s'est amplifié ces dernières années sous forme de plate-formes de biologie a pour conséquence une diminution des LBM en France mais une augmentation des souches envoyées au CNR-ESS.

#### 1.3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Le CNR-ESS participe à la surveillance des salmonelloses en effectuant le typage soit par sérotypage classique soit par séquençage du génome entier sur les souches de *Salmonella* envoyées par les laboratoires collaborateurs du réseau du CNR-ESS et en collectant les informations sur les souches dont le sérotype a été déterminé localement par les laboratoires du réseau du CNR-ESS.

Les souches sont adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs après isolement et identification bactérienne. Celles-ci doivent impérativement être accompagnées d'une fiche de renseignements précisant les caractéristiques épidémiologiques et cliniques associées à l'isolement. Si nécessaire, le CNR-ESS recontacte le laboratoire collaborateur pour obtenir les informations manquantes. En 2017, le CNR-ESS a effectué 424 demandes téléphoniques pour obtenir les informations nécessaires à l'enregistrement de la souche à sa réception (soit

4,3% des souches reçues) et édité 1313 non-conformités (soit 13% des souches reçues) en rapport avec des informations épidémiologiques ou administratives manquantes ou erronées (jusqu'à 3 non-conformités différentes pouvant être enregistrées pour un même dossier). La collecte des informations sur les souches non envoyées au CNR-ESS se fait soit via une fiche d'information renseignée par les laboratoires correspondants et adressée au CNR-ESS par fax, e-mail ou voie postale, soit par déclaration en ligne (<https://epidemiopasteur.fr/salmshig>). En 2017, les laboratoires correspondants ont été encouragés à déclarer leurs souches en ligne (39% de fiches ont été renseignées en ligne par les laboratoires en 2017).

Jusqu'en 2016, le CNR-ESS sérotypait de façon exhaustive l'ensemble des souches reçues mais en 2017 il a été nécessaire de réaliser une sélection des souches, principalement pendant la période des bouffées saisonnières, afin de privilégier le WGS et ce dans les limites budgétaires imposées. Ainsi, 1600 souches ont été écartées de tout typage, soit 16,4% des souches reçues (les doublons ont été exclus de ce calcul).

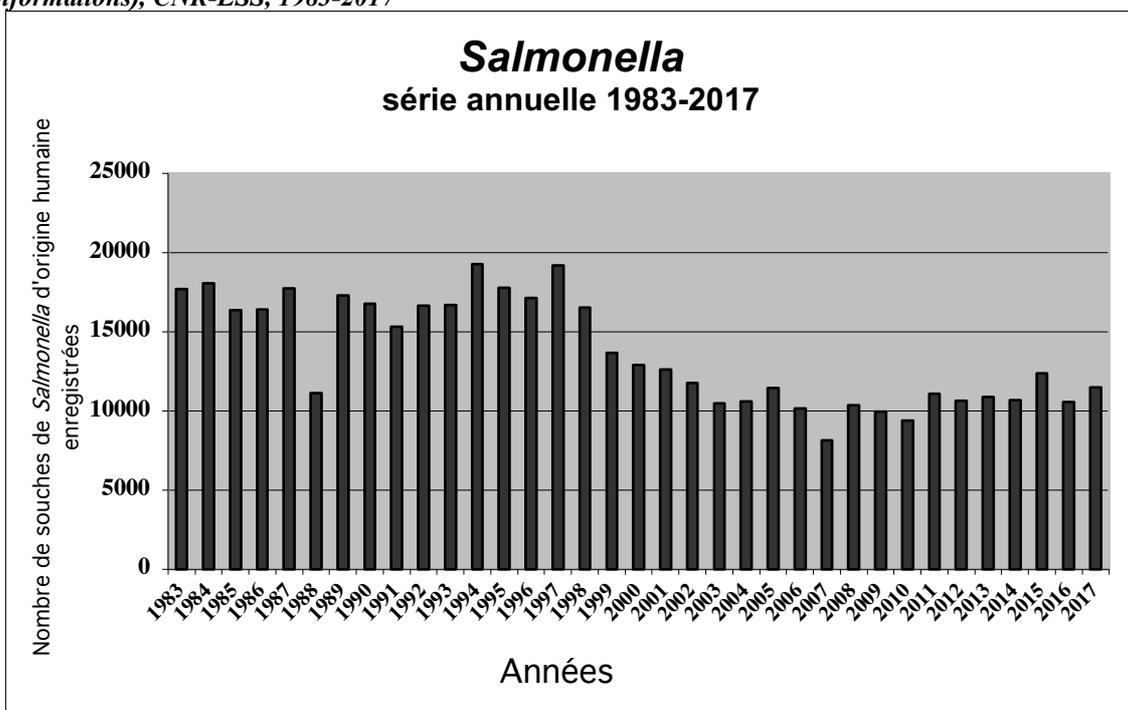
### 1.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

#### 1.3.2.1 Analyse de la distribution des différents sérotypes et analyse des tendances

En 2017, le CNR-ESS a enregistré **11487** isollements humains de *Salmonella* en France métropolitaine, dans les DOM-TOM et à Monaco. Parmi ces **11487** isollements, **9759** ont été des souches reçues au CNR-ESS, dont nous avons obtenu le type pour **8159** d'entre elles, et **1728** provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

##### 1.3.2.1.1 Nombre annuel de Salmonella répertoriées au CNR-ESS

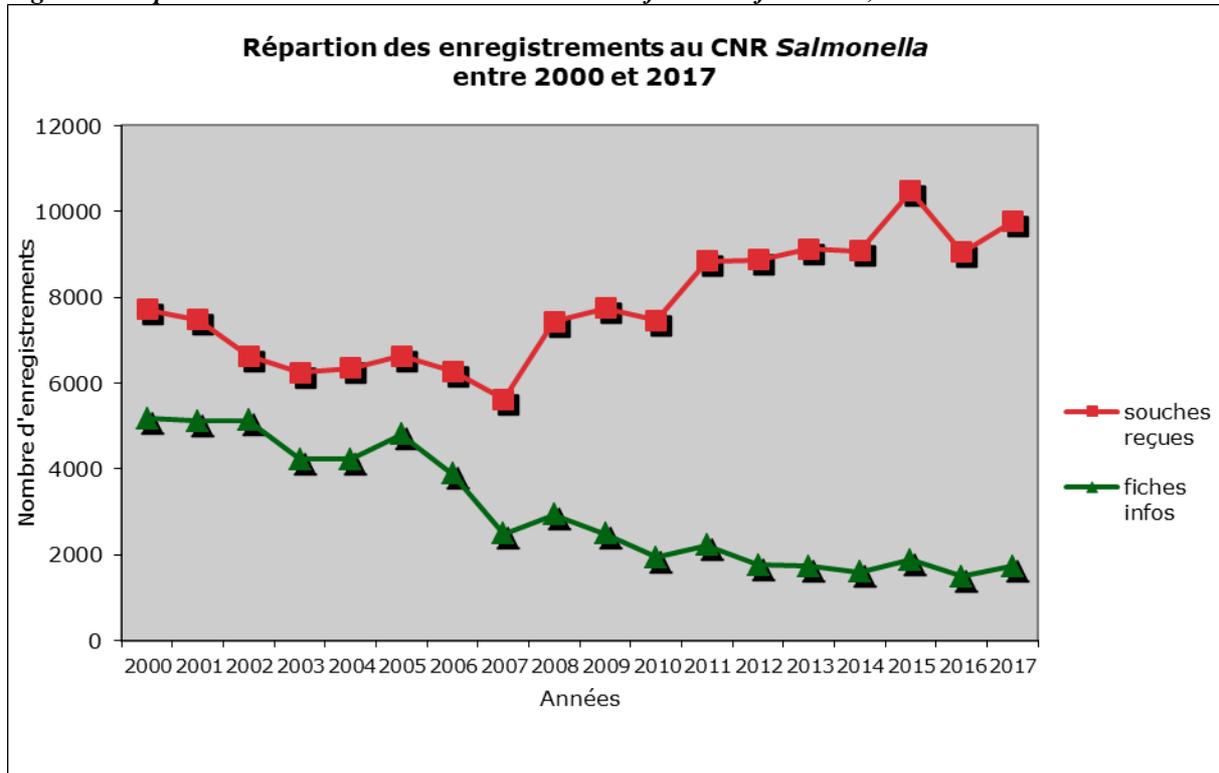
**Figure 3. Nombre annuel de souches de Salmonella d'origine humaine (total des souches reçues\* et fiches d'informations), CNR-ESS, 1983-2017**



\*Comprenant les 1600 souches reçues et non sérotypées.

Depuis 2003, le nombre d'enregistrements de *Salmonella* au CNR-ESS est stable, autour de 10000. Cependant, la proportion de souches reçues est en nette progression par rapport aux fiches d'information.

**Figure 4 : Répartition des souches de *Salmonella* \* et des fiches d'information, 2000-2017**



\*Comprenant les 1600 souches reçues et non sérotypées.

### 1.3.2.1.2 Répartition des 20 principaux sérotypes de *Salmonella*

**Tableau 2 : les 20 principaux sérotypes de *Salmonella* enregistrés au CNR-ESS au cours des années 2000, 2005, 2010, 2015 à 2017**

Rang	Distribution des sérotypes (n) par année				
	2000*	2005*	2010*	2016*	2017**
1	Enteritidis (4656)	Typhimurium (3992)	Typhimurium (3027)	Enteritidis (2651)	Enteritidis (2109)
2	Typhimurium (3800)	Enteritidis (3638)	Enteritidis (1711)	Typhimurium (2071)	<u>1,4,[5],12:i:-</u> (2101)
3	Hadar (787)	Agona (274)	<u>1,4,[5],12:i:-</u> (1098)	<u>1,4,[5],12:i:-</u> (1958)	Typhimurium (1919)
4	Virchow (321)	Infantis (210)	Kentucky (208)	Infantis (251)	Infantis (212)
5	Heidelberg (226)	Typhi (187)	Newport (191)	Panama (174)	Typhi (159)
6	Infantis (209)	Derby (158)	Typhi (181)	Kentucky (170)	Newport (154)
7	Brandenburg (187)	Hadar (147)	Derby (167)	Newport (158)	Kentucky (136)
8	Derby (164)	Virchow (142)	Panama (148)	Typhi (157)	Derby (130)
9	Typhi (152)	Newport (133)	Infantis (128)	Dublin (143)	Chester (98)
10	Newport (137)	Panama (124)	Napoli (100)	Chester (113)	Panama (100)
				Derby (113)	
11	Panama (125)	<u>1,4,[5],12:i:-</u> (101)	Dublin (81)		Dublin (98)
12	Dublin (105)	Manhattan (95)	Hadar (76)	Saintpaul (104)	Agona (97)
13	Indiana (87)	Napoli (93)	Corvallis (70)	Paratyphi B Java (90)	Saintpaul (81)
14	Blockley (83)	Indiana (86)	Kottbus (66)	Napoli (82)	Weltevreden (78)
			Virchow (66)		
15	<u>1,4,[5],12:i:-</u> (75)	Brandenburg (82)		Poona (81)	Napoli (76)
16	Bredeney (63)	Dublin (73)	Saintpaul (64)	Hadar (76)	Virchow (62)
17	Bovismorbificans (58)	Manhattan (62)	Montevideo (61)	Weltevreden (73)	Kottbus (54)
					Stanley (54)
18	Livingstone (56)	Worthington (55)	Rissen (60)	Agona (68)	
19	Montevideo (51)	Kentucky (48)	Bovismorbificans (59)	Virchow (60)	Javiana (53)
20	Agona (50)	Dublin (45)	Brandenburg (56)	Paratyphi A (58)	Poona (52)
					Rissen (52)

\*données incluant les souches adressées au CNR-ESS *Salmonella* et les fiches d'information.

\*\* En 2017, 1600 souches reçues au CNR-ESS mais non sérotypées n'ont pas été prises en compte.

De 2005 à 2015, le sérotype prédominant était Typhimurium alors que le sérotype Enteritidis était en baisse constante pour n'occuper que la 3ème place en 2011. Depuis 2016, le sérotype Enteritidis reprend la première place des sérotypes responsables des salmonelloses humaines. Cela est principalement dû à une diminution du sérotype Typhimurium. Cette diminution reste inexpiquée ; elle est homogène au regard des régions d'isolement, du sexe et de l'âge du patient. Le sérotype de formule antigénique 1,4,[5],12:i:- (variant monophasique de Typhimurium) a pris une place prépondérante parmi les isollements de salmonelles en France. Il est en constante augmentation d'année en année depuis 2008 (principalement dû à la dissémination internationale du clone multi-résistant aux antibiotiques, 4,5,12:i:-). Le sérotype Kentucky est aussi un sérotype émergent, associé à des souches hautement résistantes aux fluoroquinolones. D'autres sérotypes correspondent à une source connue pour lesquelles des mesures ne sont pas encore efficaces, comme Chester (filère aviaire du Maroc), Dublin (filère bovine), Derby (filère porcine). En 2017, certaines augmentations de

sérotype ont été liées à des épidémies nationales et/ou internationales, il s'agit des sérotypes Agona et Kottbus (voir paragraphe 1.3.4).

### 1.3.2.1.3 Proportion de souches de *Salmonella* par rapport aux fiches d'information

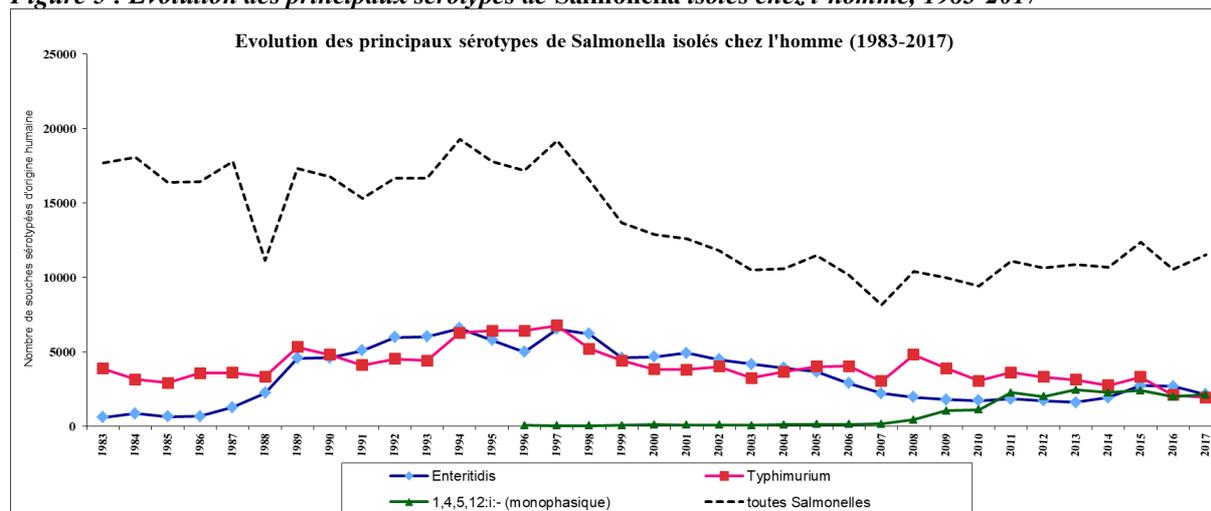
La part représentée par les fiches d'information (ou comptes-rendus de sérotypage, soit envoyés au CNR-ESS soit déclaré en ligne sur la plate-forme internet du CNR-ESS) dans le total des isollements de *Salmonella* enregistrés au CNR-ESS est en constante diminution depuis 2005. Elle ne représente en 2017 que 15% des isollements enregistrés (tous sérotypes confondus) alors qu'elle était supérieure à 40% avant 2005. Les sérotypes Typhimurium et Enteritidis représentent à eux seuls 97% des fiches d'information reçues au CNR-ESS. Cette tendance de baisse de l'activité de sérotypage des LBM est vraisemblablement liée aux coûts et à la gestion des antisérums dans le cadre d'une assurance-qualité engagée.

### 1.3.2.1.4 Evolution de la répartition des principaux sérotypes en France

**Tableau 3 : Nombre d'isollements annuels des principaux sérotypes en France de 2012 à 2017**

		Tous sérotypes	Enteritidis	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhi
Souches de <i>Salmonella</i> reçues et (séro)typées en :	2012	8870	1278	2000	1969	118
	2013	9131	1227	1789	2408	130
	2014	9077	1507	1575	2235	15
	2015	10481	2159	2017	2338	129
	2016	9045	2099	1192	1942	150
	2017	8159	1570	953	2049	149
	Total 2011-2017	54763	9840	9526	12941	826
	Comptes-rendus reçus en :	2012	1768	415	1294	9
2013		1736	348	1313	22	4
2014		1603	402	1145	5	3
2015		1876	537	1271	32	0
2016		1500	552	879	16	7
2017		1728	539	966	52	10
Total 2011-2017		10211	2793	6868	136	25
Total souches (séro)typées:		2012	10638	1693	3294	1978
	2013	10867	1575	3102	2430	134
	2014	10680	1909	2720	2240	153
	2015	12357	2696	3288	2370	129
	2016	10545	2651	2071	1958	157
	2017	9887	2109	1919	2101	159
	Total 2011-2017	64974	12633	16394	13077	851
	Souches reçues non typées	2017	1600	-	-	-
Total souches enregistrées	2017	11487	-	-	-	-
Proportion comptes-rendus /total des souches sérotypées (%) en :	2012	16,6	24,5	39,2	0,5	0,8
	2013	16,0	22,1	42,3	0,9	3,0
	2014	15,0	21,1	42,1	0,2	2,0
	2015	15,2	19,9	38,6	1,6	0
	2016	14,2	20,8	42,4	0,8	4,4
	2017	17,5	25,6	50,3	2,5	6,3

Figure 5 : Evolution des principaux sérotypes de Salmonella isolés chez l'homme, 1983-2017



### 1.3.2.1.5 Répartition des *Salmonella* par sites de prélèvement

Tableau 4 : Répartition par sites de prélèvement de 2012 à 2017

Sites de prélèvement*	2012	2013	2014	2015	2016	2017
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Selles	7901 (89,1)	8127 (89,0)	8203 (90,4)	9509 (90,7)	7915 (87,5)	7095 (86,96)
Sang	480 (5,4) <sup>1</sup>	476 (5,21) <sup>2</sup>	411 (4,5) <sup>3</sup>	499 (4,8) <sup>4</sup>	616 (6,8) <sup>5</sup>	628 (7,70) <sup>6</sup>
Urines	317 (3,6)	368 (4,0)	329 (3,6)	320 (3,1)	380 (4,2)	327 (4,01)
Pus	10 (0,1)	12 (0,1)	6 (<0,1)	28 (0,3)	9 (0,1)	3 (0,04)
Bile	3 (<0,1)	2 (<0,1)	5 (<0,1)	8 (0,1)	9 (0,1)	8 (0,10)
LCR	4 (<0,1)	4 (<0,1)	4 (<0,1)	3 (<0,1)	3 (<0,1)	1 (<0,1)
Autres	126 (1,4)	116 (1,3)	93 (1,0)	93 (0,9)	100 (1,1)	96 (1,18)
Inconnu	29 (0,3)	26 (0,3)	26 (0,3)	21 (0,2)	13 (0,1)	1 (<0,1)

\*Souches reçues et sérotypées au CNR-ESS.

<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> Le pourcentage tient compte des souches de serotypes Typhi et Paratyphi A.

<sup>1</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 4.

<sup>2</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,6.

<sup>3</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,2.

<sup>4</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,7.

<sup>5</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 5,2.

<sup>6</sup> Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 6,0.

### 1.3.2.1.6 Distribution des *Salmonella* par classes d'âge

Tableau 5 : Distribution par classes d'âge de 2012 à 2017

Classes d'âge*	2012	2013	2014	2015	2016	2017
	N (%)					
<1 an	551(6,2)	603(6,6)	527(5,8)	605(5,8)	498(5,5)	514(6,3)
1-5 ans	2262(25,5)	2349(25,7)	2194(24,2)	2493(23,8)	1976(21,9)	1939(23,8)
6-14 ans	1240 (14)	1274 (14,0)	1268 (14,0)	1481 (14,1)	1143 (12,6)	974 (11,9)
15-64 ans	3381 (38,1)	3329 (36,5)	3558 (39,2)	4118 (39,3)	3749 (41,5)	3226 (15,6)
≥65 ans	1400 (15,8)	1565 (17,1)	1524 (16,8)	1763 (16,8)	1671 (18,5)	1506 (18,5)
Inconnu	36 (0,4)	11 (0,1)	6 (<0,1)	21 (0,2)	8 (<0,1)	0

\*Souches reçues et sérotypées au CNR-ESS

#### 1.3.2.1.7 Origine géographique des souches de *Salmonella* reçues

La donnée « code postal du patient » est présente pour 6404 souches de *Salmonella* reçues et typées au CNR-ESS en 2017 (78,5%). Pour les 1755 souches non renseignées, le code postal du laboratoire expéditeur a été pris par défaut.

Depuis le décret paru le 29 septembre 2016 au journal officiel et fixant le nom et le chef lieu des nouvelles régions françaises, les régions **Bretagne**, **Île-de-France**, **Provence-Alpes-Côte d'azur** et **Pays-de-la-Loire** conservent leur périmètre, leur nom et leur préfecture. La région **Centre-Val de Loire** ne voit que son nom modifié. Les 16 autres anciennes régions ont en revanche fusionné en 7 nouvelles : **Normandie**, **Hauts-de-France**, **Grand-Est**, **Nouvelle-Aquitaine**, **Occitanie**, **Bourgogne-Franche-Comté**, **Auvergne-Rhône-Alpes**.

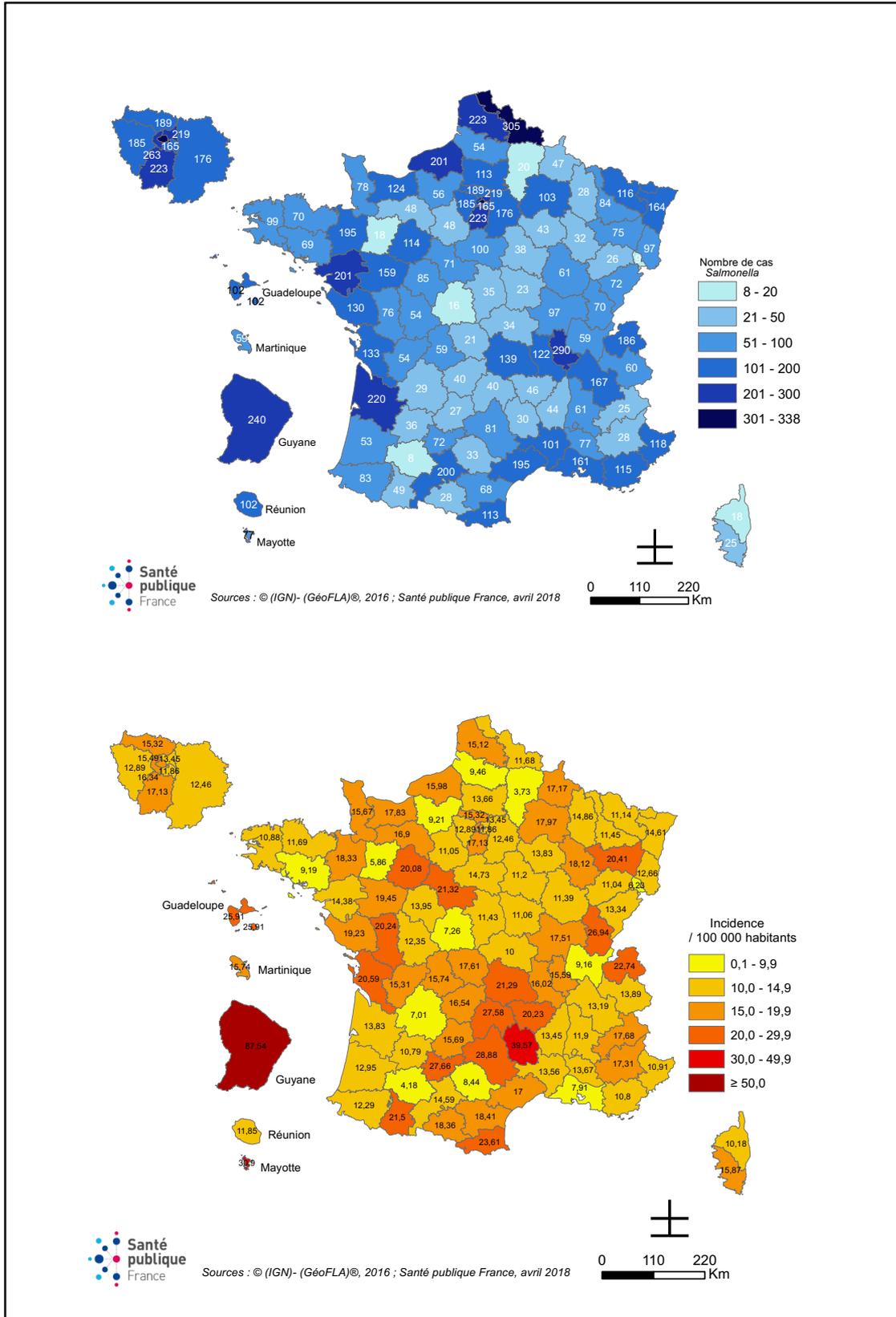
**Tableau 6 : Nombre de souches de *Salmonella* reçues par régions de 2012 à 2017**

	<b>2012*</b>	<b>2013*</b>	<b>2014*</b>	<b>2015*</b>	<b>2016**</b>	<b>2017**</b>
	N (n)	N (n)	N (n)	N (n)	N [%]	N [%]
<b>Auvergne- Rhône-Alpes*</b> 01-03-07-15-26-38-42-43-63-69-73-74	1219 (455)	1238 (397)	1236 (363)	1432 (67)	1182 [13,1]	959 [11,8]
<b>Bourgogne – Franche – Comté*</b> 21-25-39-58-70-71-89-90	349 (63)	412 (61)	365 (18)	444 (2)	387 [4,3]	293 [3,6]
<b>Bretagne*</b> 22-29-35-56	251 (14)	261 (19)	224 (4)	239 (0)	250 [2,8]	292 [3,6]
<b>Centre-Val de Loire*</b> 18-28-36-37-41-45	250 (0)	200 (2)	220 (1)	273 (0)	238 [2,6]	245 [3,0]
<b>Corse</b> 2A-2B	46 (4)	58 (1)	56 (1)	57 (6)	64 [0,7]	43 [0,5]
<b>Ile-de-France*</b> 75-77-78-91-92-93-94-95	1540 (10)	1665 (13)	1611 (6)	1845 (7)	1661 [18,4]	1538 [18,9]
<b>Grand-Est (Alsace+Champagne-Ardenne+Lorraine)</b> 67-68-08-10-51-52-54-55-57-88	694 (41)	659 (23)	799 (12)	930 (6)	791 [8,8]	670 [8,2]
<b>Hauts-de-France (Nord-Pas-de-Calais+ Picardie)*</b> 02-60-80-59-62	622 (3)	553 (8)	652 (8)	768 (5)	549 [6,1]	575 [7,1]
<b>Normandie* (Haute+Basse Normandie)</b> 14-27-50-61-76	372 (7)	372 (4)	412 (22)	439 (8)	371 [4,1]	377 [4,6]
<b>Nouvelle-Aquitaine* (Aquitaine+ Poitou-Charentes+ Limousin)</b> 16-17-19-23-24-33-40-47-64-79-86-87	812 (7)	771 (4)	794 (3)	879 (1)	831 [9,2]	741 [9,1]
<b>Occitanie* (Languedoc-Roussillon+ Midi-Pyrénées)</b> 09-11-12-30-31-32-34-46-48-65-66-81-82	1140 (57)	1174 (11)	1148 (8)	1309 (5)	934 [10,3]	751 [9,2]
<b>Pays de la Loire*</b> 44-49-53-72-85	464 (48)	574 (51)	520 (5)	546 (0)	546 [6,0]	548 [6,7]
<b>Provence-Alpes-Côte d'Azur*</b> 04-05-06-13-83-84	580 (78)	603 (61)	468 (18)	668 (2)	526 [5,8]	501 [6,1]
<b>TOTAL Métropole</b>	<b>8339</b>	<b>8540</b>	<b>8505</b>	<b>9829</b>	<b>8330</b>	<b>7533</b>
<b>Monaco</b>	6	11 (0)	7 (0)	11 (0)	8[0,1]	9 [0,1]
<b>Guadeloupe</b>	91 (1)	110 (6)	74 (3)	92 (0)	141[1,6]	102 [1,3]
<b>Martinique</b>	88 (11)	55 (7)	103 (12)	98 (0)	87[1,0]	59 [0,7]
<b>Guyane</b>	164 (0)	242 (0)	228 (0)	251 (0)	276[3,1]	242 [3,0]
<b>La Réunion</b>	81 (0)	86 (1)	81 (0)	100 (0)	99[1,1]	103 [1,3]
<b>Mayotte</b>	32 (0)	58 (0)	41 (0)	73 (0)	62[0,7]	77 [0,9]
<b>Polynésie française</b>	62 (0)	20 (0)	22 (0)	21 (0)	27[0,3]	26 [0,3]
<b>St Pierre et Miquelon</b>	1	1 (0)	0	1 (0)	2[0,02]	0
<b>Nouvelle-Calédonie</b>	6	8 (0)	16 (0)	5 (0)	13[0,1]	8 [0,1]

\*N, total des souches reçues (souches envoyées par Biomnis).

\*\*N, total des souches reçues [% des souches typées].

Figure 6 : Nombre de cas\* et incidence\* des salmonelloses par départements en 2017, données CNR-ESS



\*Souches typées au CNR-ESS + fiches d'information.

### 1.3.2.1.8 Le sérotype Typhi en 2017

En 2017, 149 souches de *S. enterica* sérotype Typhi isolées chez 137 patients ont été répertoriées au CNR-ESS. Le **tableau 7** précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination probable des cas entre 2012 et 2017.

**Tableau 7 : Origine géographique des souches de sérotype Typhi de 2012 à 2017**

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Afrique</i>	<i>18</i>	<i>25</i>	<i>26</i>	<i>14</i>	<i>28</i>	<i>22</i>
Afrique (sans précision)	1			1	3	
Algérie	1				3	
Angola		1	3			
Benin						1
Burkina Faso		1	1			
Burundi		1				
Cameroun	2	2		1	1	
Cap Vert		1				
Comores	1		2		1	
Congo						
Côte d'Ivoire	1	3	2		1	
Ghana			1			
Guinée		1			2	2
Madagascar	6				2	3
Mali	3	3	2	3	5	3
Maghreb (sans précision)				1		
Maroc	2	7	11	7	3	6
Mozambique		1		1		
Niger		1			1	
Nigeria		1				
République Centrafricaine			1		1	
Sénégal			3		3	4
Sierra Leone						1
Soudan	1					
Tchad					1	1
Togo		1			1	
Tunisie		1				1
<i>Asie</i>	<i>25</i>	<i>23</i>	<i>43</i>	<i>18</i>	<i>30</i>	<i>30</i>
Asie (sans précision)						2
Afghanistan		1				
Bengladesh	1	1	2		3	5
Cambodge	1	1				
Chine		1				1
Inde	11	15	28	12	21	17
Indonésie	2		3		1	
Liban			1			
Myanmar	1					
<b>(cont.)</b>						

<b>(cont.)</b>						
<b>Pays de contamination</b>	<b>Nombre de souches</b>					
	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>
Népal		2				1
Pakistan	5		8	5	4	2
Philippines		1				
Sri Lanka	1		1	1		1
Thaïlande	3					1
Vietnam					1	
<i>Amériques</i>	<i>1</i>	<i>3</i>		<i>5</i>	<i>3</i>	<i>7</i>
Etats Unis				1		
Haïti		1		2		2
Mexique	1	2		2	2	5
Pérou					1	
<i>Europe</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>2</i>
Allemagne					1	
Bulgarie						1
Chypre			1			
Espagne				1	1	
Italie				1		1
Pays Bas				1		
Pologne				1		
Portugal					1	
<i>DOM-TOM</i>	<i>38</i>	<i>42</i>	<i>34</i>	<i>58</i>	<i>43</i>	<i>49</i>
Guadeloupe	1	1	1			
Guyane	6	11	6	9	7	8
Martinique	1					
Mayotte	25	30	25	41	33	40
Polynésie française	1					
Nouvelle Calédonie				1		
Réunion	4		2	7	3	1
<b>Pays de contamination non précisé</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>35</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>27</b>
<b>TOTAL</b>	<b>113</b>	<b>124</b>	<b>139</b>	<b>127</b>	<b>143</b>	<b>137</b>

### 1.3.2.1.9 Le sérotype Paratyphi A en 2017

En 2017, 29 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi A ont été répertoriées au CNR-ESS pour 26 patients. Le **tableau 8** précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination pour les cas entre 2012 et 2017.

**Tableau 8: Origine géographique des souches de sérotype Paratyphi A de 2012 à 2017**

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Afrique</i>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
Côte d'Ivoire		1				
Egypte			1			
Madagascar					1	
Mali	1					1
Maroc						1
Mauritanie	1				1	
Sénégal <sup>1</sup>	1	2	1	2	5	1
Tchad					1	
<i>Asie</i>	<b>25</b>	<b>42</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>28</b>	<b>16</b>
Asie (sans précision)	4	2		1	2	
Afghanistan			1			
Bengladesh				1	1	1
Cambodge <sup>1</sup>		23	14	3	4	3
Chine		1			1	
Hong-Kong						1
Inde	14	8	4	5	13	9
Indonésie	2			1		
Laos			1		1	
Myanmar	1	2		2	3	
Népal		2	1			
Pakistan	2	1	1		3	
Sri Lanka			1			1
Thaïlande	1	1	8	3		1
Vietnam	1	2				
<i>Pays de contamination non précisé</i>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>7</b>
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>63</b>	<b>46</b>	<b>27</b>	<b>48</b>	<b>26</b>

<sup>1</sup> Une augmentation importante de cas de fièvres paratyphoïdes à *S. enterica* sérotype Paratyphi A a été notée chez des touristes français de retour du Cambodge. Cette épidémie qui a été confirmée localement a duré de 2013 à 2014 (Tourdjman *et al.* Euro Surveill 2013, Vlieghe *et al.* Euro Surveill 2013, Kuijpers *et al.* Microb Genom 2016, Kuijpers *et al.* PLoS Negl Top Dis 2017).

### 1.3.2.1.10 Le sérotype Paratyphi B en 2017

Le sérotype Paratyphi B est associé à des fièvres paratyphoïdes ou à des diarrhées fébriles. Classiquement, les souches se différencient en fonction de leur capacité à fermenter le d-tartrate (dt). Ainsi, les souches de sérotype Paratyphi B sont subdivisées en biotype dt- associées à une pathologie de type fièvre paratyphoïde et en biotype dt+ (ou Java) associées à de simples diarrhées. Actuellement, nous différencions les souches dt- des souches dt+ par WGS.

En 2017, 14 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi B de biotype dt- ont été répertoriées au CNR-ESS pour 14 patients.

Le **tableau 9** précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination pour les cas entre 2012 et 2017.

**Tableau 9: Origine géographique des souches de sérotype Paratyphi B de 2012 à 2017**

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Afrique</i>		<i>1</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	
Maroc	1	1	1		1	
Tunisie						1
<i>Asie</i>		<i>2</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	
Inde		1				
Indonésie					1	
Turquie		1		1	2	2
<i>Amérique</i>			<i>1</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	
Amérique (sans précision)					1	
Argentine						1
Bolivie						3
Pérou			1	1	2	
<b><i>Pays de contamination non précisé</i></b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>TOTAL</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>14</b>

### 1.3.2.2 Foyers de cas groupés à *Salmonella*

En 2017, le CNR-ESS a retransmis à Santé Publique France par télécopie ou par courrier électronique **316** notifications de foyers de cas groupés à *Salmonella*.

**Tableau 10: Foyers de cas groupés de *Salmonella* de 2012 à 2017**

	Foyers de cas groupés signalés à <i>Salmonella</i> au CNR-ESS en :					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nombre total de foyers	233	203	224	272	255	316
Sérotype causal:						
Enteritidis	55	46	65	80	80	92
Typhimurium	61	50	47	74	43	32
1,4,[5],12:i:-	52	52	64	64	57	86

En 2017, 316 épisodes de cas groupés concernant 572 cas (255 pour 901 cas en 2016) ont été notifiés au CNR-ESS. Le nombre de cas impliqué est un minimum car celui-ci n'était pas précisé pour 123 des 316 cas groupés signalés.

Nombre de sérotypes de *Salmonella* impliqués : 57

- Foyers hospitaliers : 7 (>11 cas)
- Collectivité : 2 (nombre de cas inconnu)
- Travail : 2 (>12 cas)
- Autre (sans précision) : 30 (>140 cas)
- Foyers familiaux : 193 (>444 cas)
- Ecoles : 9 (>24 cas)
- Crèches : 9 (>17 cas)
- TIAC : 64 (>74 cas)

**Tableau 11: Récapitulatif des différents foyers de cas groupés à *Salmonella* de 2012 à 2017**

Types de foyers de cas groupés	2012 n épisodes (n cas)	2013 n épisodes (n cas)	2014 n épisodes (n cas)	2015 n épisodes (n cas)	2016 n épisodes (n cas)	2017 n épisodes (n cas**)
Foyers familiaux	188 (554)	162 (655)	190 (782)	219 (711)	206 (686)	193(>444)
Collectivité	1 (3)	1 (2)	2 (5)	7 (41)	3 (23)	2 (n inconnu)
Travail	2 (4)	2 (4)		3 (9)		2 (>12)
Ecoles	4 (8)	5 (52)	3 ( )	1 (3)	5 (28)	9 (>24)
Crèches	1 (2)	6 (19)		1 (5)		9 (>17)
Foyers hospitaliers	4 (13)	3 (14)	4 (12)	3 (9)	7 (17)	7 (>11)
Autres	34 (122)	26 (197)	16 (76)	35 (347)	34 (147)*	94 (>214)
Nombre de sérotypes de <i>Salmonella</i> impliqués	47	38	42	37	40	57
Nombre total d'épisodes	233	203	224	272	255	316
Nombre de cas appartenant à des épisodes de cas groupés	703	939	944	1142	901	>572

\*le laboratoire déclarant indiquait : « autres groupes de cas », « collectivité », « TIAC »

\*\*en 2017, le nombre de cas était manquant pour 123/316 cas groupés répertoriés. Le nombre total de cas signalé ici est donc très sous-évalué.

### 1.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Cette activité régulière permet de suivre les profils de résistance aux antibiotiques parmi une sélection d'isolats cliniques de *Salmonella* (sans orientation de sérotype dans l'échantillonnage par tirage au sort), soit 986 (10,1%) sur 9759 souches reçues au CNR-ESS (une seule souche considérée par patient). Cet échantillon était représenté par les sérotypes suivants : I. 4,12:-:- (1), I. 4,12:b:- (1), I. 4,12:i:- (105), I. 4,5,12:d:- (2), I. 4,5,12:i:- (154), I. 6,7:e,h:- (1), I. 6,7:l,v:- (1), I. 6,8:e,h:- (1), II. 4,12:b:- (1), II. 48:k:z39 (1), IIIa. 41:z4,z23: - (1), IIIa. 48:z4,z23: - (3), IIIb. 48:i:z (1), IIIb. 50:i:z (1), IIIb. 61:i:z53 (9), IIIb. 61:l,v:1,5,è (1), IIIb. 61:r:z53 (1), IV. 40:z4,z32:- (1), IV. 43:z4,z32 (1), IV. 50:g,z51:- (1), Aberdeen (n=1), Abony (5), Adelaide (1), Agbeni (2), Agodi (1), Agona (12), Agoueve (1), Ahmadi (1), Ajiobo (2), Albany (3), Altendorf (1), Altona (5), Anatum (2), Apapa (1), Arachavaleta (3), Bahati (1), Bareilly (2), Blockley (1), Bovismorbificans (6), Braenderup (3), Brandenburg (3), Bredeney (3), Carmel (1), Carno (1), Chester (15), Coeln (5), Corvallis (3), Cotham (1), Derby (15), Dublin (12), Durban (1), Eastbourne (5), Enteritidis (196), Epalinges (1), Fresno (1), Galil (1), Gambia (1), Give (2), Glostrup (2), Goelzau (2), Hadar (6), Havana (1), Heidelberg (1), Heistopdenberg (1), Hessarek (3), Hvittingfoss (1), Ibadan (1), Indiana (2), Infantis (20), Javiana (3), Kapemba (3), Kedougou (3), Kentucky (16), Kingabwa (1), Kingston (1), Kottbus (6), Lexington (1), Livingstone (3), London (1), Lowestoft (1), Manhattan (1), Mbandaka (3), Miami (2), Mikawasima (2), Molade (1), Montevideo (3), Muenchen (3), Muenster (2), Napoli (9), Newport (18), Nouveau sérotype (1), Odozi (1), Ohio (1), Oranienburg (5), Oslo (1), Panama (13), Paratyphi A (3), Paratyphi B d-tartrate - (7), Paratyphi B Java (2), Plymouth (1), Pomona (1), Poona (8), Postdam (1), Reading (2), Rissen (3), Rubislaw (4), Saintpaul (9), San Diego (3), Schwarzengrund (1), Shubra (1), Singapore (2), Stanley (11), Stanleyville (1), Stourbridge (1), Takoradi (1), Telekebir (2), Thompson (4), Typhi (17), Typhimurium (118), Uganda (2), Veneziana (5), Vilvoorde (1), Virchow (10), Wagenia (1), Wangata (1), Weltevreden (7).

L'étude de la résistance aux antibiotiques était aussi réalisée annuellement sur certains sérotypes de *Salmonella* d'intérêt comme Typhi, Paratyphi, Kentucky... par antibiogrammes classiques. Cette analyse par sérotype sera de nouveau réalisée l'an prochain après optimisation de la nouvelle méthodologie (CMI par la technique Sensititre à partir de plaques « à façon »), **Il n'y a donc pas de résultats par sérotype pour l'année 2017**. Les données de sensibilité par sérotype et ce jusqu'en 2016 sont disponibles sur les rapports annuels du CNR-ESS des années précédentes.

Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM-EUCAST; communiqué 2016) ont été suivies.

### 1.3.3.1 Résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *Salmonella*

**Tableau 12: Résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *Salmonella***

Antibiotique	% de souches résistantes	
	2016 (n=932) ,(N=9045)	2017 (n=986) (N=9759)
Ampicilline	28,6	33,9
Céfotaxime	0,5	1,1
Ceftazidime	0,5	0,7
Méropènème	0	0
Gentamicine	1,2	2,2
Acide nalidixique	12,5	14,7
Ciprofloxacine	13,3	14,7
Sulfaméthoxazole <sup>1</sup>	40,7	39,2
Triméthoprim	6,5	6,4
Co-trimoxazole <sup>2</sup>	6,1	6,1
Chloramphénicol	6,9	8,6
Tétracycline	29,8	37,0
Tigécycline	1,0	0,1
Azithromycine	1,1	0,1
Colistine	8,3	4,9

n : nombre de souches étudiées ; N : nombre de souches reçues au CNR-ESS (une seule par patient).

<sup>1</sup>Déterminée pour sulfisoxazole, donnée CLSI 2015.

<sup>2</sup> Molécule non testée, résistance commune aux deux molécules sulfaméthoxazole et triméthoprim.

Depuis 2014, le CA-SFM intègre les recommandations européennes EUCAST. Des modifications importantes sont à noter pour la ciprofloxacine chez les salmonelles, en catégorisant « résistant » les souches présentant une CMI > 0,06 mg/L. Cela regroupe les anciennes catégorisations CIP-SD (à sensibilité diminuée à la ciprofloxacine, 0,06 < CMI < 1) et CIP-R (> 1 mg/L). Ainsi en 2017, 129 souches de salmonelles avaient une CIP-DS (13,1%) et 16 une CIP-R (1,6%). Les souches CIP-R appartenaient aux sérotypes Kentucky (n=15) et Typhi (n=1).

Concernant la résistance à la colistine, elle a été observée principalement chez trois sérotypes ; Enteritidis (28 souches), Dublin (11 souches) et le variant monophasique de Typhimurium (6 souches). Ces souches présentaient une CMI ≥ 4 mg/L. Pour les deux premiers sérotypes, aucun gène de résistance connu n'a été pour l'instant identifié. Pour le variant monophasique de Typhimurium, le gène *mcr-1* a été retrouvé chez toutes les souches.

### 1.3.3.2 Souches de *Salmonella* possédant des gènes de résistance particuliers aux antibiotiques, détectées au CNR-ESS

Depuis 2016, les souches de salmonelles sont de plus en plus souvent analysées par WGS (2345 souches en 2016, soit 25,9% des souches reçues et 6046 souches en 2017, soit 74% des souches reçues) et la recherche des gènes de résistance est effectuée via des scripts bioinformatiques développés *in situ* et via un site public, Resfinder du Center for Genomic Epidemiology-CGE (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

### 1.3.3.2.1 Souches possédant des gènes de résistance aux céphalosporines de 3ème génération

Deux mécanismes de résistance aux C3G, et communs aux entérobactéries, sont décrits chez *Salmonella*. Ces mécanismes de support plasmidique sont la production d'une BLSE et/ou la production d'une céphalosporinase (AmpC). Ils sont émergents chez *Salmonella*.

**Tableau 13: *Salmonella* possédant des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2017**

Type de la BLSE	N <sup>1</sup>	Sérotype(s) associé(s)	Renseignements épidémiologiques
CTX-M-1	1	4,5,12:i- (monophasique)	Contexte inconnu
	1	Corvallis	Guyane
	1	Derby	Contexte inconnu
	1	Goldcoast	Contexte inconnu
	1	Infantis	Contexte inconnu
CTX-M-3	1	Agbeni	Togo
	1	Derby	Contexte inconnu
	1	Mbandaka	Contexte inconnu
CTX-M-9	1	Rissen	Contexte inconnu
	24	Typhimurium	Maroc (8), contexte inconnu (16)
CTX-M-14	1	4,5,12:i- (monophasique)	Contexte inconnu
	2	4,12:i- (monophasique)	Thaïlande
	1	Kottbus	Contexte inconnu
	1	Strathcona	Contexte inconnu
CTX-M-55	1	4,12:i- (monophasique)	Contexte inconnu
	1	4,5,12:i- (monophasique)	Contexte inconnu
	1	Give	Thaïlande
	1	Kentucky	Vietnam
	2	Newport	Vietnam
CTX-M-65	2	Infantis	Polynésie Française (1), contexte inconnu (1)
SHV-12	1	4,5,12:i- (monophasique)	Contexte inconnu
TEM-52	1	Derby	Contexte inconnu

<sup>1</sup>Nombre de souches (une souche par patient).

**Tableau 14 : *Salmonella* possédant des gènes codant pour des céphalosporinases reçues au CNR-ESS en 2017**

Type de la céphalosporinase	N <sup>1</sup>	Sérotype(s) associé(s)	Renseignements épidémiologiques
ACC-3	1	Enteritidis	Contexte inconnu
CMY-2	1	Derby	Contexte inconnu
	2	Kentucky	Indonésie (1), contexte inconnu (1)
	1	Miami	Contexte inconnu
	1	Minnesota	Nouvelle Calédonie
	1	Stanley	Séjour en Malaisie
	2	Typhimurium	Algérie (1), contexte inconnu (1)
CMY-4	2	Typhimurium	Algérie (1), contexte inconnu (1)
CMY-74	1	Derby	Contexte inconnu (1)
	1	Typhimurium	Contexte inconnu (1)
DHA-1	1	4,5,12:i:- (monophasique)	Contexte inconnu (1)
	1	Kentucky	Contexte inconnu (1)

<sup>1</sup>Nombre de souches (une souche par patient).

Les souches de *Salmonella* résistantes aux C3G étaient rares jusqu'en 2009, mais depuis elles sont de plus en plus fréquemment isolées.

Les études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR-ESS de 1993 à 2007 par échantillonnage des deux sérotypes majeurs, Enteritidis et Typhimurium (2718 souches testées) n'ont mis en évidence que quatre souches résistantes (0,15%), dont trois de sérotype Typhimurium. Un nombre croissant de souches résistantes aux C3G pour Typhimurium et son variant monophasique est observé au CNR-ESS, avec 9 souches en 2008 (7 Typhimurium et 2 monophasiques) et 12 en 2009 (9 Typhimurium et 3 monophasiques). L'année 2010 a été exceptionnelle avec l'épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Typhimurium produisant simultanément une CTX-M-1 et une CMY-2 (plus de 40 cas).

D'autres sérotypes sont, depuis quelques années, particulièrement affectés par cette résistance comme Virchow avec 15 souches sur 689 testées (2,2%) entre 1997 et 2007 (CTX-M-2; CTX-M-9; TEM-52; SHV-12), Newport avec 58 souches sur 936 testées (6,2%) entre 1997 et 2008 qui produisaient la céphalosporinase CMY-2 et pour les Kentucky du clone ST198 déjà résistantes à la ciprofloxacine et qui expriment depuis 2010 des résistances aux C3G (CMY, CTX-M ou SHV) et à l'imipénème (OXA-48 ou VIM-2). L'atteinte préférentielle de ces sérotypes est un phénomène observé sur le plan international et serait vraisemblablement consécutif à l'utilisation de C3G dans la filière animale (bovins pour Newport et volailles pour Virchow et Kentucky). A côté de ces sérotypes majeurs, le CNR-ESS détecte des sérotypes rares producteurs de BLSE (Babelsberg, Concord, Derby, Waycross, Havana, Teitelkebir, Nima...) depuis 2003. Le plus souvent il s'agit de salmonelles sélectionnées par une mauvaise utilisation de C3G chez des enfants candidats à l'adoption dans leur pays d'origine (Mali, Ethiopie et Vietnam). Des épidémies hospitalières sont également identifiées avec un nombre de cas faible mais persistant sur plusieurs années au sein d'une même structure de soin. Des mesures de contrôles spécifiques permettent généralement leur éradication.

### 1.3.3.2.2 Salmonella possédant les gènes codant pour des carbapénémases et/ou résistantes aux carbapénèmes reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017

**Tableau 15 : Salmonella possédant les gènes codant pour des carbapénémases et/ou résistantes aux carbapénèmes reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017**

Type de la résistance aux carbapénèmes	N <sup>1</sup>	Sérotype	Année	Renseignements épidémiologiques
Mutations ompC et D	1	Indiana	2014	Acquisition hospitalière
VIM-2	5	Kentucky	2010	Maroc
OXA-48	1	Kentucky	2011	Séjour en Egypte
OXA-48	1	Kentucky	2013	Séjour en Algérie
OXA-48	1	Kentucky	2017	Contexte inconnu
OXA-48	1	Poona	2017	Contexte inconnu
OXA-48	1	Postdam	2017	Contexte inconnu
OXA-48	1	Saintpaul	2009	Séjour en Egypte
NDM-1	1	Westhampton	2012	Séjour en Inde
NDM-2	1	Kentucky	2017	Contexte inconnu

<sup>1</sup>Nombre de souches (une souche par patient).

Les souches de *Salmonella* productrices de carbapénémases sont encore très rarement décrites. Cependant, quelques souches apparaissent, en particulier chez le clone multi-résistant Kentucky ST198 Cip<sup>R</sup> « X1-ST198-SGI1-Ks » (voir ci-dessous).

### 1.3.3.2.3 Souches résistantes à la ciprofloxacine

La résistance à la ciprofloxacine définie *in vitro* par une CMI supérieure à 1 mg/L (communiqué 2013 du CA-SFM) reste de vigueur pour ce rapport 2017. Les versions suivantes du CA-SFM ont été fortement modifiées pour s'harmoniser avec les recommandations européennes (EUCAST) définissant la résistance à la ciprofloxacine par une CMI > 0,06 mg/L. Le suivi des résistances à cette molécule clé de traitement des salmonelloses sévères a été *de facto* modifié. Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont principalement des modifications au niveau du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. L'accumulation de mutations et la présence additionnelle d'un mécanisme d'efflux ou de facteurs plasmidiques comme les gènes *qnr* et le gène *aac6'-Ib-cr* augmentent le niveau de résistance de ces souches.

#### \* Souches de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine d'origine plasmidique en 2017

La résistance aux fluoroquinolones peut être également le fait de gènes plasmidiques comme les gènes *qnr A, B, S*, les gènes *oqxA* et *B*, *qepA* et le gène variant *aac6'-Ib-cr* qui augmentent le niveau de résistance de ces souches aux fluoroquinolones. L'étude du résistome menée par le CNR-ESS sur un échantillonnage en 2017 a permis de confirmer la présence de ces gènes pour les souches suivantes :

**Tableau 16 : *Salmonella* possédant les gènes codant pour la résistance aux quinolones reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017**

gène impliqué	N <sup>1</sup>	Sérotype	Lieu probable de contamination quand indiqué
<i>aac6'-Ib-cr</i>	1	4,5,12:i:- (monophasique)	
	1	Kentucky	
	2	Poona	
<i>oqxB</i>	1	4,5,12:i:- (monophasique)	
	1	Derby	
<i>qnrA1</i>	1	Stanley	
	24	Typhimurium	Maroc (8)
<i>qnrB2</i>	8	Typhimurium	Maroc (4)
<i>qnrB5+qnrB19</i>	37	4,12:i:- (monophasique)	
	16	4,5,12:i:- (monophasique)	
	1	6,7:z4,z23 :- (monophasique)	
	3	Albany	Mexique (1)
	1	Altona	
	2	Braenderup	
	4	Bredeney	Maroc (1)
	52	Chester	Canada (1), Sénégal (5), Mali (1), Maroc (3)
	2	Corvallis	Espagne (1), Haïti (1)
	3	Derby	
	12	Enteritidis	Cuba (4), Guadeloupe (1), Tunisie (2)
	3	Hadar	Maroc (2)
	1	Havana	
	1	Indiana	
	2	Kentucky	Algérie (1), Guyane (1)
	1	Manhattan	Côte d'Ivoire (1), Mali (1)
	1	Minnesota	Nouvelle-Calédonie (1)
	2	Molade	
	1	Montevideo	
	8	Muenchen	Maroc (1)
	1	Nessziona	
	1	Newport	
	1	Nigeria	
	1	Ordenez	Guyane (1)
	1	Panama	Côte d'Ivoire (2)
	2	Poona	
	1	Rissen	Maroc (1)
5	Saintpaul		
2	Schwarzengrund	Mayotte (1)	
1	Typhi	Mexique (1)	
6	Typhimurium	Sénégal (1), Maroc (1)	
3	Virchow		
<i>qnrB6 + aac(6')Ib-cr</i>	2	Lichtfield	
<i>qnrB19</i>	1	Corvallis	
	1	Bredeney	Maroc (1)
	1	Enteritidis	

(cont.)

gène impliqué	N <sup>1</sup>	Sérotype	Lieu probable de contamination quand indiqué
<i>qnrD</i>	2	Thompson	Turquie (1)
<i>qnrS1</i>	7	4,5,12:i:- (monophasique)	Thaïlande (3)
	6	4,12:i:- (monophasique)	Thaïlande (1)
	10	Agona	Pakistan (1), Thaïlande (2)
	1	Bareilly	
	9	Bredeney	Algérie (3)
	7	Chester	Maroc (2)
	5	Corvallis	Algérie (1), Cambodge (1)
	1	Dublin	
	3	Enteritidis	
	2	Give	Thaïlande (1)
	1	Goldcoast	Asie (1)
	1	Infantis	
	2	Kedougou	
	2	Kentucky	Inde (1), Vietnam (1)
	1	Kingston	
	3	Mbandaka	Inde (1)
	2	Montevideo	
	1	Muenchen	
	2	Newport	Vietnam (1)
	1	Panama	
1	Reading	Pakistan (1)	
2	Rissen		
4	Saintpaul		
2	Stanley	Malaisie (1)	
1	Telekebir		
8	Typhimurium	Chine (1), Thaïlande (1), Tunisie (2)	
<i>qnrS2</i>	1	Virchow	

<sup>1</sup>Nombre de souches (une souche par patient)

La majorité des souches possédaient le gène *qnrS1* et/ou *qnrB5* et *qnrB19*. Les souches possédant un gène *qnrS1* étaient principalement isolées chez des patients qui revenaient d'un séjour en Asie et celles possédant un gène *qnrB* ou *qnrA* étaient acquises en Afrique. Depuis septembre 2014, une épidémie importante de salmonelloses à sérotype Chester sévit au Maroc et est multi-source, les souches ont la particularité de posséder soit le gène *qnrS1* soit le gène *qnrB19* (Fonteneau *et al.* Euro Surveill 2017).

Les gènes *qnrA1* sont associés aux souches de Typhimurium (CT72) productrices de CTX-M-9, principalement acquises au Maroc.

Le gène *qnrB2* est strictement associé aux souches de Typhimurium (majoritairement CT326) et acquises au Maroc

#### 1.3.3.2.4 Souches résistantes à l'azithromycine

L'azithromycine, chef de file des macrolides à 15 atomes, présente des caractéristiques cinétiques particulières permettant d'avoir une activité sur les entéropathogènes. Il se présente comme une alternative thérapeutique d'intérêt pour les traitements des fièvres typhoïde et paratyphoïdes lorsque ces salmonelles majeures présentent des résistances aux fluoroquinolones, ce qui est particulièrement vrai lorsque l'infection est acquise dans le sous-continent indien. Cependant, ses qualités pharmacocinétiques qui consistent en un traitement par voie orale, ambulatoire et utilisable chez l'enfant (contrairement aux fluoroquinolones) font qu'il est de plus en plus utilisé pour les infections bactériennes entériques dues aux shigelles, campylobacter, vibrions et salmonelles. Autant la résistance à l'azithromycine des *Salmonella* responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïdes (sérotypes Typhi et Paratyphi) est à ce jour rarissime, autant celle des salmonelles non typhiques commence à être observée. Le gène de résistance conférant la résistance à haut niveau à l'azithromycine impliqué est principalement *mph(A)*, codant pour une phosphotransférase inactivant les macrolides. Sur les 6046 génomes de *Salmonella* obtenus en 2017, le gène *mph(A)* a été retrouvé pour les sérotypes suivants :

**Tableau 17 : *Salmonella* possédant les gènes codant pour la résistance à l'azithromycine reçues au CNR-ESS de 2009 à 2017**

N <sup>1</sup>	Sérotipe	Lieu probable de contamination quand indiqué
3	4,12:i:- (monophasique)	Serbie (1)
2	4,5,12:i:- (monophasique)	Martinique (1)
1	Bareilly	
2	Blockley	
1	Bredeney	
2	Enteritidis	
1	Indiana	
2	Kentucky	Vietnam (1)
2	Newport	Vietnam (1)
2	Rissen	
1	Saintpaul	
1	Typhimurium	Maroc (1)

<sup>1</sup>Nombre de souches (une souche par patient)

Le gène *mph(A)* est observé principalement chez des salmonelles déjà multi-résistantes, comme chez les sérotypes Blockley, Kentucky et Typhimurium (y compris son variant monophasique).

#### 1.3.3.2.5 Souches résistantes à la colistine

La résistance à la colistine est portée par des mécanismes multiples, liées à des mutations chromosomiques dans divers gènes conduisant à des modifications de charge du lipopolysaccharide (LPS) ou à l'acquisition plasmidique des gènes *mcr-1* à *mcr-7* (*mcr* pour mobilized colistin resistance). Ces gènes de résistance plasmidiques ont été recherchés sur l'ensemble des 6046 souches séquencées et ont été identifiés chez 14 souches :

**Tableau 18 : *Salmonella* possédant les gènes *mcr* conférant la résistance à la colistine**

Variant de gènes <i>mcr</i>	N <sup>1</sup>	Sérotype	Renseignements épidémiologiques
<i>mcr-1</i>	10	4,5,12:i:- (monophasique)	Contexte inconnu (9), Guadeloupe (1)
	4	4,12:i:- (monophasique)	Contexte inconnu (4)
<i>mcr-3</i>	2	4,5,12:i:- (monophasique)	Contexte inconnu (1), Thaïlande (1)
	2	4,12:i:- (monophasique)	Contexte inconnu (1), Thaïlande (1)
	1	Typhimurium	Thaïlande (1)

En 2017, la présence de gène *mcr-1* et *mcr-3* a été observée uniquement chez des souches cliniques de Typhimurium et de son variant monophasique. Il s'agit uniquement de la population ST34. La population possédant le gène *mcr-3* semble être acquise en Asie du Sud-Est.

### 1.3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux et internationaux

#### 1.3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France

Le CNR-ESS travaille en étroite collaboration avec le département des maladies infectieuses de Santé publique France. Plusieurs types de relevés sont produits :

- *Relevés périodiques envoyés à Santé Publique France*

Les événements signalés sur les relevés hebdomadaires et déclaration obligatoire en 2017 ont concerné :

- **316 foyers de cas groupés** d'infections à *Salmonella* signalés par les laboratoires correspondants en 2017 (**255 cas groupés déclarés** en 2016),
- des informations épidémiologiques et microbiologiques diverses sur les souches étudiées au laboratoire pour les sérotypes de ***Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes** ou sur les souches impliquées dans des épidémies,
- des comptes-rendus hebdomadaires suite aux analyses à l'aide d'un algorithme R permettant la détection d'événements épidémiques.

- *Relevés annuels*

Edition annuelle d'un **rapport d'activité** du CNR-ESS.

- *Relevés ponctuels*

- réponses du CNR-ESS à des demandes d'information émanant de Santé publique France (extraction par sérotype, classe d'âge....),
- au cours d'une épidémie, extraction et expertise microbiologique.

#### 1.3.4.2 Contribution aux réseaux de surveillance nationaux, humaine et vétérinaire

Le CNR-ESS collabore avec les laboratoires de l'ANSES, en particulier l'unité caractérisation et épidémiologie bactérienne de Maisons-Alfort et du LNR *Salmonella* à Ploufragan. Le CNR-ESS apporte son expertise sur le sérotypage et au transfert de nouvelles technologies à ces laboratoires et participent conjointement aux investigations épidémiologiques. Le CNR-ESS est parfois sollicité pour avis d'experts sur certaines saisines ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2033/99/CE et participe aux

demandes d'élection d'experts ou des groupes de travaux spécifiques (Comité d'expert Spécialisé-BIORISK).

Le CNR-ESS participe en tant qu'expert au consortium « Salmonovar » coordonné par l'Institut Français du porc (Ifip) qui consiste à suivre l'évolution de souches monophasiques de Typhimurium dans des matrices de saucisson sec et également au groupe de travail coordonné par la direction générale de l'alimentation sur l'optimisation de la surveillance des salmonelles dans la filière de fabrication de fromages au lait cru de vache.

Le CNR-ESS collabore avec des laboratoires scientifiques vétérinaires nationaux tels que l'INRA.

#### 1.3.4.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Chaque année le CNR-ESS adresse à deux instances internationales, l'OMS et l'OIE, des données sur le nombre de *S. enterica* sérotypes Enteritidis et Typhimurium isolées en France.

Les souches étudiées au CNR-ESS dont les formules antigéniques ne figurent pas dans le schéma de White-Kauffmann-Le Minor sont transmises pour validation au Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella* (CCOMS) dont les responsables sont ceux du CNR-ESS.

En 2017, le CNR-ESS a adressé au CCOMS les nouveaux sérotypes, ou nouveaux variants, putatifs suivants :

- le nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule antigénique 9,46:z10:1,5
- le nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 6,14,25:c:1,7
- le nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 43:b:1,5
- le nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 6,7:z:z35
- le nouveau sérotype de l'espèce *bongori* de formule antigénique 61:z65:-

En 2017, le CCOMS a confirmé les nouveaux sérotypes/variants suivants envoyés par le CNR-ESS et qui seront décrits dans le prochain schéma de White-Kauffmann-Le Minor (ainsi que dans son supplément):

- le nouveau sérotype **Anjou** de formule antigénique 6,8:e,h:1,7
- le nouveau sérotype **Madarounfa** de formule antigénique 44:z:z6
- le nouveau variant **O:15** du sérotype **Madjorio** de formule antigénique 3,15:d:e,n,z15

Les responsables du CNR-ESS participent au réseau Global Foodborne Infections Network de l'OMS comme enseignants pour la partie microbiologique (cours théoriques et travaux pratiques) lors de formations organisées par ce réseau. L'édition 2007 du schéma de White-Kauffmann-Le Minor par P.A.D. Grimont et F.X. Weill est accessible en version française sous forme d'un fichier pdf téléchargeable à l'adresse suivante :

<http://www.pasteur.fr/ccoms/salmonella>

### **1.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

Un travail a été initié avec l'Unité de modélisation mathématique des maladies infectieuses à l'Institut Pasteur (responsable S. Cauchemez). Ce travail se fait sous la double coordination de Simon Le Hello (CNR-ESS) et de Mikhail Churakov (post-doctorant de S. Cauchemez). Il s'agit :

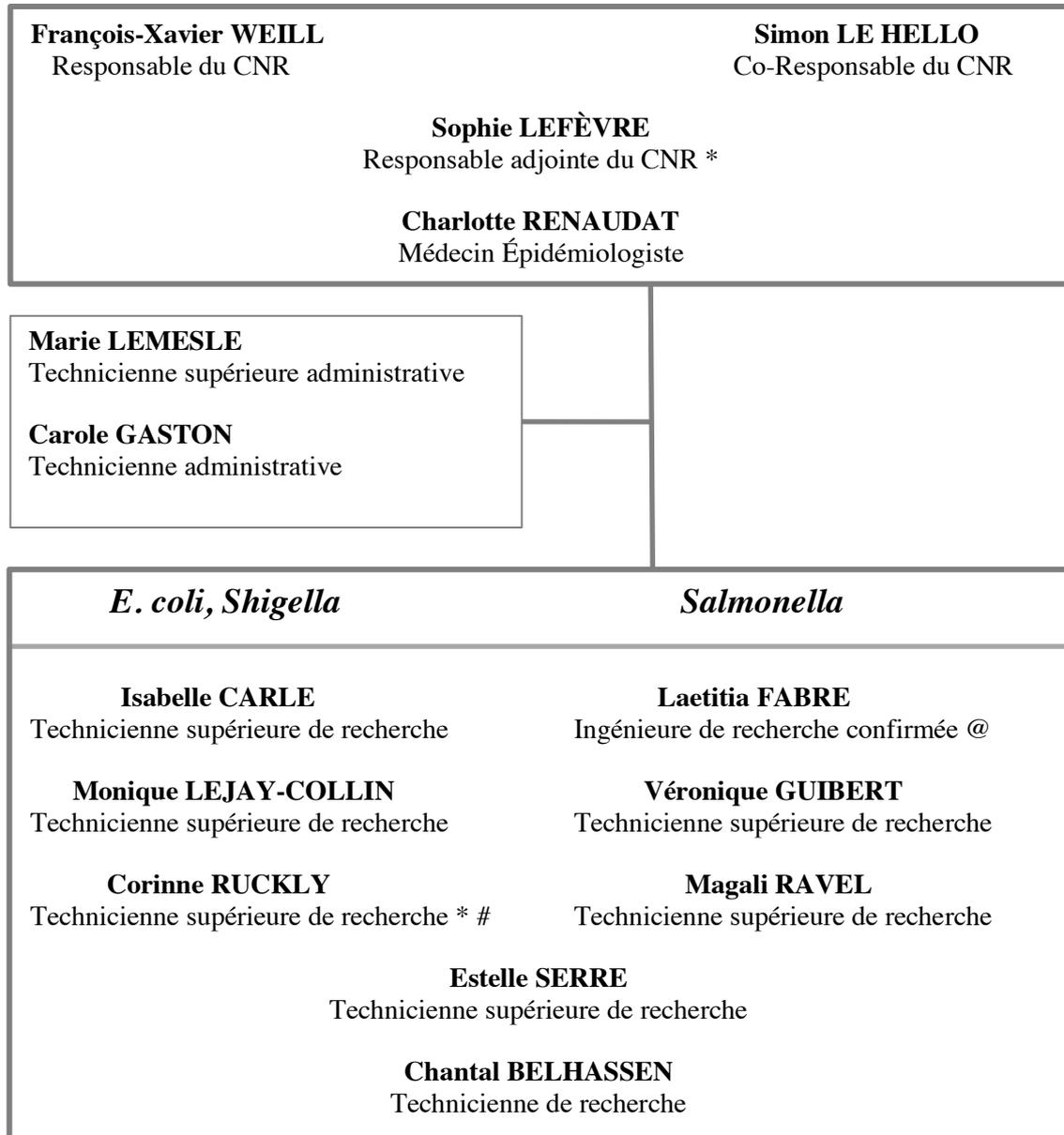
- D'évaluer l'impact d'une sélection de souches de salmonelles à typer sur les capacités de détection et d'investigation des salmonelloses en France (sélection de 60, 70, 80% des souches reçues...)
- De proposer un algorithme dynamique qui reproduise l'activité du CNR-ESS (package R Shiny avec seuils de détection)

*Shigella*

## 2/ *Shigella*

### 2.1 Missions et organisation du CNR

Figure 7. Organigramme du CNR



\* Correspondant Qualité du CNR

# Correspondant Métrologie et Matériel du CNR

@ Correspondant Hygiène et Sécurité

Voir Annexe 1.

## 2.2 Activités d'expertise

### 2.2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2017

Les différentes techniques d'étude des souches de *Shigella* spp., identification, sous-typage, détection de gènes de pathogénicité et étude de la sensibilité aux antibiotiques, sont présentées dans l'Annexe 2 de ce rapport.

La technique de l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), qui était la méthode de référence, n'est plus réalisée par le CNR-ESS.

Depuis 2017, toutes les souches de *Shigella* spp. reçues au CNR-ESS sont analysées par séquençage du génome entier (WGS pour whole-genome sequencing).

### 2.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) utilisent de plus en plus la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation -Time Of Flight) pour l'identification en routine des bactéries. Cependant, cette technologie dépend essentiellement de la base de données contenues dans les logiciels des différents appareils de spectrométrie de masse. Or il n'existe pas à ce jour de base de données capable de différencier *Shigella* spp. de *Escherichia coli*.

Une étudiante en Licence professionnelle de l'École Nationale de Chimie Physique et Biologie (ENCPB) a réalisé entre octobre 2016 et septembre 2017 un stage d'apprentissage au CNR-ESS ayant pour objectif de développer par MALDI-TOF une approche innovante pour la différenciation entre *E. coli* et *Shigella* spp. Deux approches ont été utilisées : la création d'une base de données contenant l'ensemble des différents sérotypes de *Shigella* avec l'outil MBT Compass Explorer (Bruker®), et une approche par 'machine learning'. Ce travail est toujours en cours.

### 2.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune.

### 2.2.4 Collections de matériel biologique

Au CNR-ESS, toutes les souches de *Shigella* ont été conservées sur milieu gélosé sans glucose, depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs dizaines de milliers de souches conservées avec leurs informations microbiologiques et cliniques (si disponible). Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances aux antibiotiques. Les souches importantes sont en plus conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , parmi celles-ci, il y a :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *Shigella*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- les souches possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines.
- les souches de *Shigella dysenteriae* de type 1.
- les souches de *Shigella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques.

Les autres souches sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches du CNR-ESS.

## 2.2.5 Activités d'expertise

### 2.2.5.1 Inventaire global des souches reçues au CNR-ESS en 2017

Le CNR-ESS a réalisé l'identification biochimique, le sérotypage classique par agglutination et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de la totalité des souches de *Shigella* spp. reçues des laboratoires collaborateurs en 2017.

Durant l'année 2017, le CNR-ESS a reçu 1243 souches d'origine humaine, envoyées comme appartenant au genre *Shigella*. Sur ces 1243 souches, 35 souches n'ont pas été analysées (tubes cassés, absence de culture, discordances entre les informations sur le tube et la fiche de liaison, demandes n'entrant pas dans les missions du CNR) et 18 souches provenaient d'études épidémiologiques avec l'étranger (Bangladesh et Cambodge).

Sur les 1190 souches analysées dans le cadre des missions du CNR-ESS, 1016 ont été confirmées comme des *Shigella* spp. (provenant de 997 patients) et 174 souches (soit 14,6% des souches) n'étaient pas des *Shigella*.

Le pourcentage de mauvaise identification des *Shigella* par les LBM est en progression constante d'année en année et ce depuis 2011. Cela est certainement attribuable à l'utilisation grandissante de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification bactérienne. Le CNR-ESS a amorcé en 2016 un travail visant à l'amélioration des algorithmes d'identification pour le MALDI-TOF.

Parmi ces 1016 souches de *Shigella*, 19 correspondaient à des doublons (demande(s) reçue(s) pour un même patient au cours d'un intervalle de temps inférieur à 62 jours). Finalement, 997 souches ont été confirmées comme étant des isollements uniques de *Shigella* en provenance de France métropolitaine (n=855) et des DOM-TOM (n=142).

Sur les 997 souches uniques de *Shigella* spp. confirmées au CNR-ESS, 383 appartenaient à *S. flexnerii*, 563 à *S. sonnei*, 36 à *S. boydii* et 15 au séro groupe *S. dysenteriae*.

Le CNR a reçu aussi 256 fiches d'information par voie postale, fax, e-mail ou directement sur le portail web Voozahoo. Ce système de collecte permet d'obtenir des informations sur les souches de *Shigella* isolées dans des laboratoires collaborateurs mais non envoyées au CNR-ESS. Ces fiches ont permis d'identifier 214 cas uniques d'infection à *Shigella*.

Ainsi, un total de 1211 cas de shigellose humaine a été répertorié au CNR-ESS pour l'année 2017 en compilant les souches et les fiches d'information reçues.

Aucune souche de *Shigella* spp. d'origine animale n'a été reçue pour l'année 2017.

### 2.2.5.2 Souches reçues de France métropolitaine

En 2017, le CNR-ESS a confirmé 855 souches uniques (une seule par patient) de *Shigella* en provenance de France métropolitaine. La distribution par sérotype est indiquée dans le **tableau 19**.

Une notion de voyage est associée dans 30% des cas : 47% pour *S. boydii*, 47% pour *S. dysenteriae*, 34% pour *S. flexneri* et 26% pour *S. sonnei*.

Les voyages déclarés étaient en provenance du continent africain (150/254, 59%), d'Asie (48/254, 19%) ou d'Amérique (40/254, 16%). Seulement 16 cas (6%) ont été rapportés en provenance d'un pays européen.

Les pays les plus fréquemment déclarés étaient le Maroc (52 cas), l'Algérie et l'Inde (18 cas chacun).

Parmi les cas déclarés comme groupés, une épidémie à *S. sonnei* g dans une école primaire à Macau (Gironde) a été objet d'une enquête de terrain par Santé publique France en mars 2017. Quarante-et-un cas ont été confirmés (dont huit hospitalisés) et 53 cas ont été classés comme probables. L'origine de l'épidémie a été attribuée à un voyage en Asie du Sud-est chez le cas index. Trente-deux souches de cette épidémie ont été reçues et analysées par le CNR-ESS. Un profil de résistance aux antibiotiques très particulier (ACtxSGNalCipSuTmpTeTgAzm) a été observé. Les bactéries contenaient en particulier le gène *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, codant pour une beta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Ce profil de résistance et le gène BLSE étaient cohérents avec une origine asiatique de la souche.

**Tableau 19: Distribution par sérotype des souches métropolitaines de *Shigella* spp. identifiées au CNR-ESS en 2017.**

Sérotype	Nombre de cas	Notion de voyage*	Épidémie
<b><i>Shigella boydii</i></b>	<b>36</b>	<b>17 (15 en Afrique, 1 en Amérique et 1 en Asie) soit 47 %</b>	<b>1</b>
1	1	–	–
10	2	1 Éthiopie, 1 Maroc	–
11	11	1 Congo, 2 Côte d'Ivoire, 1 Guinée	–
12	1	1 Cameroun	–
14	3	1 Mali	–
19	1	–	–
2	14	1 Algérie, 5 Maroc, 1 Sénégal	–
20	2	1 Mexique	1 familiale (Mexique)
4	1	1 Népal	–
<b><i>Shigella dysenteriae</i></b>	<b>15</b>	<b>7 (5 en Afrique, 1 en Amérique et 1 en Asie) soit 47%</b>	<b>1</b>
12	2	1 Algérie	–
2	5	1 Congo, 1 Mexique	1 familiale
3	1	–	–
4	1	–	–
5	1	1 Maroc	–
9	1	1 Inde	–
sérotype provisoire 97-10607 (96-204)	2	1 Maroc	–
sérotype provisoire Sh111	2	1 Togo	–
<b><i>Shigella flexneri</i></b>	<b>271</b>	<b>91 (60 en Afrique, 15 en Amérique, 12 en Asie et 4 en Europe) soit 34%</b>	<b>19</b>
1a	2	1 Mauritanie	–
1b	42	1 "Afrique", 1 Algérie, 1 Brésil, 1 Cameroun, 2 Cuba, 1 Espagne, 1 États-Unis, 1 Haïti, 1 Inde, 2 Madagascar, 2 Maroc, 1 Mexique, 1 Monaco, 1 République Dominicaine, 1 Tchad, 1 Turquie	–
2a	112	3 Algérie, 1 Bolivie, 1 Cameroun, 1 Congo, 1 Haïti, 1 Inde, 1 Iran, 1 Japon, 1 Liban, 3 Maroc, 1 Mexique, 2 Népal, 1 Nigeria, 1 Portugal, 1 Réunion, 1 Sénégal, 1 Tunisie	8 familiale (2 Algérie non liés), 1 "autre" (Maroc)
2b	5	1 "Afrique", 1 Érythrée, 1 Madagascar, 1 Maroc	1 "autre" (Madagascar)
3a	27	1 Burkina Faso, 1 Cap-Vert, 1 Espagne, 1 Inde, 1 Madagascar, 1 Mali, 2 Maroc, 1 Martinique, 1 Sénégal	1 "autre" (Burkina Faso)
3b	2	–	–
4	7	1 "Afrique", 1 Colombie, 1 Sénégal	–
4 (mannitol–, indole+)	3	2 Cap-Vert	–
4 (mannitol–)	2	1 Cap-Vert	–
4c	8	1 Angola, 1 Bénin, 1 Cameroun, 1 Côte d'Ivoire	1 familial, 1 "autre groupement"
6 Boyd 88	27	2 "Afrique", 1 Burkina Faso, 2 Cap-Vert, 1 Congo, 1 Gabon, 1 Gambie, 1 Inde, 1 Madagascar, 4 Maroc	5 familiales (1 Cap-Vert), 1 "autre" ("Afrique")
6 Hertfordshire	1	–	–
sérotype provisoire 1c	2	–	–
sérotype provisoire 1c (6+)	2	–	–
sérotype provisoire 1c (7,8+)	24	1 Cap-Vert, 2 Côte d'Ivoire, 1 États-Unis, 2 Inde, 1 Maroc, 1 Tchad	–
X	2	1 Burkina Faso, 1 Pérou	–
Y	3	1 Pérou	–
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	<b>534</b>	<b>139 (70 en Afrique, 23 en Amérique, 34 en Asie et 12 en Europe) soit 26%</b>	<b>109</b>
a	13	1 Brésil, 1 Colombie, 1 La Réunion	–
e	5	1 Ukraine	–
g	345	5 Algérie, 2 Arabie Saoudite, 1 "Asie", 1 Bolivie, 1 Cambodge, 1 Costa Rica, 1 Côte d'Ivoire, 1 Croatie, 2 Cuba, 1 Dominique, 4 Égypte, 4 Espagne, 1 Grèce, 3 Haïti, 11 Inde, 3 Indonésie, 2 Israël, 1 Italie, 3 Liban, 2 Maroc, 1 Martinique, 3 Mexique, 1 Myanmar, 1 Nicaragua, 1 Ouzbékistan, 1 Pakistan, 1 Pérou, 4 République Dominicaine, 1 Roumanie, 4 Thaïlande, 3 Tunisie, 2 Turquie, 1 Viêt Nam	18 familiales (1 Grèce, 2 Liban, 1 Maroc, 1 Turquie), 1 TIAC (Israël), 1 hôpital, 50 école (1 Haïti), 4 "autre" (1 Cuba, 1 Indonésie)
g (mannitol–)	82	2 Algérie, 1 Cuba, 2 Espagne, 1 Madagascar, 1 Mali, 28 Maroc, 1 Portugal, 2 Tunisie	10 familiales (1 Espagne, 3 Maroc, 1 Tunisie), 1 TIAC (Maroc), 2 "autre" (Maroc)
g (ODC–)	2	1 Liban	–
g (ONPG–)	86	2 "Afrique", 5 Algérie, 1 "Amérique Latine", 3 Cap-Vert, 1 Cuba, 1 Égypte, 2 Gambie, 1 Guinée, 2 Mali, 1 Maroc, 2 Sénégal, 1 Togo, 1 Viêt Nam	7 familiales (3 Algérie), 11 école, 4 "autre"
<b>Total</b>	<b>855</b>	<b>254 soit 30%</b>	<b>130 soit 15%</b>

\*La notion de voyage ainsi que les épidémies sont indiquées en nombre de cas. La Turquie est ici comptabilisée en Asie. Le pays est souligné si  $\geq 5$  cas par sérotype.

### 2.2.5.3 Souches reçues des DOM-TOM

En 2017, le CNR-ESS a confirmé 142 souches uniques (une seule par patient) de *Shigella* en provenance des DOM-TOM : Guyane française, 92 souches ; Mayotte, 49 souches ; et La Réunion, une souche. La distribution par sérotype est indiquée dans le **tableau 20**.

**Tableau 20: Distribution des différents sérotypes de *Shigella* spp. reçues des DOM-TOM en 2017**

Sérotype	Guyane française	Mayotte	La Réunion
<b><i>Shigella flexneri</i></b>	<b>73</b>	<b>38</b>	<b>1</b>
1	2	0	0
1 groupe 6	0	2	0
1a	1	0	0
1b	17	<b>13</b>	<b>1</b>
2a	<b>46</b>	8	0
3a	6	3	0
3b	0	2	0
4 (mannitol-, indole+)	0	7	0
4 (mannitol-)	0	1	0
4 var. Saïgonensis	1	0	0
6 Boyd 88	0	2	0
<b><i>Shigella sonnei</i></b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>0</b>
a	0	9	0
g	18	1	0
g (mannitol-)	0	1	0
g (ONPG-)	1	0	0
<b>Total :</b>	<b>92</b>	<b>49</b>	<b>1</b>

En 2017, les souches reçues au CNR-ESS en provenance des DOM-TOM appartenaient uniquement aux sérogroupes *S. flexneri* et *S. sonnei*. Aucun voyage n'a été déclaré parmi les cas de shigellose des DOM-TOM. Et aucune souche n'était associée à une notion d'épidémie.

### 2.2.5.4 Fiches d'information reçues sans envoi de souches

En 2017, le CNR-ESS a reçu aussi des fiches d'information concernant 214 cas uniques d'infections à *Shigella* pour lesquels aucune souche n'a été envoyée. Tous ces cas provenaient de France métropolitaine. La majorité des cas était dû à *S. sonnei* (187/214, 87%) (**tableau 21**).

Parmi ces 214 cas, 34 étaient des cas groupés : 3 concernaient des crèches (*S. sonnei*), 5 des écoles (4 *S. sonnei* à Paris), et 22 étaient des cas familiaux (18 cas à *S. sonnei*, 3 cas à *S. flexneri*, 1 cas sans notion de sérotype). Des voyages récents ont été rapportés pour 67 cas ; le pays le plus notifié était le Maroc (12 cas dus à *S. sonnei*).

**Tableau 21: Bilan des fiches d'information de *Shigella* spp. en 2017**

Sérogroupe	Nombre de cas rapportés
<i>S. boydii</i>	1
<i>S. dysenteriae</i>	1
<i>S. flexneri</i>	18
<i>S. sonnei</i>	187
Non précisé	7
<b>Total</b>	<b>214</b>

En nombre de cas

## 2.2.6 Activités de séquençage

En 2017 le CNR-ESS a réalisé une analyse par WGS pour 949 (95,2%) des 997 souches de *Shigella* spp. reçues.

Le séquençage a été réalisé à la Plateforme mutualisée (P2M) de PIBnet (Pasteur International Bioresources Network). Le profil MLST, les gènes de virulence les plus communs chez *Shigella* spp., et le résistome ont été analysés.

La technique du MLST ('multi-locus sequence typing') permet de grouper les souches par rapport à sept gènes ("gènes de ménage") : *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, selon le protocole développé par M. Achtman (University of Warwick, United Kingdom).

Ceci a permis de classer les 949 souches séquencées en 25 sequence types (ST) différents. Les quatre ST les plus fréquemment retrouvés étaient ST152 (514 souches), ST245 (301 souches), ST145 (40 souches) et ST630 (15 souches). Onze souches n'ont pas été typables et neuf souches avaient des nouveaux ST (8 nouveaux ST car deux souches partageait le même profil).

Il n'y a pas une corrélation parfaite entre le sérogroupe de *Shigella* spp. et les ST. C'est pour cela que nous travaillons sur d'autres régions comme la région *rfb* codant pour le LPS et la région CRISPR pour compléter l'analyse MLST et arriver à inférer de façon robuste le sérotype à partir des séquences WGS.

## 2.3 Activités de surveillance des *Shigella*

### 2.3.1 Description du réseau de partenaires

#### 2.3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ESS collabore depuis des nombreuses années avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Écoles vétérinaires...), sur une base volontaire, avec autour de 1200 laboratoires de biologie médicale participants.

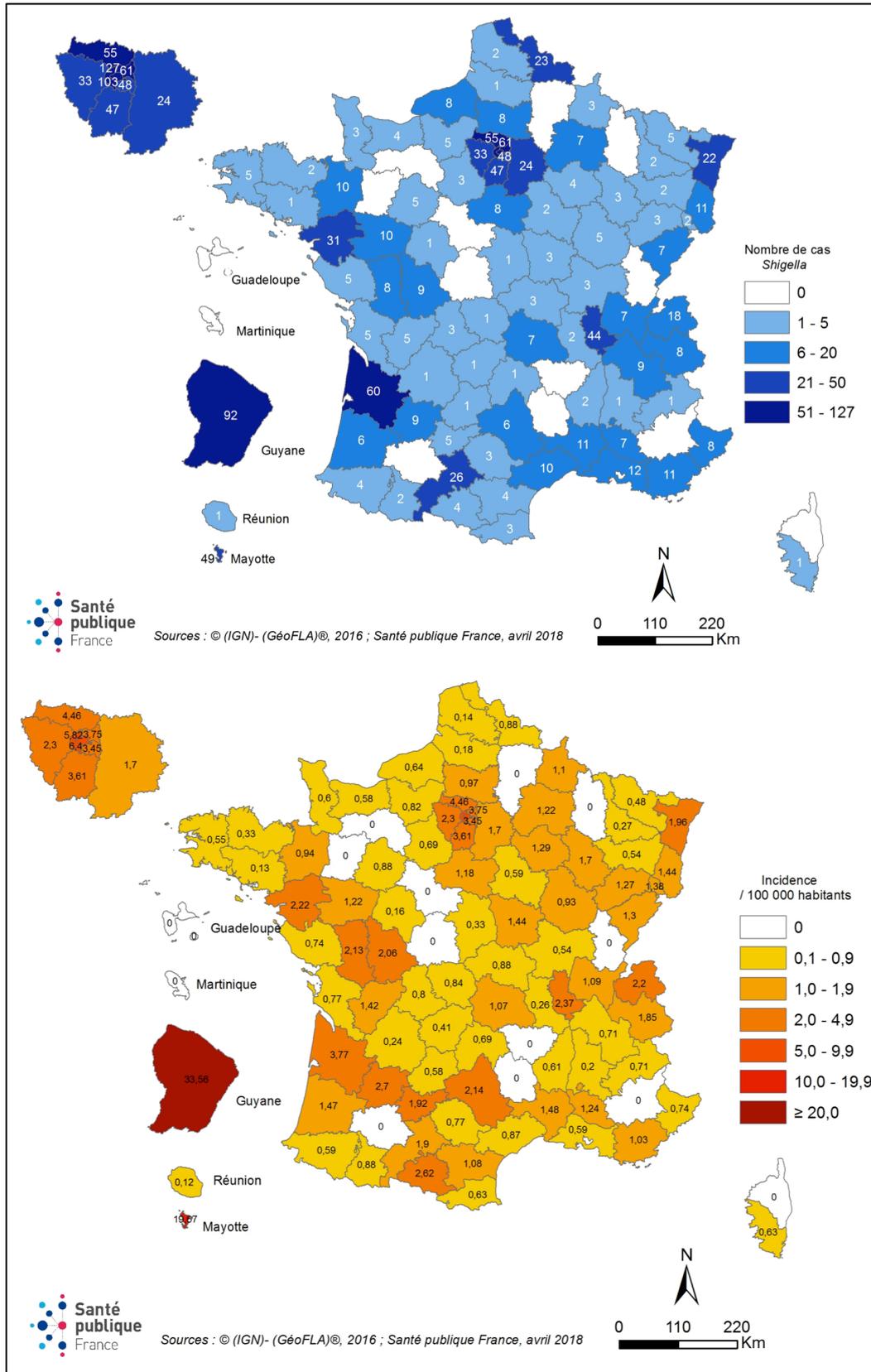
### 2.3.1.2 Distribution globale des cas de shigellose en France métropolitaine et DOM-TOM

La **figure 8** montre le détail de la répartition des cas de shigellose signalés en France en 2017, ainsi que l'incidence des shigelloses par rapport à la population de chaque département.

Les 1211 cas de shigellose humaine répertoriés par le CNR-ESS pendant l'année 2017 (souches et fiches d'information) provenaient de 87 départements de France métropolitaine et de 3 DOM (Guyane, La Réunion et Mayotte). Aucune souche ou fiche n'a été envoyée depuis les TOM. Le détail de la répartition par département est présenté dans la **figure 8**.

À noter un regroupement de cas en Gironde, lié à une épidémie à *S. sonnei* g avec une cinquantaine de cas déclarés, à Macau.

Figure 8: Nombre de cas et incidence des shigelloses par département en France en 2017.



(Carte réalisée par Santé publique France, Avril 2018, Edith Laurent)

La répartition des cas de *Shigella* spp. enregistrés au CNR-ESS (souches et fiches d'information), en fonction de leur site de prélèvement, est présentée dans le **tableau 22**.

**Tableau 22: Répartition par site de prélèvement des souches de *Shigella* spp. reçues au CNR-ESS en 2017**

	France métropolitaine	DOM-TOM
Biopsie	11	0
Sang	2 (1 souche <i>S. flexneri</i> 2a + 1 souche <i>S. sonnei</i> )	2 (2 souches <i>S. flexneri</i> 2a)
Selles	1051	139
Urines	5	1
<b>Total</b>	<b>1069</b>	<b>142</b>

### 2.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

#### 2.3.2.1 Analyse de la distribution en France métropolitaine et analyse de tendances

En 2017, le CNR-ESS a reçu 855 souches de *Shigella* spp. en provenance de France métropolitaine contre 754 en 2016, 682 en 2015, 866 en 2014 et 673 en 2013.

La distribution des différentes souches et du nombre de cas d'infection à *Shigella* spp. en France métropolitaine sur les cinq dernières années (2013-2017) est représentée dans le **tableau 23** et la **figure 9**. *S. sonnei* ( $58 \pm 4,1\%$ ), et *S. flexneri* ( $34 \pm 3,8\%$ ) sont les sérogroupes les plus fréquemment isolés, alors que *S. dysenteriae* ( $2 \pm 0,3\%$ ) et *S. boydii* ( $5 \pm 0,6\%$ ) sont toujours faiblement représentés.

#### 3.3.2.1.a Répartition par sérotypes

*S. sonnei* g est toujours le sérotype prépondérant en France métropolitaine. Le variant *S. sonnei* g (mannitol-) est plus souvent isolé en 2017 (86 cas) qu'en 2016 (50 cas). Le nombre de cas à *S. flexneri* 2a a légèrement diminué en 2017 (113 cas) par rapport à 2016 (137 cas), mais il reste encore le deuxième sérotype le plus fréquent en France métropolitaine.

Parmi les souches de *S. flexneri* isolées en France métropolitaine, le sérotype 2a est le plus fréquent (112/271, 42%) (**figure 10**).

**Tableau 23: Distribution des différents sérotypes de *Shigella* spp. entre 2013 et 2017**

Sérotypes	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Shigella boydii</i>	42 (42)	44 (44)	42 (42)	37 (37)	36 (37)
1	3	1	2	3	1
2	11	17	12	9	14
4	12	15	16	5	1
5	1	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–
9	–	–	–	1	–
10	4	1	4	2	2
11	–	1	–	5	11
12	1	–	1	1	1
13	–	3	2	3	–
14	2	1	2	1	3
18	1	2	1	–	–
19	–	–	–	1	1
20	6	3	2	6	2
Sérotipe provisoire Ewing 1621-54	1	–	–	–	–
<i>Shigella dysenteriae</i>	13 (13)	26 (26)	12 (12)	14 (14)	15 (16)
2	4	5	4	2	5
3	–	–	3	6	1
4	2	3	–	–	1
6	–	1	–	1	–
9	–	–	–	1	1
12	1	1	1	1	2
14	–	–	–	–	–
Sérotipe provisoire 97-10607 (96-204)	6	14	4	3	2
Sérotipe provisoire 93-119	–	1	–	–	–
Sérotipe provisoire Sh 111	–	1	–	–	2
<i>Shigella flexneri</i>	259 (263)	226 (227)	239 (243)	278 (283)	271 (289)
1	7	3	2	–	–
1a	4	–	2	2	2
1b	30	36	43	43	42
2a	69	105	96	137 (139)	112
2b	16	9	7	11	5
3a	49	21	34	23	27
3b	3	2	4	8	2
4	7	9	4	9	7
4 (mannitol–)	–	–	–	1	2
4 variété Saïgonensis	2	–	–	–	–
4a	1	–	1	–	–
4b	1	–	–	–	–
4c	6	6	12	3	8
6 Boyd 88	35	19	15	18/(19)	27
6 Hertfordshire	5	5	2	3	1
6 Manchester	1	–	–	–	–
6 Newcastle	1	–	–	–	–
X	2	2	–	3	2
Y	3	1	2	1	3
Sérotipe provisoire 1c	17	8	15 (16)	16 (18)	2
<i>Shigella sonnei</i>	350 (355)	558 (569)	380 (384)	416 (419)	533 (720)
a	14	23	11	11	13
a (mannitol–)	–	–	1	–	–
a (ODC–)	–	–	–	2	–
e	–	1	–	2	5
f	1	2	1	–	–
g	253	413	220	260 (261)	345
g (mannitol–)	46	70	82	90 (91)	82
g (mannitol– et ODC–)	–	1	1	–	–
g (mannitol– et ONPG–)	1	6	2	1	–
g (ONPG–)	33	40	61	50 (51)	86
g (ODC–)	2	–	1	–	2
g (ODC– et ONPG–)	–	2	–	–	–
Rough/ Non sérotypable (ou Non sérotypé)	–	–	1 (1)	1 (1)	–
<b>Total</b>	<b>664 (673)</b>	<b>854 (866)</b>	<b>674 (682)</b>	<b>746 (754)</b>	<b>855 (1062)</b>

Nombre de souches reçues (en comptant également les fiches d'information reçues).

Figure 9 : Evolution des sérogroupes de Shigella (France métropolitaine, 2013-2017)

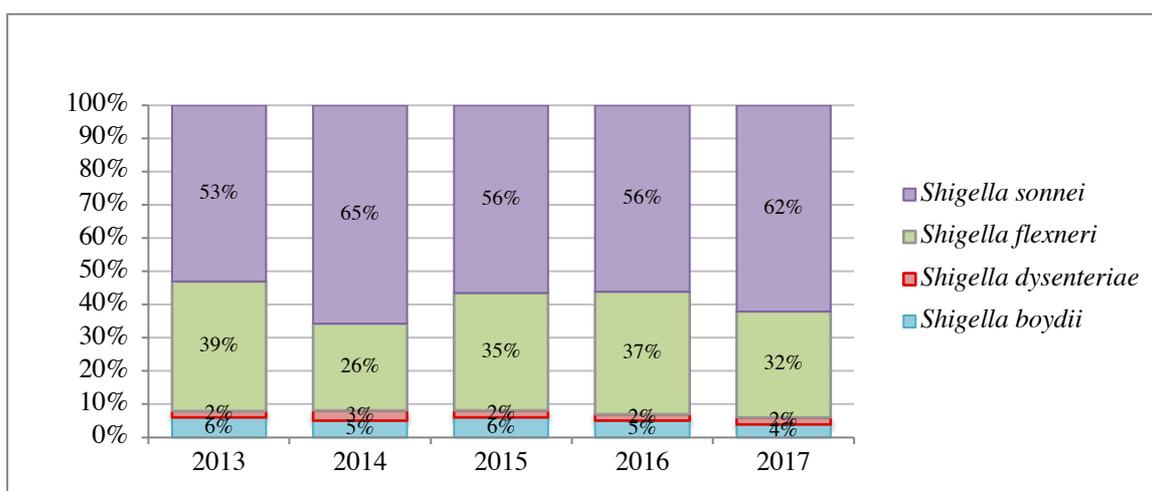
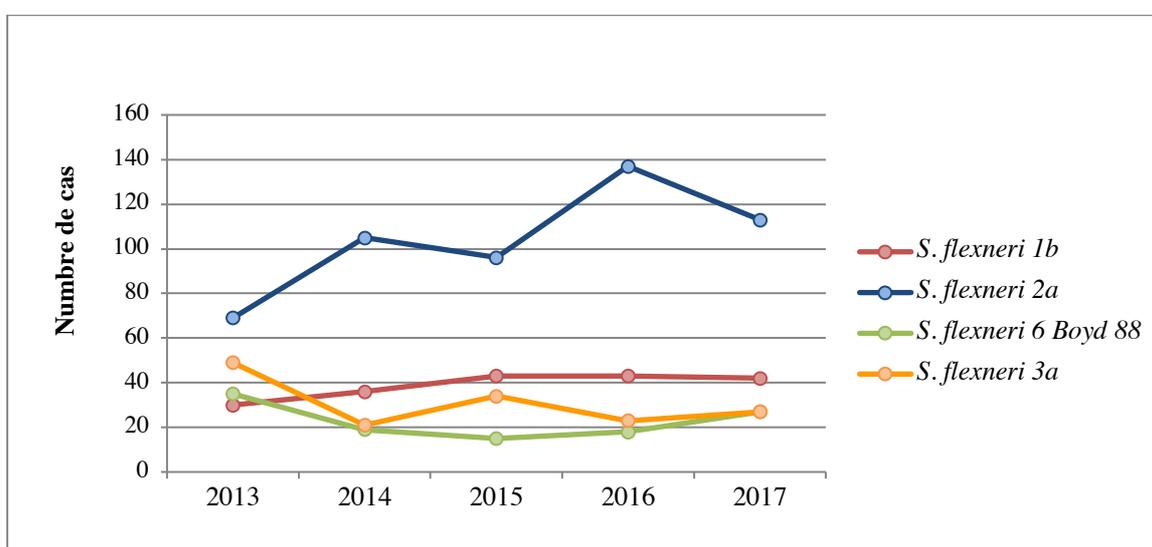


Figure 10 : Principaux sérotypes de *S. flexneri* (France métropolitaine, 2013-2017)



### 2.3.2.1.b Répartition par sexe

En 2017, le sexe-ratio des cas de shigellose observés au CNR-ESS révélait une prédominance de cas masculins (55%) en France métropolitaine (**tableau 24**).

Tableau 24: Répartition par sexe des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017

	n	%
Femme	386 (103)	45% (48%)
Homme	469 (111)	55% (52%)
Total	855 (214)	100%

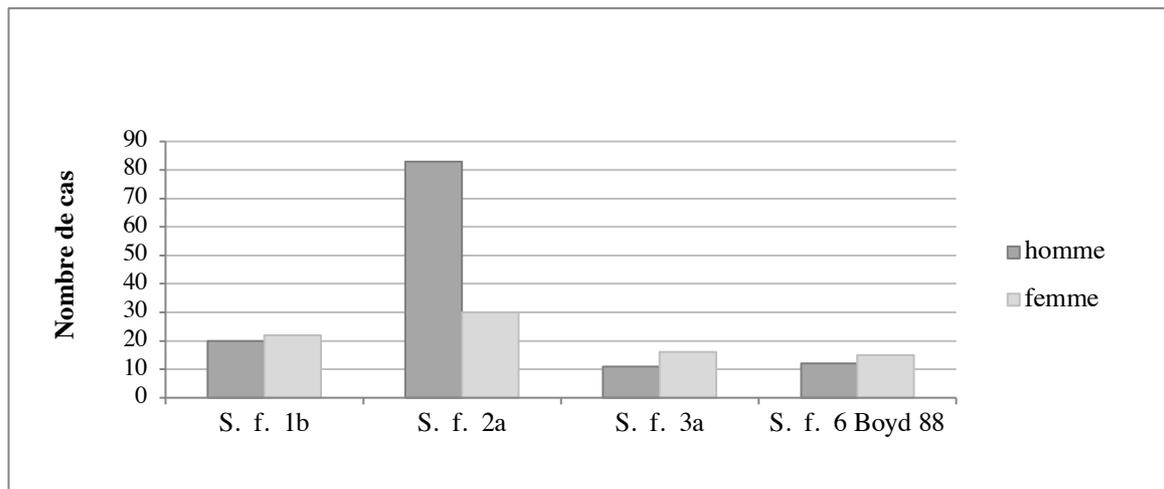
Les données issues des fiches d'information sont indiquées entre parenthèses.

Depuis 2016, le sexe-ratio des cas causés par *S. flexneri* 2a est nettement en faveur des cas masculins (187/249, 75%) (**figure 11**).

De plus, le profil de résistance aux antibiotiques est particulier : avec une plus grande résistance à l'azithromycine chez les souches provenant des cas masculins (36%) que des cas féminins (9%).

Selon les rapports de surveillance au Royaume Uni (Euro Surveill 2015;20(15):pii=21097), ceci est en rapport avec la communauté homosexuelle masculine, mais cette information n'est pas disponible en France. Une étude est en cours en collaboration avec Santé publique France pour étudier la prévalence de *S. flexneri* 2a dans cette communauté.

**Figure 11: Principaux sérotypes de *S. flexneri* en fonction du sexe du patient (France métropolitaine, 2017)**



### 2.3.2.1.c Répartition par âge

Le **tableau 25**, ainsi que la **figure 12**, montrent le détail de la répartition des cas de shigellose par classe d'âge en France métropolitaine en 2017.

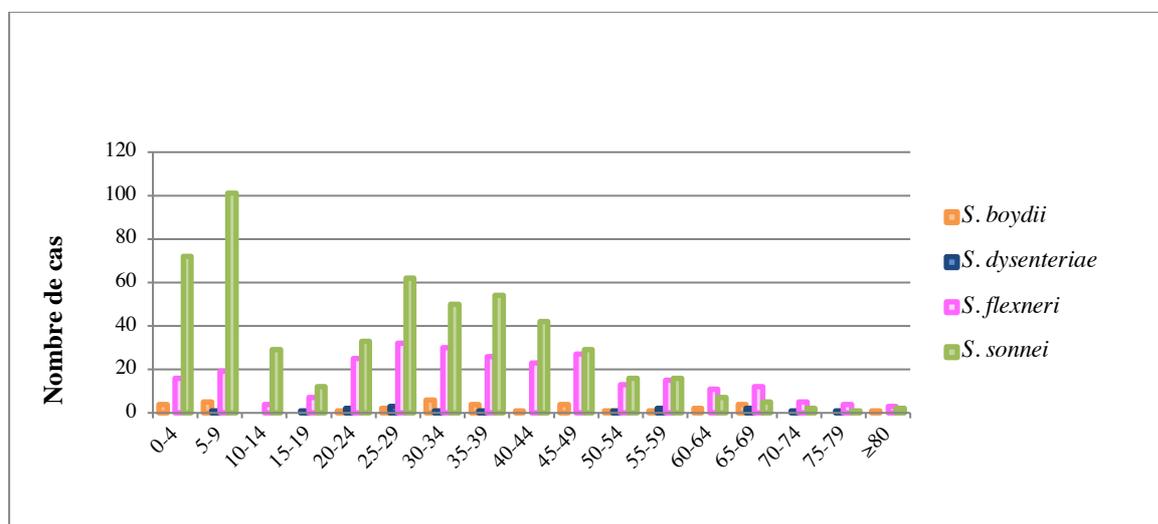
En 2017, l'incidence chez les 0–9 ans (2,85/100 000 habitants) est supérieure aux autres classes d'âge et elle est deux fois plus élevée que celle de la population générale (1,32/100 000 habitants) (**tableau 26**). À noter l'épidémie à *S. sonnei* g dans une école à Macau (Gironde) en mars 2017, avec environ 50 cas déclarés. L'incidence des shigelloses parmi les 20-39 ans (2,15/100 000 habitants) est également élevée alors qu'elle est plus basse pour la population de 70 ans et plus (0,22/100 000 habitants).

**Tableau 25. Répartition par classe d'âge des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017**

	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	Total
0-4	4 (11%)	0 (0%)	16 (6%)	72 (14%)	92 (11%)
5-9	5 (14%)	1 (6%)	19 (7%)	<b>101 (19%)</b>	<b>126 (15%)</b>
10-14	0 (0%)	0 (0%)	4 (1%)	29 (5%)	33 (4%)
15-19	0 (0%)	1 (6%)	7 (3%)	12 (2%)	20 (2%)
20-24	1 (3%)	2 (13%)	25 (9%)	33 (6%)	61 (7%)
25-29	2 (6%)	<b>2 (19%)</b>	<b>32 (12%)</b>	62 (12%)	98 (12%)
30-34	<b>6 (17%)</b>	1 (6%)	30 (11%)	50 (9%)	87 (10%)
35-39	4 (11%)	1 (6%)	26 (10%)	54 (10%)	85 (10%)
40-44	1 (3%)	0 (0%)	23 (8%)	42 (8%)	66 (8%)
45-49	4 (11%)	0 (0%)	26 (10%)	29 (5%)	59 (7%)
50-54	1 (3%)	1 (6%)	13 (5%)	16 (3%)	31 (4%)
55-59	1 (3%)	2 (13%)	15 (6%)	16 (3%)	34 (4%)
60-64	2 (6%)	0 (0%)	11 (4%)	7 (1%)	20 (2%)
65-69	4 (11%)	2 (13%)	12 (4%)	5 (1%)	23 (3%)
70-74	0 (0%)	1 (6%)	5 (1%)	2 (0%)	8 (1%)
75-79	0 (0%)	1 (6%)	4 (1%)	1 (0%)	6 (1%)
≥80	1 (0%)	0 (0%)	3 (1%)	2 (0%)	6 (1%)
<b>Total</b>	36 (100%)	15 (100%)	271 (100%)	533 (100%)	855 (100%)

Nombre de cas (% de cas).

**Figure 12: Répartition des cas de shigellose par classe d'âge (France métropolitaine, 2017)**



**Tableau 26: Incidence des cas de shigellose en France métropolitaine en 2017**

	<b>Nombre d'habitants (%)</b>	<b>Incidence des cas de shigellose (pour 100 000 habitants)</b>
<b>0-9</b>	7652892 (12%)	<b>2,85</b>
<b>10-19</b>	8035093 (12%)	0,66
<b>20-29</b>	7412438 (11%)	<b>2,16</b>
<b>30-39</b>	8045314 (12%)	<b>2,14</b>
<b>40-49</b>	8495936 (13%)	1,48
<b>50-59</b>	8538117 (13%)	0,76
<b>60-69</b>	7823930 (12%)	0,55
<b>70-79</b>	5077053 (8%)	0,28
<b>≥80</b>	3937323 (6%)	0,15
<b>Total</b>	<b>65018096 (100%)</b>	<b>1,32</b>

Données sur la population générale de France métropolitaine publiées par l'INSEE en janvier 2018.

#### 2.3.2.2 Analyse de la distribution dans les DOM-TOM et analyse de tendances

La distribution des différentes souches et du nombre de cas d'infection à *Shigella* spp. répertoriées au CNR-ESS pour les DOM-TOM de 2013 à 2017 est représentée dans la **figure 13**.

En 2017, le CNR-ESS a reçu 142 souches depuis des départements de la France d'outre-mer. Parmi elles, 92 souches ont été envoyées de Guyane, 49 souches de Mayotte et une souche de La Réunion. Le CNR-ESS n'a pas reçu de fiches d'information des DOM-TOM en 2017.

##### 2.3.2.2.a Répartition par sérotypes

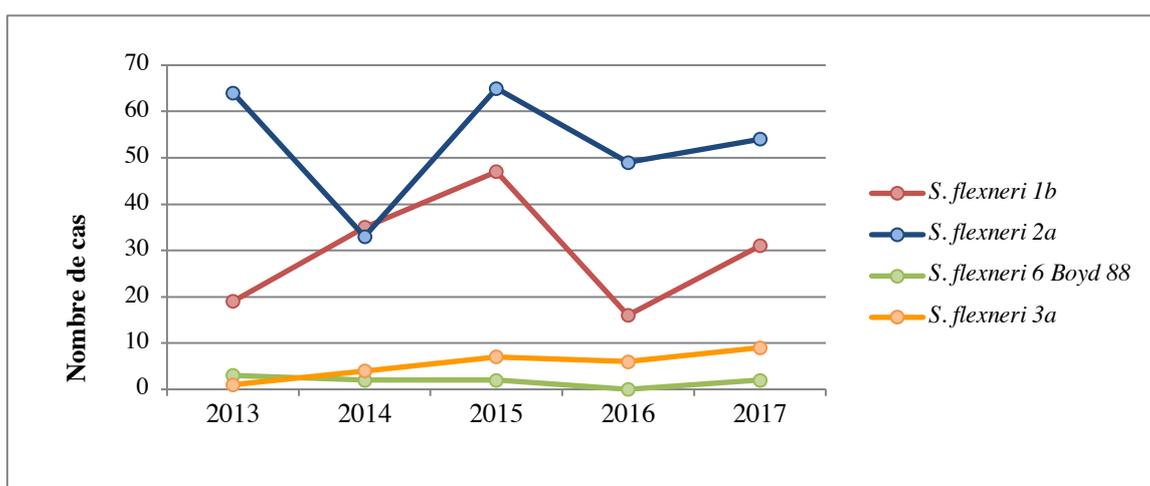
Il est important de noter que la distribution par sérotypes n'est pas similaire en Métropole et dans les DOM-TOM. Alors que le sérotype *S. sonnei* est le plus fréquemment isolé en France Métropolitaine, c'est *S. flexneri* qui est le plus isolé dans les DOM-TOM.

Figure 13: Evolution des différents sérogroupes de *Shigella* spp. (DOM-TOM, 2013-2017)



Avec des variations d'incidence selon les années, *S. flexneri* 2a est le sérotype prépondérant dans les DOM-TOM depuis 2015, suivi de *S. flexneri* 1b (figure 14).

Figure 14: Evolution des principaux sérotypes de *S. flexneri* (DOM-TOM, 2013-2017)



### 2.3.2.2.b Répartition par sexe

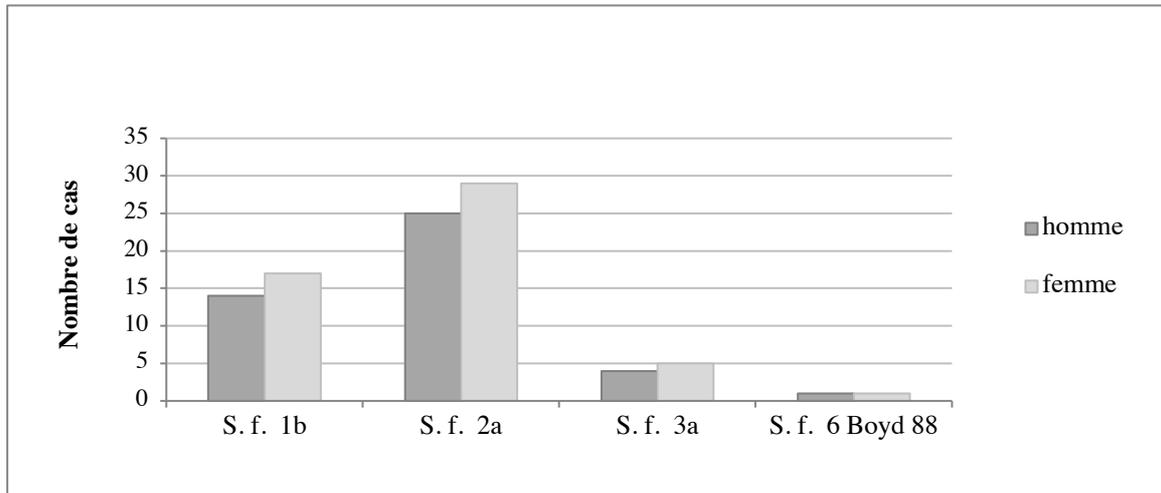
Contrairement à ce qui est observé en France métropolitaine, le sexe-ratio des cas de shigellose dans les DOM-TOM montre une prédominance féminine (56% des cas) (tableau 27).

Tableau 27: Répartition par sexe des cas de shigellose dans les DOM-TOM en 2017

	n	%
Femme	80	56%
Homme	62	44%
Total	142	100%

Le sérotype *S. flexneri* 2a est plus fréquent chez les femmes que chez les hommes dans les DOM-TOM, à la différence de ce qui est observé en France métropolitaine (**figure 15**).

**Figure 15: Principaux sérotypes de *S. flexneri* en fonction du sexe du patient (DOM-TOM, 2017)**

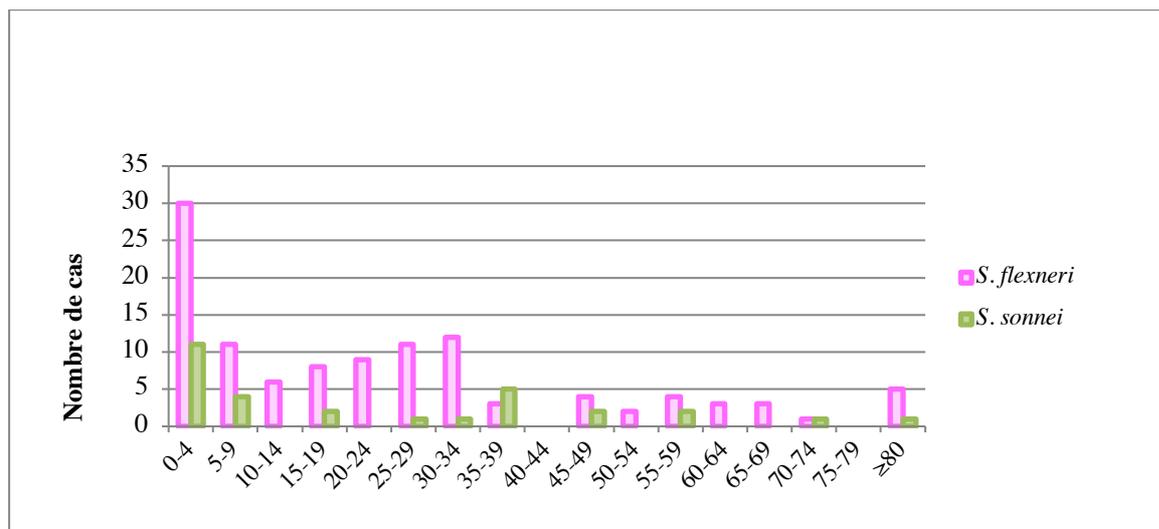


#### 2.3.2.2.c Répartition par âge

En 2017, les cas de shigellose dans les DOM-TOM étaient plus jeunes que pour la France métropolitaine. Les taux maximaux d'infection ont été observés dans la classe d'âge 0–4 ans, alors qu'en France métropolitaine c'était parmi les 5–9 ans.

*S. sonnei* n'est pas une cause majeure de cas chez les adultes jeunes (20–50 ans) dans les DOM-TOM (**figure 16**), contrairement à ce qui est observé en France métropolitaine.

**Figure 16: Répartition des cas de shigellose par âge dans les DOM-TOM en 2017**



L'incidence des shigelloses dans les DOM-TOM pour 2017 est détaillée dans le **tableau 28**.

**Tableau 28 : Incidence des cas de shigellose dans les DOM-TOM en 2017**

	Incidence des cas de shigellose (pour 100 000 habitants)		
	Guyane	La Réunion	Mayotte
0-9	72,41	0,77	12,5
10-19	24,63	0	3,3
20-29	23,50	0	35,6
30-39	14,88	0	41,1
40-49	11,21	0	8,5
50-59	20,55	0	22,4
60-69	26,28	0	30,7
70-79	32,98	0	0,00
≥80	110,95	0	251,3
<b>Total</b>	<b>337,39</b>	<b>0,77</b>	<b>405,2</b>

Données sur la population générale des DOMs publiées par l'INSEE en janvier 2018.

### 2.3.3 Surveillance de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques

#### 2.3.3.1 Surveillance globale

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue au CNR-ESS par la méthode de diffusion en milieu solide selon le référentiel CASFM/EUCAST 2017.

En 2017, les antibiotiques testés (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) étaient ceux détaillés dans le **tableau 29**.

En cas de résultats intermédiaires ou discordants, les CMI sont déterminées par bandelettes E-test (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

Un antibiogramme a été réalisé sur toutes les souches de *Shigella* spp. reçues au CNR-ESS en 2017.

En France métropolitaine, les quatre sérogroupes de *Shigella* spp. ont montré majoritairement un profil SSuTmpTe, qui est devenu fréquemment ASSuTmpTe chez les *S. flexneri*, et SSuTmpTeAzm chez les *S. sonnei*. Le **tableau 30** donne le pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches de France métropolitaine en 2017.

Dans les DOM-TOM, *S. flexneri* a montré un profil ASTmpCTe, alors que *S. sonnei* avait plus fréquemment un profil ASuTmpCTe. Le **tableau 31** donne le pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches des DOM-TOM en 2017.

Le séquençage du génome entier a été réalisé sur la très grande majorité des souches de *Shigella* spp. (949/997, 95,2%). Cette nouvelle technique nous a permis de déterminer l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques (**tableau 32**).

**Tableau 29: Antibiotiques utilisés pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Shigella* spp.**

Antibiotique	Abréviation des disques	Abréviation des profils de résistance
Ampicilline 10µg	AMP	A
Ceftazidime 10 µg	CAZ	Caz
Céfotaxime 5µg	CTX	Ctx
Ertapénème 10µg	ETP	–
Streptomycine 10 µg	STR	S
Amikacine 30µg	AMK	–
Gentamycine 10µg	GEN	G
Acide nalidixique 30µg	NAL	Nal
Péfloxacine 5µg	PEF	–
Ciprofloxacine 5µg	CIP	Cip
Tétracycline 30µg	TET	Te
Tigécycline 15µg	TIG	–
Chloramphénicol 30µg	CHL	C
Sulfamides 200µg	SUL	Su
Triméthoprim 5µg	TMP	Tmp
Azithromycine 15µg	AZM	Azm

**Tableau 30: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de *Shigella* (France métropolitaine, 2017)**

	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Moyenne
Total souches	271	533	36	15	855
AMP	<b>76%</b>	33%	44%	44%	47,4%
CTX	1%	10%	0%	0%	6,5%
STR	<b>88%</b>	<b>93%</b>	<b>53%</b>	<b>75%</b>	<b>89,7%</b>
AMK	0%	0%	0%	0%	0,1%
GEN	1%	7%	0%	0%	4,4%
TMP	<b>67%</b>	<b>98%</b>	<b>83%</b>	<b>75%</b>	<b>87,6%</b>
SUL	<b>61%</b>	<b>76%</b>	<b>72%</b>	<b>75%</b>	<b>71,1%</b>
CHL	<b>56%</b>	4%	8%	25%	20,7%
TET	<b>84%</b>	<b>66%</b>	<b>75%</b>	<b>75%</b>	<b>72,6%</b>
NAL	10%	31%	6%	0%	23%
CIP	9%	20%	0%	0%	15,3%
AZM	33%	<b>52%</b>	19%	31%	24%

En gras, les nombres >50%.

**Tableau 31: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de *Shigella* (DOM-TOM, 2017)**

	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	Moyenne
Total souches	112	30	142
AMP	<b>74%</b>	<b>57%</b>	<b>70,4%</b>
CTX	1%	0%	0,7%
STR	<b>95%</b>	43%	<b>83,8%</b>
AMK	0%	0%	0%
GEN	0%	0%	0%
TMP	<b>71%</b>	<b>63%</b>	<b>69,7%</b>
SUL	23%	<b>63%</b>	31,7%
CHL	<b>69%</b>	<b>53%</b>	<b>65,5%</b>
TET	<b>85%</b>	<b>67%</b>	<b>81,0%</b>
NAL	1%	3%	1,4%
CIP	0%	0%	0%
AZM	0%	0%	0%

En gras, les nombres >50%.

**Tableau 32: Caractérisation des principaux gènes de résistance aux antibiotiques détectés par WGS chez *Shigella* spp. en 2017**

Résistance à	<i>S. boydii</i> (n = 33)	<i>S. dysenteriae</i> (n = 13)	<i>S. flexneri</i> (n = 365)	<i>S. sonnei</i> (n = 538)
β-LAC	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (3) <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (7)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (3) <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (4)	<i>bla</i> <sub>CARB-2</sub> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> (2) <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (4) <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (92) <i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-1C</sub> (1) <b><i>bla</i><sub>OXA-1</sub> (217)</b> <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub> (2) <i>bla</i> <sub>OXA-320</sub> (1) <i>bla</i> <sub>TEM-209</sub> (1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> (2) <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> (27) <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> (1) <i>bla</i> <sub>OXA-211</sub> (1) <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> (10) <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> (97) <i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub> (2) <i>bla</i> <sub>TEM-1C</sub> (9) <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> (33) <i>bla</i> <sub>TEM-158</sub> (5) <i>bla</i> <sub>TEM-209</sub> (1)
AMI	<i>aadA1</i> (7) <b><i>strA</i> (19)</b> <b><i>strB</i> (19)</b>	<i>aadA1</i> (4) <b><i>strA</i> (10)</b> <b><i>strB</i> (9)</b>	<i>aac(3)-IIa</i> (2) <i>aadB</i> (1) <b><i>aadA1</i> (251)</b> <i>aph(3')-VIIa</i> (1) <i>aadA2</i> (3) <i>strA</i> (134) <i>aadA5</i> (40) <i>strB</i> (135)	<i>aac(3)-IIa</i> (36) <i>aadA5</i> (47) <i>aac(3)-IId</i> (3) <b><i>strA</i> (337)</b> <i>aac(3)-VIIa</i> (1) <b><i>strB</i> (337)</b> <b><i>aadA1</i> (283)</b>
MACR	0	0	<i>erm(B)</i> (40) <i>mph(A)</i> (55) <i>mph(E)</i> (1) <i>msr(E)</i> (1)	<i>erm(B)</i> (105) <i>mph(A)</i> (142)
PHEN	<i>catA1</i> (3)	<i>catA1</i> (3)	<b><i>catA1</i> (227)</b> <i>catA2</i> (2) <i>cml</i> (1) <i>cmlA1</i> (1)	<i>catA1</i> (28) <i>floR</i> (7)
SUL	<i>sul1</i> (12) <b><i>sul2</i> (22)</b>	<i>sul1</i> (1) <b><i>sul2</i> (10)</b>	<i>sul1</i> (50) <i>sul2</i> (152) <i>sul3</i> (1)	<i>sul1</i> (80) <b><i>sul2</i> (369)</b>
TET	<i>tet(A)</i> (12) <i>tet(B)</i> (15)	<i>tet(A)</i> (3) <i>tet(B)</i> (7)	<i>tet(A)</i> (40) <b><i>tet(B)</i> (276)</b>	<b><i>tet(A)</i> (292)</b> <i>tet(B)</i> (59)
TMP	<b><i>dfrA1</i> (18)</b> <i>dfrA5</i> (2) <i>dfrA7</i> (10) <i>dfrA14</i> (11) <b><i>dfrA17</i> (86)</b>	<b><i>dfrA1</i> (8)</b> <i>dfrA7</i> (1) <i>dfrA14</i> (4)	<b><i>dfrA1</i> (241)</b> <i>dfrA12</i> (2) <i>dfrA5</i> (5) <i>dfrA14</i> (86) <i>dfrA7</i> (5) <i>dfrA17</i> (39) <i>dfrA8</i> (1) <i>dfrA18</i> (1)	<b><i>dfrA1</i> (515)</b> <i>dfrA5</i> (32) <i>dfrA14</i> (32) <i>dfrA7</i> (17) <i>dfrA17</i> (47) <i>dfrA8</i> (4)

β-LAC signifie β-lactamines ; AMI : aminosides ; MACR : macrolides, notamment azithromycine ; PHEN : phénicolés, notamment chloramphénicol.

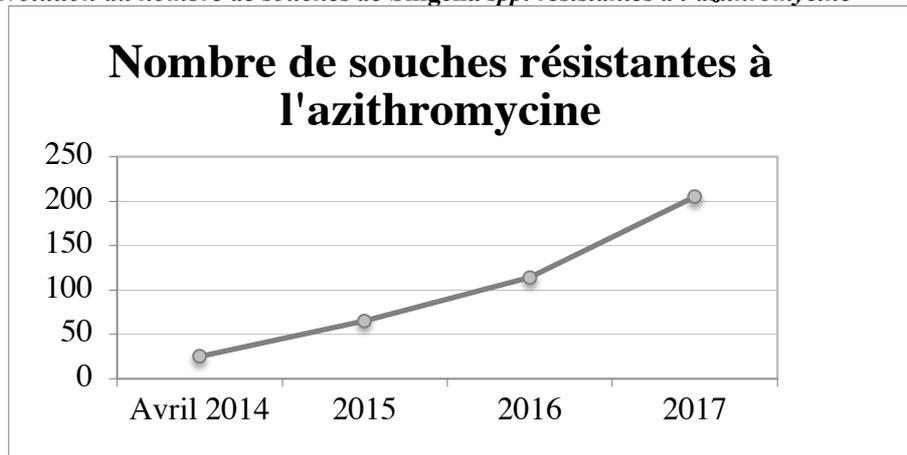
En gras, les gènes de résistance observés dans >50% des souches de chaque séro groupe.

### 2.3.3.2 Résistances émergentes chez *Shigella* spp.

#### 2.3.3.2.a Résistance à l'azithromycine

L'azithromycine est testée en routine au CNR depuis avril 2014. Depuis cette date, le nombre de souches AZM<sup>R</sup> (CMI >16 mg/L) reçues au CNR a augmenté chaque année : 25 en 2014 ; 65 en 2015 ; 114 en 2016 et 205 en 2017 (**figure 17**). En 2017 l'analyse WGS a été réalisée sur 204/205 souches AZM<sup>R</sup> reçues. Les gènes responsables de ce phénotype ont été identifiés comme *mph(A)* chez 54 souches, et *mph(A)* + *erm(B)* chez 150 souches.

**Figure 17: Évolution du nombre de souches de *Shigella* spp. résistantes à l'azithromycine**



Parmi les 205 souches AZM<sup>R</sup>, 83% (170 souches) provenaient de cas masculins. Il a été toutefois noté une augmentation des cas féminins en 2017 : 35 souches (17%) par rapport à 2016 (10%).

Il est particulièrement intéressant de noter que la résistance à l'azithromycine chez *S. flexneri* 2a n'est retrouvée que quasi-exclusivement chez les hommes (30/32, 93% des cas), alors que pour les shigelloses causées par *S. flexneri* 2a AZM<sup>S</sup> la proportion des infections chez les hommes est seulement de 58% (77/133).

Les 11 souches du sérotype provisoire 1c (7,8+) de *S. flexneri* résistantes à l'azithromycine étaient de sexe masculin.

Cinq profils particuliers de multi-résistance aux antibiotiques ont été détectés parmi les souches AZM<sup>R</sup> :

- ACtxSSuTmpTeAzm : 39 souches de *Shigella* spp. avec un phénotype BLSE.
  - 32 souches de *S. sonnei* g, avec *bla*<sub>CTX-M-55</sub> comme gène de BLSE
  - 2 souches de *S. sonnei* g, avec *bla*<sub>CTX-M-27</sub> comme gène de BLSE
  - 3 souches de *S. sonnei* g, une souche de *S. sonnei* g (ONPG–) et une souche de *S. flexneri* 2a, avec *bla*<sub>CTX-M-15</sub> comme gène de BLSE

- ASSuTmpTeAzm : 86 souches de *Shigella* spp. dont :
  - 54 souches de *S. sonnei* g
  - 14 souches de *S. sonnei* g (ONPG–)
  - 11 souches de *S. flexneri* sérotype provisoire 1c (7,8+)
- ASSuTmpCTeAzm : 31 souches, 28 d'entre elles étaient des *S. flexneri* 2a
- SSuTmpAzm : 27 souches de *S. sonnei* g
- ASSuTmpAzm : 9 souches *S. sonnei* g
- ASCTeAzm : 8 souches de *S. flexneri* (2a, 3a, 3b)

En 2016, le phénotype ASCTeAzm avait été le plus fréquent parmi les souches de *S. flexneri* (87%). En 2017, 90% des souches de *S. flexneri* 2a AZM<sup>R</sup> avaient plutôt un profil ASSuTmpCTeAzm, alors que seulement deux souches avaient gardé le profil ASCTeAzm de 2016.

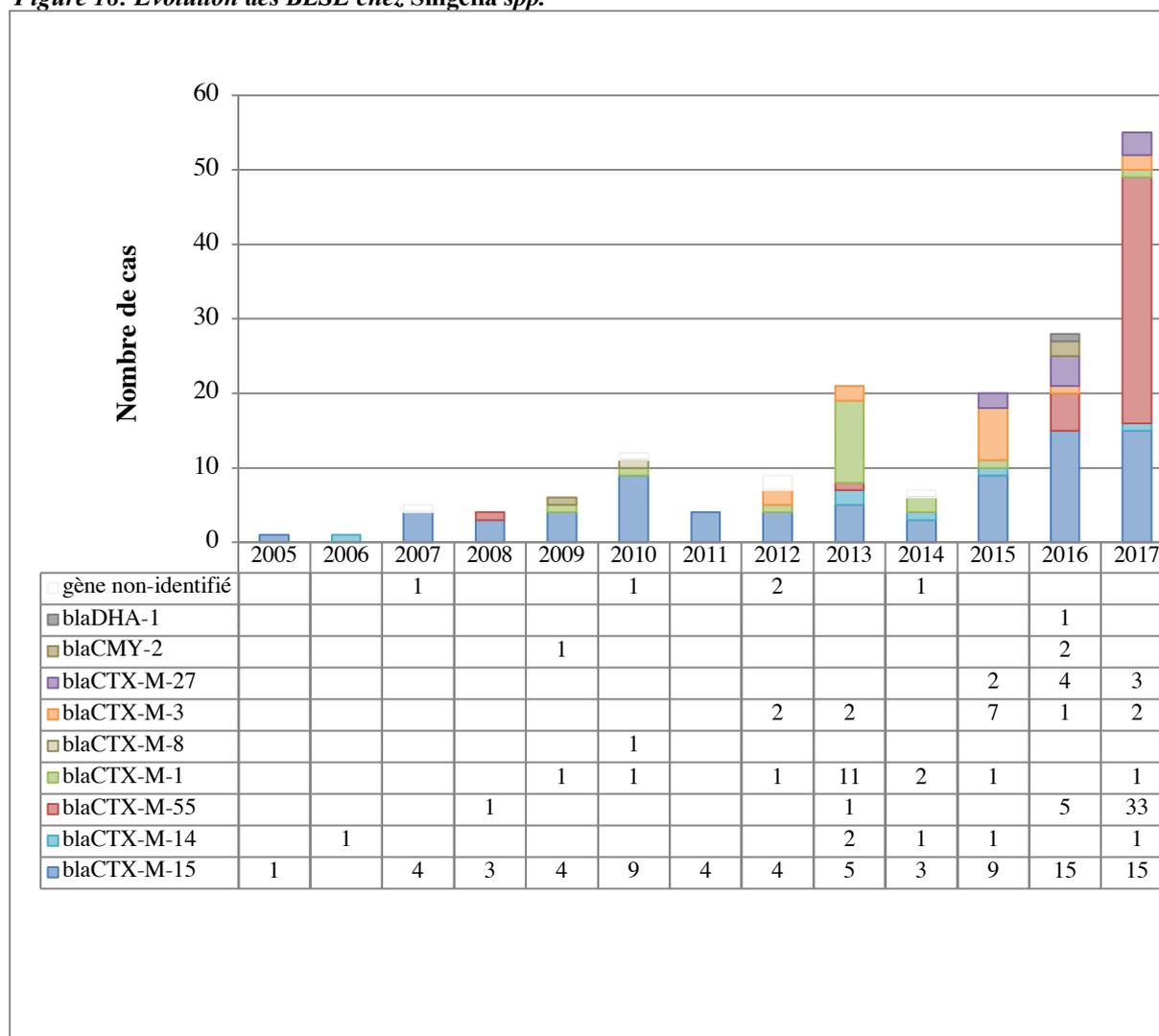
#### 2.3.3.2.b Résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

Le CNR-ESS a détecté un profil de BLSE chez 55 souches de *Shigella* : 47 souches de *S. sonnei* g, trois de *S. sonnei* g (ONPG–), une de *S. sonnei* e, deux de *S. flexneri* 2a, une de *S. flexneri* 3a et une de *S. flexneri* 4 (mannitol–, indole+).

Une seule souche de *Shigella* BLSE (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) a été isolée dans les DOM-TOM en 2017. Il s'agissait d'une souche de *S. flexneri* 4 (mannitol–, indole+) provenant de Mayotte.

Le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a été le gène de BLSE le plus fréquemment retrouvé chez *Shigella* entre 2005 et 2016, à l'exception de 2013 (épidémie à *S. sonnei* g contenant *bla*<sub>CTX-M-1</sub>). En 2017, c'est *bla*<sub>CTX-M-55</sub> qui est devenu le gène de BLSE prédominant.

Figure 18: Évolution des BLSE chez *Shigella* spp.



En 2017, le CNR-ESS a participé à l'investigation d'une épidémie scolaire à *S. sonnei* g multi-résistante aux antibiotiques (profil ACtxSGNaIcIpSuTmPteTgAzm), contenant le gène *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. La souche épidémique avait vraisemblablement une origine asiatique car le phénotype de résistance et le gène *bla*<sub>CTX-M-55</sub> y sont identifiés fréquemment. Parmi 55 souches de *Shigella* produisant une BLSE en 2017, 32 souches appartenaient à cette épidémie (Figure 18).

Chez les 23 souches BLSE restantes, 15 montraient un profil de multi-résistance ACtxSSuTmPte associé à des gènes de résistance différents (*bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>). Les souches appartenaient également à des sérotypes différents : *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a, *S. flexneri* 4 (mannitol-, indole+); *S. sonnei* g et *S. sonnei* g (ONPG-).

#### 2.3.3.2.c Résistance aux quinolones

Le taux de résistance à la ciprofloxacine parmi les souches de *Shigella* spp. reçues au CNR est supérieur à 10% depuis 2012. En 2017, 15,3% (n=131/855) des souches en provenance de France métropolitaine présentaient une résistance à la ciprofloxacine (CMI > 0,5 mg/L). Cette résistance n'a été observée à ce jour que sur des souches d'habitants de France métropolitaine. Le CNR-ESS n'a détecté aucune souche résistante à la ciprofloxacine chez un habitant des DOM-TOM.

#### 2.3.4 Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ESS accompagne chaque souche reçue. Dans cette fiche, il doit être indiqué : le nom et l'adresse du laboratoire expéditeur, la demande d'examen, les renseignements sur le patient, les symptômes cliniques, le prélèvement et des renseignements épidémiologiques permettant de mettre en évidence les épidémies potentielles et leurs origines. Ces fiches et les résultats obtenus permettent l'interface avec Santé publique France à différents niveaux. La surveillance se fait lors de la validation des résultats avec un signalement par téléphone ou courrier électronique de toute augmentation inhabituelle du nombre de souches de shigelles. De plus, dans le cadre d'une épidémie, la surveillance de l'antibiogramme est accrue de façon à signaler rapidement l'apparition d'une résistance. La surveillance des *Shigella* se fait aussi par la compilation des fiches de renseignements reçues pour *S. sonnei* et le signalement de la même façon des épidémies potentielles.

Collaboration avec le CCOMS des *Shigella* (Dr N. Strockbine, CDC, Atlanta, USA) et le Dr K. A. Talukder (ICDDR,B, Dhaka, Bangladesh) dans le cadre de l'étude et de la description de nouveaux sérotypes de *Shigella*.

#### 2.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Une étude est en cours en collaboration avec Santé publique France pour étudier la prévalence de *S. flexneri* 2a dans la communauté homosexuelle masculine.

*Escherichia coli*

### 3/ Escherichia coli

#### 3.1 Missions et organisation du CNR

Voir annexe 1

#### 3.2 Activités d'expertise

##### 3.2.1 Activité d'expertise en 2016

En 2017, un total de 1423 prélèvements, dont 985 prélèvements de selles, 304 souches de *E. coli*, 108 sérums ont été analysés au CNR-ESS et au LA-RD.

La répartition des différents types de prélèvements, leur origine et leur nombre sont résumés dans le **tableau 34**.

**Tableau 34: Répartition des différents types de prélèvements, origine et nombre reçus au CNR-ESS et au LA-RD pour *E. coli*, année 2017**

Activité	Type de prélèvement	CNR-ESS	LA-RD	Total	
<i>E. coli</i>	Selles ou écouvillonnage rectal	46	939	985	
	Sérums	108		108	
	Extrait d'ADN de selles	-	20	20	
	Biopsie digestive	-	5	5	
	Liquide péritonéal	-	1	1	
	<b>Souches humaines isolées de:</b>				
	Selles ou écouvillonnage rectal/anal	77	148	225	
	Biopsies	3	7	10	
	LCR	-	15	15	
	Sang	-	27	27	
	Urines	-	21	21	
	Placenta	-	2	2	
	Prélèvements pulmonaires	-	3	3	
	Prélèvements articulaires	-	1	1	
	<b>Sous-total souches humaines</b>		<b>80</b>	<b>224</b>	<b>304</b>
		<b>TOTAL</b>	<b>234</b>	<b>1189</b>	<b>1423</b>

##### 3.2.2 Inventaire des prélèvements reçus pour la recherche d'EHEC en 2017

Le CNR-ESS a reçu 1395 prélèvements dont 985 selles, 225 souches isolées de selles et 108 sérums. Le détail des différents types de prélèvements est répertorié dans le **tableau 35**.

**Tableau 35 : Les différents types de prélèvements**

Prélèvements	LA-RD	CNR-ESS	Total
Selles ou Ecouvillon rectal	939	46	985
Souche/selles	148	77	225
Sérums		108	108
Extrait d'ADN de selles	20		20
Souche/hemoculture	19		19
Souche/urine	18		18
Souche/biopsie colique	7	3	10
Biopsie colique	5		5
Liquide peritoneal	1		1
Souche /abcès sigmoïdien	1		1
Souche/LCR	1		1
Souche/ponction	1		1
Souche/liquide peritoneal	1		1
Total général	1161	234	1395

Ces prélèvements concernaient 1105 patients suivis par des services hospitaliers (n=678) ou des structures de biologie privées (n=427).

A noter qu'en 2017, le sérodiagnostic a été réalisé uniquement du 01/01/2017 au 31/03/2017.

### 3.2.3 Bilan des activités concernant les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC)

#### 3.2.3.1 Analyse de la répartition des symptômes donnant lieu à une analyse de selles, souches ou sérums

Les prélèvements de selles et/ou souches ont été reçus pour 1105 patients et les sérums pour 82 patients. Les symptômes ayant motivé une recherche de *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) ont été précisés pour 90.5% des patients en ce qui concerne les selles et/ou les souches et pour 59.7% des patients en ce qui concerne les sérums. Ils sont répertoriés dans le **tableau 36**.

**Tableau 36: Symptômes donnant lieu à une recherche de EHEC, souches, selles et sérums reçus au CNR-ESS et au LA-RD, année 2017**

Symptômes	Selles ou Souches		Sérum	
	N patients	% patients	N patients	% patients
Diarrhée Glairo-Sangante ou Sanglante	314	28,5	3	3,7
SHU ou suspicion de SHU *	237	21,3	40	48,8
Diarrhée simple	221	20,0	2	2,4
Inconnu	103	9,5	33	40,2
Microangiopathie thrombotique (MAT)	45	4,1		
Entourage de SHU	34	3,0		
TIAC	30	2,7		
Diarrhée de retour	28	2,5		
Asymptomatique	16	1,4	1	1,2
Douleurs abdominales ou Vomissements	10	0,9	1	1,2
Protocole transplantation fécale	10	0,9		
Contrôle post-azythromycine**	10	0,9		
Colite hémorragique	8	0,7		
Diarrhée chronique	8	0,7		
Choc septique	7	0,6	1	1,2
Insuffisance rénale	5	0,5	1	1,2
Pyélonéphrite avec insuffisance rénale isolée	5	0,5		
Insuffisance rénale et anémie	3	0,3		
Diarrhée fébrile	2	0,2		
Péritonite	2	0,2		
Anémie hémolytique	1	0,1		
Diarrhée post ATB	1	0,1		
Diarrhée chronique	1	0,1		
Médecine du travail	1	0,1		
Méningite - Insuffisance rénale- Sepsis sévère	1	0,1		
Mort subite du nourrisson	1	0,1		
Myocardite	1	0,1		
Total général	1105	100	82	100

\*SHU: syndrome hémolytique et urémique

\*\* Pratiqué chez des patients comptabilisés 1 fois en SHU

### 3.2.3.2 Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2017

Sur les 985 prélèvements de selles reçus, la **recherche directe** des gènes de Shiga-toxines par amplification génique *in vitro* (PCR) a été positive pour **334 patients, soit 33.9%** des patients pour lesquels des selles ont été reçues.

Les résultats de la PCR directe sur les selles ont été corrélés aux résultats obtenus après culture de celles-ci, à l'exception de 157 patients (16%) pour lesquels la recherche directe des gènes de Shiga-toxines sur les selles était positive sans qu'aucune souche EHEC n'ait pu être isolée.

### 3.2.3.3 Souches de *E. coli* d'origine humaine productrices de Shiga-toxines isolées au CNR-ESS et LA-RD en 2017

#### 3.2.3.3.1 Analyse sur des souches de *E. coli* d'origine humaine productrices de Shiga-toxines

La présence des gènes *stx1* et *stx2* codant respectivement les Shiga-toxines STX1 et STX2 a été recherchée dans tous les prélèvements et/ou souches reçus. Le gène *eae*, codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC, a également été recherché, ainsi que le gène *ehxA* codant l'enterohémolysine.

En 2017, le CNR-ESS a séquencé le génome entier des **250 souches de EHEC reçues et/ou isolées de selles** au cours du premier trimestre au CNR-ESS et au LA-RD, puis uniquement au LA-RD. Les analyses mises en place permettent d'extraire le sérotype, le MLST-7 gènes, un grand panel de gènes de virulence et les gènes de résistance à l'aide d'un site public du Center for Genomic Epidemiology-CGE. (<http://www.genomicepidemiology.org/>)

Ainsi, **250** sont présentées dans ce rapport au titre de l'exercice de l'année 2016. Ces souches ont été isolées chez 178 patients (co-infection pour un patient). Les données de sérogroupes (LA-RD) et de sérotype (CNR-ESS) sont agrégées et présentées ci-dessous.

**Toutes pathologies confondues, les sérogroupes majoritairement isolés en France en 2017 étaient**

- O157 : 55 souches isolées soit 22%
- O26 : 51 souches isolées soit 20,4%
- O80 : 43 souches isolées soit 17,2%

**Pour les SHU typiques, les sérogroupes majoritairement isolés en France en 2017 étaient :**

- O157 : 32 souches isolées soit 28,8%
- O80 : 28 souches isolées soit 25,2%
- O26 : 25 souches isolées soit 22,5%

La répartition des sérogroupes d'EHEC est représentée dans les suivantes figures:

- **figure 19** : toutes pathologies confondues
- **figure 20** : SHU

Figure 19 : Répartition des sérogroupes de EHEC isolés toutes pathologies confondues en 2017

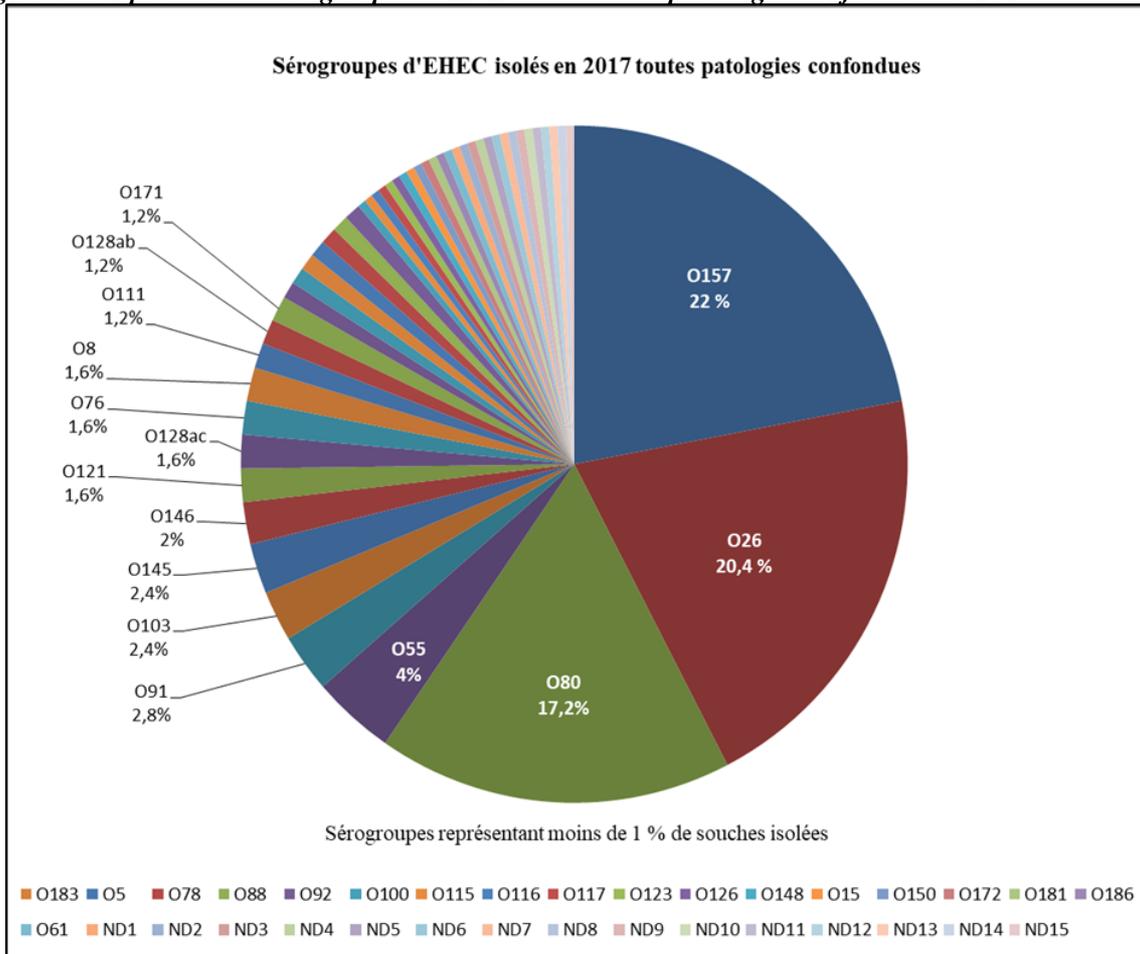
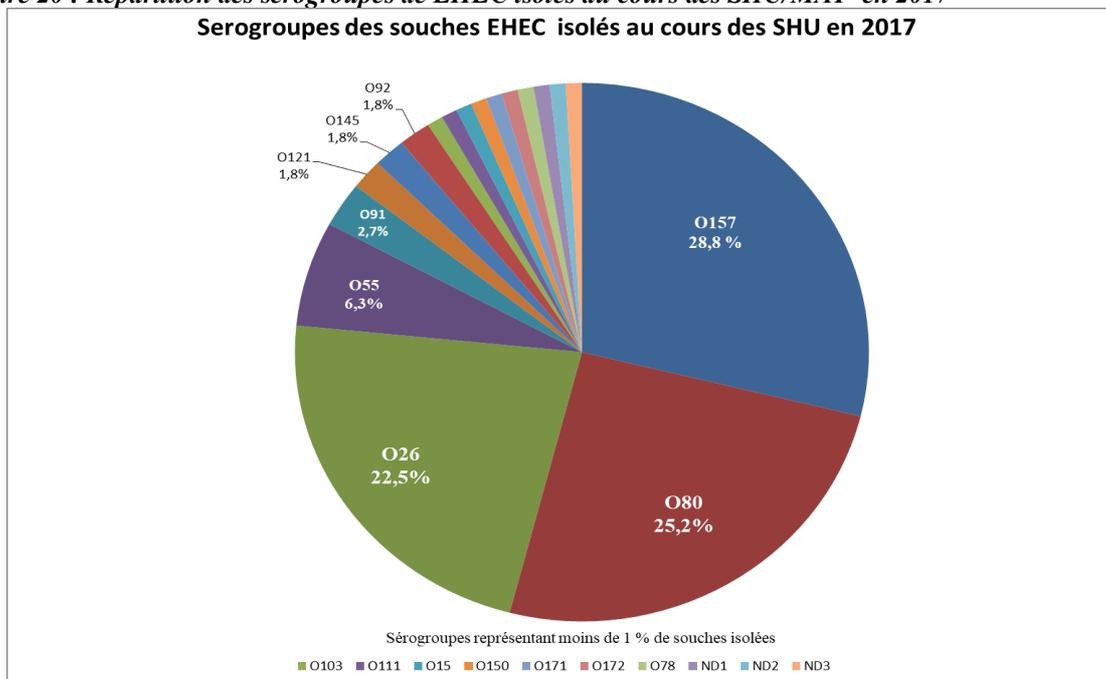


Figure 20 : Répartition des sérogroupes de EHEC isolés au cours des SHU/MAT en 2017

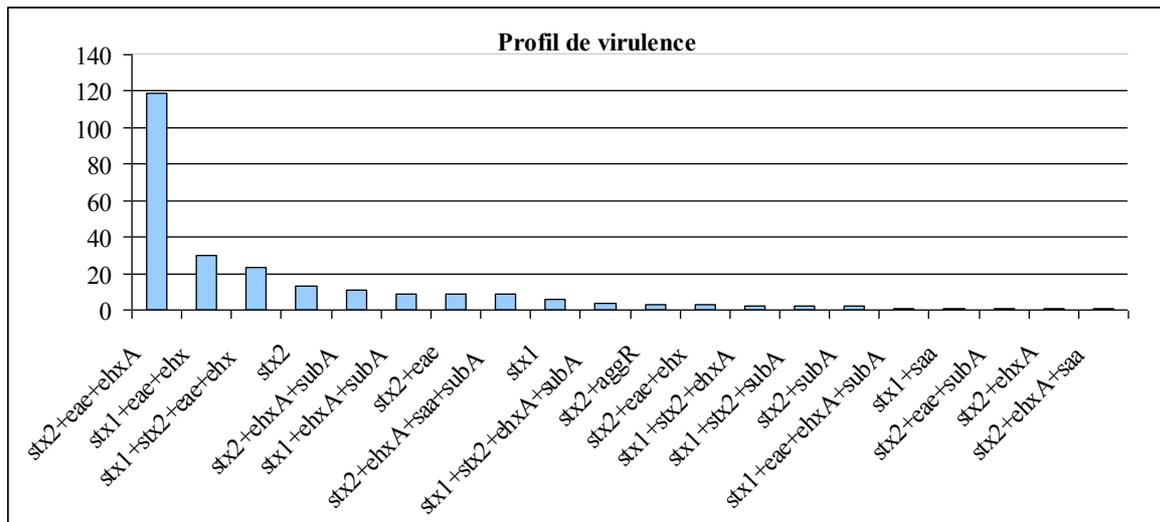


### 3.2.3.3.2 Analyse des profils de virulence

En 2017, l'analyse des profils de virulence montrent que le profil le plus souvent retrouvé est le **profil *stx2+eae+ehxA*** avec **47,5 %** des souches, tous sérotypes confondus.

La distribution des différents profils de virulence des souches de EHEC isolées en 2017 est indiquée dans la **figure 21**.

**Figure 21: Distribution des différents profils de virulence des souches de EHEC isolées en 2017**



La répartition des **profils de virulence des souches de EHEC** (n=250) en fonction du sérotype est représentée respectivement dans:

- le **tableau 37**: souches de EHEC appartenant aux sérotypes les plus fréquemment incriminés dans les infections à EHEC ( $\geq$  trois souches isolées en 2017) et regroupant un total de 208 souches.
- le **tableau 38**: souches de EHEC appartenant aux sérotypes les moins fréquemment rencontrés ( $<$  trois souches isolées en 2017) et regroupant un total de 30 souches.
- le **tableau 39**: souches de EHEC non sérotypables par méthode moléculaire WGS (12 souches).

Le profil *stx2+eae+ehxA* est retrouvé chez toutes les souches de sérotype O80. Il est majoritaire dans le sérotype O157 (65% des souches) et le sérotype O26 (40% des souches).

**Tableau 37: Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les plus fréquemment isolés au CNR- ESS et au LA-RD en 2017**

	O157	O26	O80	O55	O91	O128ab	O103	O145	O146	O121	O76	O8	O111	O171	Total
<i>stx2+eae+ehxA</i>	36	20	44	9			5	5							119
<i>stx1+eae+ehxA</i>	1	17						1		4			1		24
<i>stx1+stx2+eae+ehxA</i>	17	3					1						1		22
<i>stx2</i>					5				1			4			10
<i>stx2+ehxA+subA</i>					1	6			2						9
<i>stx2+eae</i>		5											1		6
<i>stx1+ehxA+subA</i>		1									4				5
<i>stx2+ehxA+saa+subA</i>									1					3	4
<i>stx1</i>	1	1		1											3
<i>stx1+stx2+ehxA</i>		2													2
<i>stx1+stx2+subA</i>		1			1										2
<i>stx2+ehxA</i>													1		1
<i>stx2+eae+subA</i>									1						1
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>50</b>	<b>44</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>208</b>

**Tableau 38: Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les moins fréquemment isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017**

Profil de virulence	N souches	Sérogroupes
<i>stx1+eae+ehx</i>	4	O5 (n=2), O182 (n=2)
<i>stx2+ehxA+saa+subA</i>	5	O183, O116
<i>stx1+ehxA+subA</i>	3	O78 (n=2), O12
<i>stx1+stx2+ehxA+subA</i>	2	O113
<i>stx2+aggR</i>	3	O126, O92 (n=2)
<i>stx2</i>	2	O148, O100
<i>stx2+eae+ehx</i>	2	O88, O172
<i>stx2+eae</i>	2	O15, O115,
<i>stx1</i>	3	O117, O61, O88
<i>stx1+eae+ehxA+subA</i>	1	O181
<i>stx2+ehxA+saa</i>	1	O183
<i>stx1+saa</i>	1	O186
<i>stx1+stx2+eae+ehx</i>	1	O150
<b>Total</b>	<b>30</b>	

**Tableau 39: Profil de virulence des EHEC non sérogroupables isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017**

Profil de virulence	N souches	Sérogroupes
<i>stx1+eae+ehx</i>	2	ND:H25, ND:H21
<i>stx1+stx2+ehxA+subA</i>	2	ND:H4
<i>stx2+subA</i>	2	ND:H28
<i>stx2+ehxA+subA</i>	2	ND:H28
<i>stx1+ehxA+subA</i>	1	ND:H4
<i>stx2</i>	1	ND:H12
<i>stx2+eae+ehx</i>	1	ND:H2
<i>stx2+eae</i>	1	ND:H25
<b>Total</b>	<b>12</b>	

Pour 157 patients, les **PCR directes sur les selles** ou à partir de cultures sur gélose d'isolement étaient **positives sans qu'aucune souche n'ait pu être isolée**. Pour 7 patients, la PCR temps réel avait n CT très tardif (> 35) et la PCR conventionnelle des gènes de virulence n'a pas été réalisée.

Parmi ces 157 patients, 58 présentaient un SHU.

Le profil de virulence de 150 de ces 157 cas figure dans le **tableau 40** ci-dessous.

**Tableau 40: Profil de virulence déterminé directement par PCR sur les selles sans isolement de souches. CNR-ESS et LA-RD 2017**

Profil de virulence	Nombre de patient	%
<i>stx2+eae+ehxA</i>	46	30,7
<i>stx2</i>	42	28,0
<i>stx1</i>	25	16,7
<i>stx1+stx2</i>	14	9,3
<i>stx1+stx2+eae+ehxA</i>	10	6,7
<i>stx1+stx2+eae</i>	5	3,3
<i>stx2+eae</i>	3	2,0
<i>stx1+stx2+ehxA</i>	2	1,3
<i>stx1+eae</i>	1	0,7
<i>stx1+eae+ehxA</i>	1	0,7
<i>stx1+ehxA</i>	1	0,7
<i>Total</i>	150	

Parmi les 150 patients, la PCR détectant les sérogroupes majeurs n'a été réalisée que sur les selles de 61 de ces 157 patients (uniquement ceux présentant soit un SHU, soit une diarrhée sanglante).

En effet, parmi les selles de ces 157 patients, 72 selles avec une PCR positive provenaient de LBM utilisant une PCR multiplex entérique automatisée (PCR BDMAX) systématiquement recontrôlée au LA-RD. Pour ces patients, la recherche de la souche et/ou la PCR sérogroupage directe n'était réalisée qu'en fonction de l'âge et en fonction des signes cliniques et uniquement si le CT de la PCR était inférieur à 25. Aucun cas de SHU ni de cas groupés symptomatiques d'infection à EHEC avérée n'a été associé à ces résultats de PCR multiplex enterique positive.

Les résultats de la PCR sérogroupage figurent dans le **tableau 41**.

**Tableau 41: Résultats du sérogroupage par PCR directe sur selles en 2017 (LA-RD)**

PCR Sérogroupage	Nombre de patients	%
O26	8	13,1
O145	6	9,8
O157	4	6,6
O80	3	4,9
O103	2	3,3
O55	2	3,3
O103 + O55	1	1,6
O103+O80	1	1,6
O121	1	1,6
O121+O91	1	1,6
O145+O104	1	1,6
O26 O55	1	1,6
O80 + O26	1	1,6
NST*	29	47,5
Total	61	

\* NST: serogroupes n'appartenant pas au panel O157, O26, O80, O121, O103, O111, O55, O145, O104

### 3.2.3.3.3 Analyse des variants des gènes *stx* (CNR-ESS et LA-RD)

La mise en évidence des **variants des gènes *stx*** a été réalisée sur les 250 souches isolées en 2017. La répartition globale des variants est représentée sur le **tableau 42**.

**Tableau 42 : répartition globale des variants *stx***

Variants <i>stx</i>	N	%
<i>stx2a</i>	65	26
<i>stx2d</i>	59	23,6
<i>stx1a</i>	37	14,8
<i>stx2c</i>	17	6,8
<i>stx2b</i>	15	6
<i>stx1a+stx2a</i>	15	6
<i>stx1c</i>	11	4,4
<i>stx1a+stx2c</i>	7	2,8
<i>stx1c+stx2b</i>	6	2,4
<i>stx2e</i>	5	2
<i>stx2a+stx2c</i>	5	2
<i>stx1d</i>	3	1,2
<i>stx1a+stx2b</i>	2	0,8
<i>stx2d+stx2f</i>	1	0,4
<i>stx2a+stx2d</i>	1	0,4
<i>stx1a+stx2d</i>	1	0,4
Total	250	

La répartition des profils des variants en tenant compte des sérogroupes les plus fréquents et les plus rares sont regroupés respectivement dans les **tableaux 43** et **44** ci-dessous.

Deux variants majoritaires sont retrouvés pour les sérogroupes :

O157 : stx2a (27,3%) et stx2c (25,5%)

O26 : stx2a (27,3%) et stx1a (25,5%)

Pour le séro groupe O80, le variant stx2d est retrouvé chez 93% des souches

**Tableau 43: Répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes de EHEC les plus fréquents des souches isolées au CNR-ESS et au LA-RD en 2017**

Variants stx	O157	O26	O80	ND	O55	O91	O103	O145	O146	O121	O128ac	O76	O8	O111	O128ab	O171	Total
stx2a	15	22	2	3	8			3		4						1	58
stx2d	2	3	40	2	1	5								1		2	56
stx1a	1	20		2	1		5	1						1			31
stx2c	14			1				1									16
stx2b				4		1			4		4				2		15
stx1a+stx2a	10	3					1										14
stx1c		2		1								4					7
stx1a+stx2c	7																7
stx1c+stx2b				2					1						1		4
stx2e													4				4
stx2a+stx2c	5																5
stx1d	1																1
stx1a+stx2b		1				1											2
stx2d+stx2f			1														1
stx2a+stx2d								1									1
stx1a+stx2d														1			1
Total	55	51	43	15	10	7	6	6	5	4	4	4	4	3	3	3	223

**Tableau 44: Répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes de EHEC les plus rares isolés au CNR-ESS et au LA-RD en 2017**

Variants stx	O113	O182	O183	O5	O78	O88	O92	O100	O115	O116	O117	O123	O126	O148	O15	O150	O172	O181	O186	O61	Total	
stx2a			1				2		1				1		1		1					7
stx2d			1							1				1								3
stx1a		2		2							1								1			6
stx2c						1																1
stx2b																						0
stx1a+stx2a															1							1
stx1c					2							1						1				4
stx1a+stx2c																						0
stx1c+stx2b	2																					2
stx2e								1														1
stx2a+stx2c																						0
stx1d					1															1		2
stx1a+stx2b																						0
stx2d+stx2f																						0
stx2a+stx2d																						0
stx1a+stx2d																						0
Total	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	27

### 3.2.3.3.4 Analyse des variants des gènes *eae* (CNR-ESS et LA-RD)

Parmi les 250 souches, 188 souches possédaient le gène *eae*. La répartition des variants en fonction du séro groupe est représentée dans le **tableau 45** suivant.

Les principaux variants sont :

- le variant *eae*  $\gamma$  : 35% des souches et majoritairement dans le séro groupe O157 (98%).
- le variant *eae*  $\xi$  : 29% des souches et dans 100 % des sérogroupes O80 et O55.
- le variant *eae*  $\beta$  : 25% des souches et majoritairement dans le séro groupe O26 (94%).

**Tableau 45: La répartition des variants en fonction du sérotype**

Sérotype	<i>eaeβ</i>	<i>eaeζ</i>	<i>eaeγ</i>	<i>eaeε</i>	<i>eaeζ</i>	<i>eaeθ2</i>	<i>eaeND</i>	Total
O157		1	<b>53</b>					54
O26	<b>45</b>	1	2					48
O80		<b>43</b>						43
O55		<b>9</b>						9
O103			1	5				6
O145			6					6
ND		1			2		1	4
O121				4				4
O111						3		3
O182					2			2
O5	2							2
O115						1		1
O146			1					1
O15	1							1
O150			1					1
O172				1				1
O181			1					1
O88			1					1
Total	48	55	66	10	4	4	1	188

### 3.2.3.3.5 Autres facteurs de virulence

Les gènes codant pour les facteurs de virulence des *E. coli* enteroaggrégants (*aggR*), celle du gène *saa* et du gène codant la subtilase ont été retrouvés chez 54 des 250 souches EHEC ;

Les **12 souches porteuses du gène *saa*** ne possédaient pas le gène *eae*. Une seule d'entre elles a été responsable d'un SHU chez un adulte.

Le gène ***aggR*** a été identifié chez **3 souches** : deux souches O92 *stx2a* isolées chez deux enfants ayant présenté un SHU et une souche de O126 responsable d'une diarrhée glairosanglante chez un enfant.

Le gène ***subA*** a été retrouvé chez **39 souches** responsables de 3 cas de SHU/MAT, 11 cas de DGS, 17 diarrhées simples, une diarrhée chronique, une diarrhée de retour. Deux souches ont été isolées chez des patients asymptomatiques et 4 chez des patients dont les symptômes étaient inconnus. Seules 2 souches possédaient le gène *eae* (variant  $\gamma$ ).

**Tableau46: Détails cliniques, sérotype et profil de virulence des souches porteuses du gène *saa*. CNR-ESS et LA-RD 2017**

Symptômes	WGS O	WGS H	MLST	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>	<i>aggR</i>	<i>subA</i>
Asymptomatique	ND	H16	ST295	-	stx2a	-	+	+	-	+
DGS	ND	H25	ST297	-	stx2a	-	+	+	-	+
DGS	ND	H2	ST847	-	stx2a	-	+	+	-	+
Inconnu	O116	H21	ST58	-	stx2d	-	+	+	-	+
Diarrhée	O128ac	H2	SLV_ST25	-	stx2b	-	+	+	-	+
Diarrhée	O146	H21	ST442	-	stx2b	-	+	+	-	+
Diarrhée	O171	H25	ST297	-	stx2a	-	+	+	-	+
DGS	O171	H25	ST297	-	stx2d	-	+	+	-	+
SHU	O171	H25	ST297	-	stx2d	-	+	+	-	+
Inconnu	O183	H18	ST657	-	stx2d	-	+	+	-	-
Diarrhée	O183	H18	ST657	-	stx2a	-	+	+	-	+
DGS	O186	H16	ST10	stx1a	-	-	-	+	-	-

**Tableau 47: Détails cliniques, sérotype et profil de virulence des souches porteuses du gène *subA*. CNR-ESS et LA-RD 2017**

Age	Code âge J,M,A	Sexe	Symptômes	WGS O	WGS H	MLST	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>	<i>aggR</i>	<i>subA</i>
71	A	F	Asymptomatique	ND	H16	ST295	-	stx2a	-	ehxA	+	-	subA
3	A	M	Diarrhée	ND	H21	ST442	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
75	A	F	DGS	ND	H25	ST297	-	stx2a	-	ehxA	saa	-	subA
55	A	F	diarrhée sanglante	ND	H2	ST847	-	stx2a	-	ehxA	+	-	subA
46	A	F	Diarrhée	ND	H4	ST3101	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
26	A	F	Diarrhée	ND	H28	ST738	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
69	A	M	Diarrhée	ND	H28	ST738	-	stx2b	-	-	-	-	subA
36	A	M	DGS	ND	H21	ST442	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
32	A	M	Inconnus	ND	H28	ST1819	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
58	A	M	Diarrhée	ND	H28	ST738	-	stx2b	-	-	-	-	subA
2	A	F	Inconnus	O116	H21	ST58	-	stx2d	-	ehxA	+	-	subA
75	A	M	diarrhée sanglante	O146	H28	ST738	-	stx2b	-	-	-	-	subA
38	A	M	DGS	O171	H25	ST297	-	stx2d	-	ehxA	+	-	subA
27	A	M	Diarrhée retour	O113	H4	ST10	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
3	A	F	Diarrhée	O113	H4	ST10	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
34	A	F	DGS	O123	H10	ST3695	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
59	A	F	Diarrhée	O128ab	H2	ST25	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
34	A	F	Diarrhée	O128ab	H2	ST25	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
21	A	M	Asymptomatique	O128ab	H2	STNEW25	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
12	A	M	Inconnus	O128ac	H2	ST25	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
1	M	F	DGS	O128ac	H2	ST25	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
3	A	M	Diarrhée	O128ac	H2	ST25	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
9	A	M	Diarrhée	O128ac	H2	SLV ST25	-	stx2b	-	ehxA	saa	-	subA
2	M	M	Diarrhée	O146	H28	ST738	-	stx2b	eae $\gamma$	-	-	-	subA
8	M	M	Diarrhée	O146	H21	ST442	-	stx2b	-	ehxA	saa	-	subA
20	J	M	DGS	O146	H28	ST738	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
6	A	F	Diarrhée	O146	H21	ST442	stx1c	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
60	A	F	SHU	O171	H25	ST297	-	stx2d	-	ehxA	saa	-	subA
31	A	F	Diarrhée	O171	H25	ST297	-	stx2a	-	ehxA	saa	-	subA
29	A	F	Diarrhée	O181	H16	ST6274	stx1c	-	eae $\gamma$	ehxA	-	-	subA
48	A	M	Diarrhée	O183	H18	ST657	-	stx2a	-	ehxA	saa	-	subA
49	A	F	Diarrhée chronique	O26	H14	ST33	stx1a	stx2b	-	-	-	-	subA
77	A	F	DGS	O76	H19	ST675	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
36	A	M	DGS	O76	H19	ST675	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
8	M	F	Diarrhée	O76	H19	ST675	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
42	A		Inconnus	O78	H4	ST1301	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
42	A	F	MAT	O78	H4	ST3101	stx1c	-	-	ehxA	-	-	subA
6	M	M	SHU	O91	H14	ST33	-	stx2b	-	ehxA	-	-	subA
29	A	F	DGS	O91	H14	ST33	stx1a	stx2b	-	-	-	-	subA

### 3.2.3.3.6 Analyse des MLST

L'analyse MLST des 250 souches a permis de mettre en évidence **47 ST** dont 3 représentent 58,4% des souches et sont représentés dans le **tableau 48** ci-dessous.

**Tableau 48 : La répartition des ST en fonction du sérotype**

MLST	Sérogroupe						Nombre	%
	O157	O26	O80	O55	O88	ND		
ST11	53				1		54	22
ST301	1		42	9		1	53	21
ST21		39					39	16

### 3.2.3.4 Analyse des prélèvements (selles et/ou souches) dans l'entourage de patients présentant un SHU (LA-RD)

La mise en évidence des EHEC a été réalisée dans l'entourage de 10 cas de SHU, soit 34 personnes prélevées dans l'entourage familial. Parmi elles, 8 étaient positives (5 souches isolées et 3 PCR positives dans les selles. Les souches isolées présentaient le même profil que celle du cas index de SHU.L 'un des contacts a également développé un SHU.

Pour les patients atteints de SHU typique à EHEC et pour leurs contacts positifs, 10 ont été de façon certaine traités par azithromycine et ont eu un contrôle des selles 48 heures après l'arrêt du traitement. Ce contrôle des selles était négatif pour les 10 cas.

### 3.2.3.6 Sérodiagnostic des syndromes hémolytiques et urémiques (CNR-ESS)

En 2017, le serodiagnostic a été réalisé uniquement du 01/01/2017 au 31/03/2017.

Un total de **108 sérums** de **82 patients**, reçus de différents services hospitaliers et de LBM ont été analysés au CNR-ESS. Tous provenaient de France métropolitaine.

Les anticorps anti-LPS appartenant aux deux classes d'immunoglobulines IgA et IgM dirigés contre les huit sérogroupes de *E. coli* les plus fréquemment responsables de SHU (O157, O26, O55, O91, O103, O111, O128 et O145) ont été recherchés. Cette recherche a été complétée depuis 2011 par le séro groupe O104. Cependant, la recherche des anticorps dirigés contre le séro groupe O80 n'est pas réalisée.

Le CNR-ESS recommande deux prélèvements à 15 jours d'intervalle (J0 étant le jour du diagnostic du SHU). Parmi les 82 patients, 59 ont eu un seul sérum analysé, 20 ont eu deux sérums, et 3 ont eu 3 sérums.

En ne considérant qu'un sérum par patient (le positif en cas de discordance), le bilan des résultats obtenus est indiqué dans le **tableau 49**.

**Tableau 49: Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS positive**

Immunoglobuline (Ig)	0 - 5 ans		6-15 ans		16-64 ans		> 65 ans		Total
	F	M	F	M	F	M	F	M	
IgA/M O157	3	2	1	0	3	5	1		15
IgA/M O145									
IgA /M O91						1			1
IgA/M O157+ IgA /M O91					1				1
IgA/M O157+ IgA/M O145							1		1
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>18</b>

Sur les **82 patients** ayant bénéficié d'une sérologie, **18** ont eu une sérologie positive (**21,9%**). Les données cliniques étaient disponibles pour 10 d'entre eux : 8 cas de SHU, deux cas de diarrhée.

La présence d'anticorps anti-LPS O157 était positive pour 17 des 18 patients ayant une sérologie positive dont deux avaient une sérologie « mixte », l'un O157/O91 et l'autre O157/O145. Parmi eux, 9 cas avaient un SHU, 2 cas une diarrhée et pour 6 cas les symptômes n'étaient pas renseignés. La sérologie positive O91 a été retrouvée chez un patient de 57 ans sans étiologie connue.

52 patients ont eu une **sérologie anti-LPS sans recherche de EHEC dans les selles**. Parmi eux, **11 ont eu une sérologie positive** avec des anticorps dirigés contre les sérogroupes suivants: O157 (8 cas), O91 (1 cas), O157 et O145 (1 cas), O157 et O91 (1 cas). Les données cliniques étaient précisées pour 4 patients: 2 SHU, 1 diarrhée simple, 1 avec troubles digestifs et douleurs abdominales.

**Seuls 30 patients** ont bénéficié à la fois d'une recherche de EHEC dans les selles et une **sérologie anti-LPS**.

La **sérologie était positive alors que la recherche des EHEC dans les selles était négative pour 2 patients**, cette discordance peut s'expliquer d'une part par un prélèvement tardif des selles par rapport à la diarrhée prodromique et d'autre part par l'administration d'un traitement antibiotique stérilisant les selles.

La **sérologie était négative pour 23 patients**. Elle était négative avec une recherche de **EHEC positive pour 11 patients**:

- chez 5 patients, une souche avait été isolée: O80 (1 cas), O103 (1 cas), O78 (1 cas) et un cas O145.

- chez 6 patients, la PCR à partir des selles était positive mais aucune souche d'EHEC n'a été isolée.

### **3.2.4 Bilan des activités 2016 concernant les souches de *E. coli* extra intestinales (ExpEC) (LA-RD)**

#### **3.2.4.1 Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de méningites**

Le LA-RD a reçu **15** souches de *E. coli* isolées isolées du LCR de 11 enfants et 4 adultes. Parmi les 11 enfants, 7 étaient des nouveau-nés âgés de 12 jours à 27 jours, trois étaient des nourrissons âgés de un à 3 mois, et un était âgé de 7 mois. Un nouveau-né est décédé. Trois des quatre adultes avaient plus de 65 ans. Le quatrième âgé de 91 ans est décédé.

Les résultats de l'étude des facteurs de virulence sont présentés dans le **tableau 50** et permettent d'incrémenter la base de données française des méningites à *E. coli*.

**Tableau 50: Facteurs de virulence des *E. coli* responsables de méningites en 2016 (LA-RD)**

N° Souche	sexe	age /PL	Groupe phylogénétique	PCR nonaplex wzy	PCR K1	ChuA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iroN
431	M	7 mois	A	neg	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
432	F	10 jours	B21	O45	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
433	F	91 ans	B21	O18	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
434	F	62 ans	D	neg	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
438	F	10 jours	B21	O18	+													
439	F	60 ans	B21	O1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
440	M	28 jours	D	neg	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
442	M	27 jours	D	O2	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	II	-	-	-
443	M	3 mois	D	neg	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
444	M	1 mois	B2	O2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
445	M	53 ans	B21	O1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
446	M	1 jour	D	neg	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
448	M	1 mois	B21	O18	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
449	M	14 jours	B2	O83	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	III	+	+	+
451	M	12 jours	B2	O6	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	III	-	-	-

### 3.2.4.2 Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* extra-intestinales responsables de pathologies autres que les méningites

Le LA-RD a reçu 44 souches d'EXPEC hors méningites isolées des prélèvements suivants:

- hémocultures (n=27)
- urines (n= 10)
- placenta (n=2)
- liquide articulaire (n=1)
- prélèvement pulmonaire (n=3)
- selles (n=1)

Ces souches ont été isolées chez 43 patients présentant:

- un sepsis sévère (n=20) dont 2 décès et 6 MAT (sans EHEC)
- un urosepsis (n=5)
- une dermohypodermite (n=1)
- une prostatite (n=1)
- une endocardite (n=1)
- un purpura fulminans (n=1)
- une infection maternofoetale (n=8) dont 3 décès
- une arthrite (n=1)
- un receveur de greffe hépatique décédé
- un SHU à EHEC à point de départ urinaire et abcès rénal (n=1)
- un SHU à EHEC O80 chez un patient transplanté rénal décédé (n=1)
- une infection pulmonaire (n=2) dont un décès

Les caractéristiques de ces souches sont indiquées dans le **tableau 51**.

**Tableau 51: Caractéristiques des souches de ExpEC hors méningites en 2017 LA-RD**

n° RDB	Sexe	age	origine du prélevement	gr quadruplex	pcr K1	ChuA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iroN
RDEx491	F	88 ans	expectoration	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx492	F	88 ans	ecbu	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx493	F	37 ans	hémoculture	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx495	M	51 ans	hémoculture	F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx496	M	51 ans	ponction abcès jambe dro	F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx497	M	37 ans	ecbu	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx498	F	31 ans	hémoculture	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx501	M	68 ans	hémoculture	B2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
RDEx502	F	67 ans	ecbu	B21	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
RDEx503	F	2 ans	ecbu	B1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx504	F	87 ans	hémoculture	B2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
RDEx506	M	71 ans	hémoculture	B2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx507	F	50 ans	hémoculture	C	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
RDEx508	M	12 jours	ecbu	B21	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
RDEx510	M	71 ans	hémoculture	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx511	M	63 ans	hémoculture	D	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
RDEx512	M	50 ans	coproculture	A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx513	M	27 jours	ecbu	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx514	M	1 jour	hémoculture	F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
RDEx515	F	44 ans	hémoculture	D	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx516	F	51 ans	hemoculture	B1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx517	F	51 ans	ECBU	B1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx518	M	47 ans	liquide de loge pulmonai	B2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
RDEx519	M	1 jour	hémoculture	B21	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	II	-	-	+
RDEx520	M	13 jours	ecbu	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx521	F	73 ans	hémoculture	B21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
RDEx522	F	61 ans	hémoculture	B2	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx523	F	2 mois	ecbu	B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III	+	-	+
RDEx524	F	83 ans	hémoculture	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx526	F	66 ans	ecbu	D	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RDEx527	F	66 ans	hémoculture	D	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RDEx528	M	63 ans	hémoculture	A	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx529	M	68 ans	hémoculture	B1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx530	M	76 ans	hémoculture	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx531	F	42 ans	poumon	B2	d	+	+	+	-	+	+	+	+	-	III	+	-	+
RDEx532	F	38 ans	placenta	B2	*	+	+	+	-	+	+	+	+	+	III	+	-	+
RDEx533	M	8 jours	hémoculture	*	auto	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
APIMF35	M	1 jour	hémoculture	B2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II	+	-	+
APIMF36	F	1 jour	hémoculture	B21	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
APIMF37	M	1 jour	hémoculture	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
APIMF38	M	1 jour	hémoculture	B2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
APIMF39	M	1 jour	hémoculture	A	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
APIMF40	M	1 jour	hémoculture	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
APIMF43	F	30 ans	placenta	A	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

### 3.3 Activités de surveillance des Escherichia coli

#### 3.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à EHEC

##### 3.3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ESS et le LA-RD collaborent afin d'échanger leurs données et/ou les souches permettant la validation des résultats des analyses faites pour un même patient (exemple: sérologie et typage de souche). Mais avant tout, le CNR-ESS et le LA-RD collaborent avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

##### 3.3.1.2 Analyse des caractéristiques épidémiologiques des EHEC

En 2017, **407 patients** (250 patients pour 150 souches isolées et 157 patients n'ayant qu'une PCR positive sur les selles) ont eu une **recherche de EHEC positive** (isolement de souche ou PCR positive sur les selles). Nous observons une augmentation par rapport à 2015 ET 2016 (respectivement 246 et 304 patients positifs) liée à l'augmentation du nombre de demandes engendrées par les contrôles systématiques des PCR multiplex entériques réalisées par de nombreux LBM en 2017.

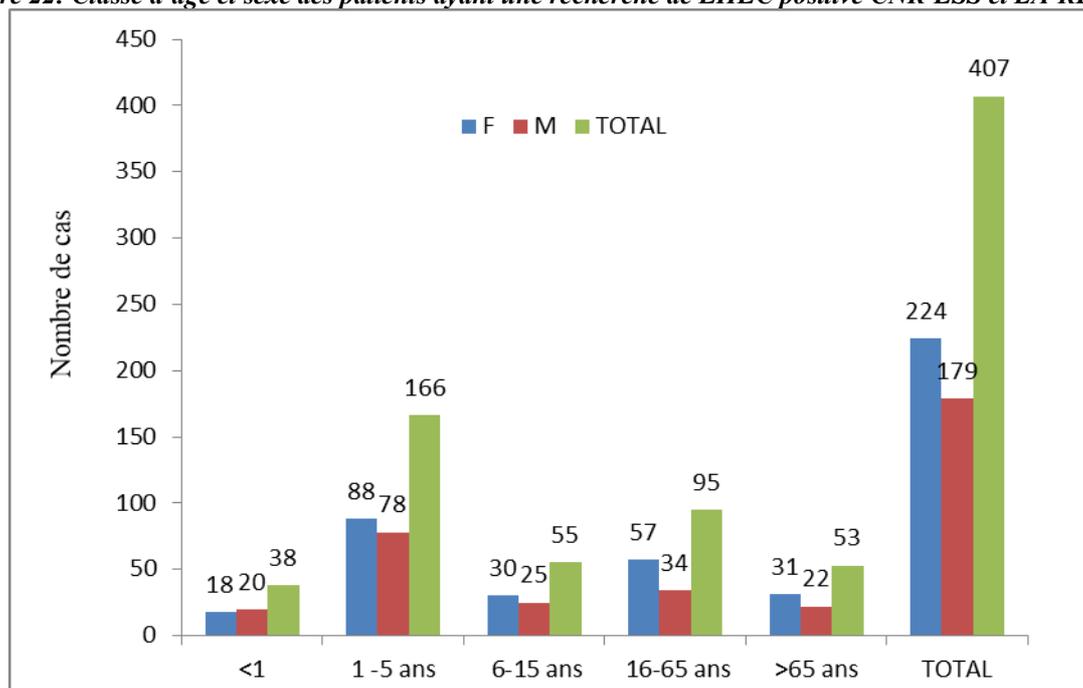
**Tableau 52: Principal symptôme observé chez les patients ayant une recherche de EHEC positive (isolement d'une souche ou PCR positive). CNR ESS-LA 2017**

Symptômes	Nombre	%
SHU/MAT	169	41,5
Diarrhée simple	95	23,3
DGS	80	19,7
Inconnus	19	4,7
TIAC	11	2,7
Diarrhée de retour	10	2,5
Contact SHU	8	2,0
Diarrhée chronique	5	1,2
Asymptomatique	5	1,2
Diarrhée, anémie hémolytique	2	0,5
Douleurs abdominales	2	0,5
Diarrhée et vomissements	1	0,2
Total général	407	

On observe une proportion importante de demande (41,5% vs 34% en 2016) concernant les SHU ou les MAT. Ceci vient du fait que depuis 2011, les services hospitaliers d'adultes recherchent les EHEC dans les cas de MAT.

La prévalence la plus importante est retrouvée chez les enfants de moins de 15 ans (259 cas soit 63%) et principalement dans la tranche d'âge de 1 à 5 ans (166 cas, soit 40,7%) avec un sex-ratio (H/F) de 0,80 (**figure 22**). En 2017, un SHU lié à un EHEC O91 a été observé chez un enfant âgé de 14 jours.

Figure 22: Classe d'âge et sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive CNR-ESS et LA-RD 2017



Concernant les souches, dans la tranche d'âge la plus atteinte (1-5 ans avec 117 souches isolées), les souches de EHEC retrouvées appartenait majoritairement aux sérogroupes O26 (39 cas, soit 33,3%), O80 (27 cas, soit 23%), O157 (23 cas, soit 19,6%) (Tableau 53).

Tableau 53: Répartition des différents sérogroupes de EHEC (souches isolées) par classe d'âge et par sexe des patients. CNR-ESS et LA-RD 2017

Age	<1 an		1-5 ans			6-15 ans			16-65 ans			> 65 ans			Total	
		F	M		F	M		F	M		F	M		F		M
Serogroupe	Total			Total			Total			Total			Total			
O157				23	15	8	23	18	5	8	6	2	1	0	1	55
O26	5	1	4	39	18	21	2	1	1	3	3	0	1	1	1	51
O80	6	3	3	27	15	12	0	0	0	6	2	4	4	3	1	43
ND	1	1		1	0	1	2	0	2	7	3	3	4	3	1	15
O55				9	3	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	10
O91	2	1	1	1	1	0	0	0	0	3	2	1	1	1	0	7
O103				2	1	1	1	0	1	3	2	1	0	0	0	6
O145	1		1	2	2	0	1	1	0	2	1	1	0	0	0	6
O146	3		3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	5
O121				2	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	4
O128ac	1	1		1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	4
O76	1	1		0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	4
O8				0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	1	0	4
O111				3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
O128ab				0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3
O171				0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	3
O113				1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2

(cont.)

Age	<1 an			1-5 ans			6-15 ans			16-65 ans			> 65 ans			Total
Sexe		F	M		F	M		F	M		F	M		F	M	
Serogroupe	Total			Total			Total			Total			Total			
O182				1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
O183				0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	2
O5				0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	2
O78				0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	2
O88				0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2
O92				0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	2
O100				1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O115				0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
O116				1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O117				0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
O123				0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
O126				0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
O148				0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
O15				1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O150				1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O172				1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
O181				0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
O186				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
O61				0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Total	<b>20</b>	8	12	<b>117</b>	62	55	<b>38</b>	24	14	<b>55</b>	32	19	<b>17</b>	13	7	250

La répartition géographique des souches isolées en 2017 est indiquée sur la **figure 23** ci-dessous. La répartition géographique des principaux sérogroupes confirme que contrairement aux années antérieures à 2016, le sérotype O80 tend à se modifier et à s'étendre à d'autres départements. En effet, jusqu'en 2015 il était essentiellement isolé dans les départements de l'Est de la France et plus particulièrement ceux de la région Rhône-Alpes (**figure 24**).

Figure 23: Répartition départementale des souche de EHEC isolées en 2017 (n=250) sur le territoire

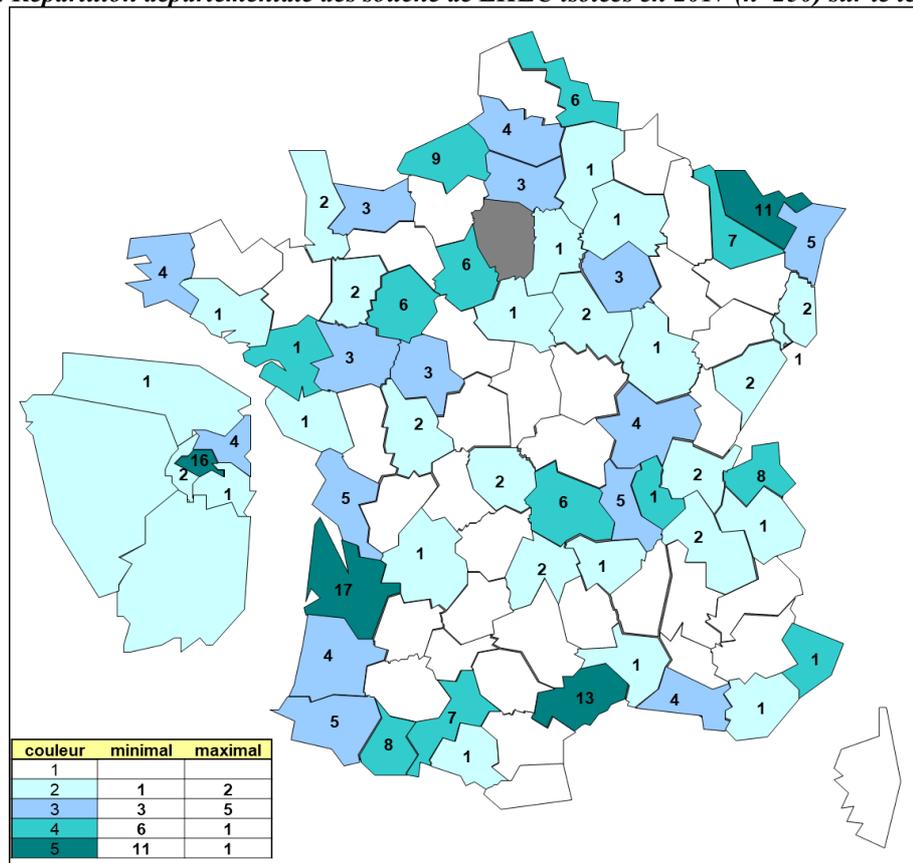
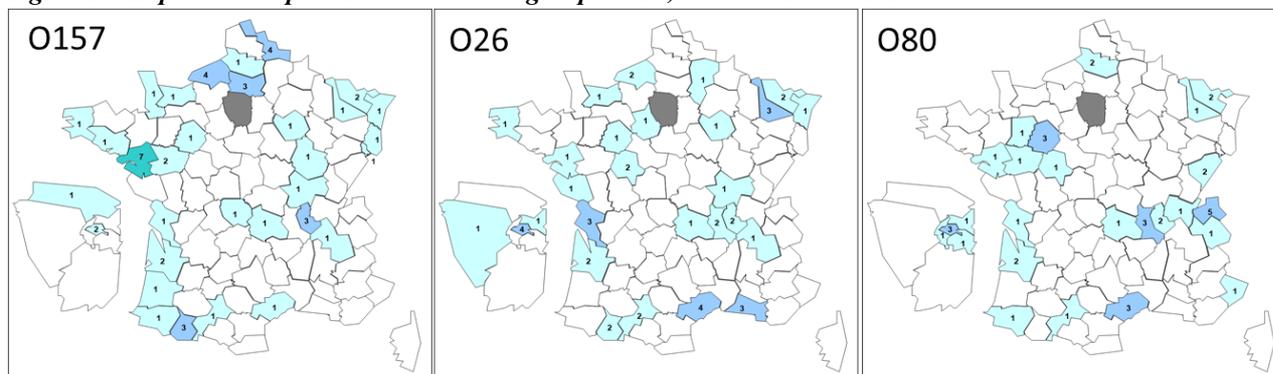


Figure 24: Répartition départementale des sérogroupes O26, O80 et O157 en 2017



### 3.3.1.3 Résultats microbiologiques 2017 pour les cas de SHU pédiatriques

Parmi les **128 cas de SHU chez des patients de moins de 15 ans en 2017** l'étude microbiologique a donné les résultats suivants :

- Pour **98 enfants** de moins de 15 ans, **une souche de EHEC a été isolée** appartenant principalement aux sérogroupes suivants : O26 (n=24), O157 (n=30), O80 (n=18). Pour neuf des patients, la PCR sérogroupage dans les selles était positive pour un second séro groupe dans huit cas et pour un troisième séro groupe dans un cas.

- Pour **30 patients**, la **PCR était positive dans les selles sans isolement de souches** avec une PCR sérogroupage positive dans les selles permettant d'incriminer les sérogroupes suivants: EHEC O80 (n=4), EHEC O26(n=6), EHEC O157 (n=4), EHEC O55 (n=2), EHEC O145 (n=3), O121 (=1) et une PCR positive pour un second séro groupe dans 6cas

### 3.3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux 2017

#### 3.3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches EHEC (LA-RD)

Bien que l'utilisation des antibiotiques soit controversée dans les infections à EHEC, l'étude de la sensibilité des souches présente un intérêt épidémiologique.

Le LA-RD a étudié la sensibilité des 116 souches de EHEC isolées en 2016, en particulier vis-à-vis des antibiotiques suivants:

- Bêta-lactamines : amoxicilline (AMX) et ceftriaxone (CRO)
- Aminosides (kanamycine, tobramycine, et gentamicine)
- Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT)
- Quinolones et fluoroquinolones : acide nalidixique (NAL) et ciprofloxacine (CIP)

Comme les années précédentes, les souches de EHEC appartenant au séro groupe O157 sont plus sensibles aux antibiotiques que les souches d'EHEC non O157.

Une seule souche productrice de BLSE a été isolée en 2017 au LA-RD ; elle appartenait au séro groupe O80 et a été isolée chez un adulte présentant un SHU.

La prévalence de la résistance exprimée en pourcentage est indiquée dans le **tableau 54**.

**Tableau 54: Prévalence de la résistance (%) aux antibiotiques des souches EHEC en 2017 (LA-RD)**

% de Résistance	AMX	CRO	Aminosides	SXT	NAL	CIP
O157 (n=55)	1,8%	0	0	1,8%	0	0
Non O157 (n=195)	35,9%	1,1%	6,6%	28,7%	25,6%	2,1%

Parmi les souches non O157 résistantes à l'AMX (n=71), 43 appartenait au séro groupe O80 et huit au séro groupe O26. Une résistance associée aux aminosides, à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole était retrouvée chez 40 souches dont 30 souches appartenant au séro groupe O80, HUIT au séro groupe O55, une au séro groupe O111 et une au séro groupe O128ac.

En raison des fortes concentrations intraluminales de l'azithromycine (AZM), les CMI AZM ont été déterminées vis-à-vis des souches isolées en 2017 par la méthode de l'Etest et figurent dans le **tableau 55** ci-dessous. Aucune souche résistante à l'azithromycine n'a été détectée.

**Tableau 55: CMI à l'azithromycine des souches EHEC isolées en 2017 au LA-RD**

	CMI 50 (mg/L)	CMI 90 (mg/L)	Intervalle (mg/L)
O157 (n=55)	4	4	3 - 4
Non O157 (n=195)	4	6	2 - 8

### 3.3.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches de *E. coli* responsables de pathologies extra intestinales (LA-RD)

La sensibilité des souches aux principales familles d'antibiotiques en particulier AMX, CFM, cefotaxime (CTX), gentamicine (GEN), NAL et CIP a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM (**tableau 56**).

**Tableau 56: Prévalence de la résistance (%) aux antibiotiques des souches EXPEC (2017, LA-RD)**

	AMX	CTX	SXT	NAL	CIP	GEN
ExpEC méningites (n=15)	33,3	0	6,6	6,6	0	0
ExpEC hors méningites (n=44)	47,7	4,5	31,8	13,6	4,5	6,8

En 2017, deux souches productrices de BLSE ont été isolées dans les pathologies hors méningite avec une résistance associée pour une des souches une résistance aux quinolones, au cotrimoxazole, et à la gentamicine.

Aucune souche productrice de BLSE n'a été isolée de méningite.

### 3.3.3 Participation aux réseaux de surveillance

#### 3.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ESS et au LA-RD accompagne chaque souche ou prélèvement reçus au CNR. Dans cette fiche, il doit être renseigné : le nom et l'adresse du laboratoire expéditeur, la demande d'examen, les renseignements sur le patient, les symptômes cliniques, le prélèvement et des renseignements épidémiologiques permettant de mettre en évidence les épidémies potentielles et leurs origines. Ces fiches et les résultats obtenus permettent l'interface avec Santé publique France à différents niveaux :

- Signalement systématique de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à Santé publique France/Santé publique France.
- Dans le cadre de la surveillance des EHEC, toute souche ou selle porteuse de gènes *stx* est immédiatement signalée à Santé publique France/Santé publique France par téléphone et/ou messagerie électronique et envoi d'une copie du résultat par fax.
- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à Santé publique France dès leur édition.

### 3.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

Participation au réseau ECDC-FWD pour la surveillance européenne des infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines et des *Shigella*.

### 3.3.3.3 Collaboration avec des partenaires nationaux exerçant dans le domaine animal, alimentaire ou dans l'environnement

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Laboratoire National de Référence *E. coli*), et avec l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

## 3.3.4 Détection et investigation des cas

### 3.3.4.1 Toxi-infection alimentaire collective

En Octobre 2017, une toxi-infection alimentaire collective est survenue dans le Jura Elle a impliqué 44 cas parmi 150 participants à une même fête. Tous les cas ont présenté une diarrhée sanglante. Aucun cas de SHU n'a été signalé.

Deux bactéries entéropathogènes ont été mis en évidence chez les cas une salmonelle 4,5,12 :i :- (monophasique)et un STEC appartenant au serotype rare O8 : 19 possédant le gène stx2 variant stx2e rarement isolé chez l'homme. Ce serotype appartient au ST23.

L'aliment en cause identifié par l'investigation menée par Santé Publique France était un dessert à base de gelée préparé sur place.

### 3.3.4.2 Détection des cas par analyse WGS

L'analyse WGS a permis de mettre en évidence plusieurs clusters de EHEC O157 :

- 9 souches appartenant au même cluster O157\_201763\_C4 isolées dans 5 cas de SHU pédiatriques et 4 cas de diarrhée sanglante, de juin à décembre 2017 dans les départements suivants : 44 (4 cas), 29,21, 56, 63, 67
- 2 souches appartenant au même cluster O157\_2017\_C5 isolées dans un cas de SHU adulte et un cas de diarrhée glairosanglante, en septembre 2017 et dans deux départements différents (59 et 90)
- 5 souches appartenant au même cluster O157\_2017\_C6 isolées dans 3 cas de SHU pédiatrique et un cas de diarrhée glairosanglante, de septembre 2017 à fin octobre 2017 et dans trois départements différents : 60 (3 cas) , 76 ( 2 cas), 80 ( 1 cas)
- 2 souches appartenant au même cluster O157\_2017\_C7 isolées dans un cas de SHU pédiatrique dans le département 31 et un cas de diarrhée glairosanglante chez un adulte dans le département 40, en novembre 2017.

## 4/ Alerte

### 4.1 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux à *Salmonella* en 2017

En 2017, le CNR-ESS a participé aux investigations des cas groupés à *Salmonella* suivantes :

- à la détection et au suivi microbiologique de l'épidémie de salmonelloses à *Salmonella* sous-espèce *diarizonae* de formule antigénique 61:i:z53 présentant un nouveau MLST type, ST4303. De juin à septembre 2017, sur les 44 cas cliniques ayant ce profil, 25 ont pu être interrogés par Santé publique France. Les analyses des consommations alimentaires à partir des questionnaires exploratoires et des cartes de fidélité n'ont pas permis d'identifier ou de suspecter une source d'exposition alimentaire commune. Cependant, suite aux résultats du WGS, et au vu des différents éléments épidémiologiques et vétérinaires rassemblés, la source de contamination la plus probable à l'origine de l'épidémie, ayant duré au moins 7 semaines, aurait été la consommation de fromage (St Nectaire) en provenance d'un affineur auvergnat. Les mesures de contrôle mises en place dès le début de l'investigation (retrait rappel le 8 septembre 2017) ont probablement contribué à l'arrêt de l'épidémie.
- à la détection et au suivi microbiologique de l'épidémie de salmonelloses à *Salmonella* de sérotype Kottbus dans le département de la Haute-Savoie (74) fin août 2017. L'investigation épidémiologique menée par Santé publique France a permis de suspecter une consommation de reblochon comme source de contamination. Aucune souche alimentaire n'a pu être isolée. L'investigation microbiologique par WGS a permis de confirmer le cluster épidémique et d'écarter un lien avec une épidémie en Allemagne (liée à de la consommation de charcuterie).
- à la détection et au suivi microbiologique de l'épidémie de salmonelloses à *Salmonella* de sérotype Eastbourne. L'investigation épidémiologique menée par Santé publique France avait identifié une origine alimentaire commune (camembert au lait cru). L'investigation microbiologique par WGS des souches cliniques et vétérinaires a permis de lier entre eux 19 des cas reçus au CNR-ESS de septembre à novembre 2017. Un retrait rappel a permis de stopper l'épidémie.
- à l'investigation microbiologique de deux TIAC à *Salmonella* sérotype Enteritidis dans des écoles en septembre 2017. L'une était due à une consommation de reblochon dans le département de la Haute Savoie (74) et l'autre en lien avec un plateau repas (l'aliment contaminé n'ayant pu être déterminé) dans le département de l'Isère (38). Il s'agissait de 2 TIAC indépendantes après étude par WGS de l'ensemble des souches cliniques et vétérinaires.
- à l'investigation microbiologique d'une TIAC au sein d'une communauté laotienne en octobre 2017 due à deux germes, un variant monophasique 4,5,12:i:- de Typhimurium (ST34-CT1) et un *E. coli* O8:H9 (ST23) producteur de Shiga-toxine stx2e. Ces souches ont été retrouvées sur un plat préparé avec de la gelée au lait de coco.

- à la comparaison de deux souches de *Salmonella* sérotype Enteritidis dans le cadre d'un accident transfusionnel géré par l'EFS Nord-de-France. Les souches isolées du concentré plaquettaire et du patient transfusé avaient des génomes extrêmement proches et distants de tous les autres génomes des souches de sérotype Enteritidis reçues et séquencées au CNR-ESS en 2017 (n=1078). Ces éléments supportaient l'hypothèse d'une salmonellose après transfusion d'un concentré plaquettaire contaminé par *Salmonella* sérotype Enteritidis.
- à l'investigation microbiologique internationale de deux épidémies à *Salmonella* sérotype Enteritidis par analyse génomique comparative de séquences provenant de souches isolées d'œufs polonais et espagnols.
- à la détection et au suivi microbiologique de l'épidémie internationale de salmonelloses à *Salmonella* sérotype Agona chez les enfants de moins de un an, liée à la consommation de poudre de lait infantile. Par une analyse rétrospective par WGS, cette épidémie a été reliée à l'épidémie survenue en 2004 et 2005 chez 140 nourrissons contaminés par des poudres de lait infantile produits par le même fabricant. Des cas cliniques sporadiques ont été également retrouvés rétrospectivement entre les 2 épidémies. Les souches environnementales isolées de l'usine appartenaient au même cluster épidémique. Les retraits-rappels des lots produits par cette usine ont permis de stopper l'épidémie à l'échelle internationale. Au total, en 2017-2018, 38 cas de nourrissons ont été confirmés en France ainsi qu'un cas en Grèce et deux cas en Espagne.

#### **4.2 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux à *Shigella* en 2017**

En mai 2017, le CNR-ESS, avec Santé publique France, a étudié une épidémie à *Shigella sonnei* g dans une école primaire à Macau (Gironde), avec 53 cas détectés. Les isolements obtenus de 32 cas ont été analysés. La souche épidémique était multi-résistante aux antibiotiques avec notamment une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, aux fluoroquinolones et à l'azithromycine

## **5/ Activités de rétro-information, de formation et de conseil**

### **5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé**

#### **5.1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé**

S. Le Hello : « Epidémiologie génomique de *S. Dublin* ». Groupe de travail sur l'optimisation de la surveillance des salmonelloses bovines. 19 octobre 2017, Poligny.

L. Fabre : « données de surveillance du CNR *Salmonella* pour l'année 2016 – actualités ». 21<sup>ème</sup> réunion du réseau Salmonella. 07 décembre 2017 ANSES, Maisons-Alfort.

S. Le Hello : « apport de la génomique dans la gestion des épidémies ». Journée régionale Normandie consacrée à la gestion de signalements d'infections associées aux soins. 14 décembre 2017, CHU Caen

S. Bonacorsi, P. Bidet et P. Mariani-Kurkdjian. Participation aux Internes de Pédiatrie et de Biologie dans le cadre des staffs et enseignements

#### **5.1.2 Accueil de stagiaires**

Le CNR-ESS reçoit des stagiaires BTS, masters, doctorants, post-doctorants sur projet et des stagiaires étrangers, dont certains du réseau international des Instituts Pasteur, qui viennent acquérir des techniques spécifiques phénotypiques et moléculaires afin de travailler sur des souches prévalentes dans leur pays, aussi bien humaines qu'alimentaires.

##### Liste des stagiaires au CNR-ESS en 2017 :

- Sophia ACHAIBOU, Licence professionnelle de génomique (ENCPB, Paris), stage en alternance de septembre 2016 à septembre 2017 sur l'étude de la différenciation *Shigella/E.coli* par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof.
- Elisabeth HANSEN, Master 2 Biologie moléculaire et cellulaire (Université Pierre et Marie Curie, Paris 5), stage du 5 décembre 2016 au 14 juin 2017 sur l'établissement d'un outil génomique de typage des *Shigella*.
- Caisey PULFORD, 1<sup>ère</sup> année de doctorat (Université de Liverpool), stage du 20 mars au 14 avril 2017 et du 13 au 29 juin 2017 en vue d'une étude de génomique comparative de *Salmonella* Panama en collaboration avec la Liverpool School of Tropical Medicine.
- Jeanne POSTAL, 2<sup>ème</sup> année de Master 1 (AgroParisTech), stage du 3 juillet au 25 août 2017 sur la revue de littérature sur les derniers développements en sérologie et évaluer la possibilité de transférer les techniques au CNR.
- Victor OLLIVIER, Stagiaire de 3<sup>ème</sup>, stage d'observation du 18 au 22 décembre 2017.
- Rosalie REIFSCHNEIDER, Stagiaire de 3<sup>ème</sup>, stage d'observation du 18 au 22 décembre 2017.

## Liste des stagiaires au LA-RD en 2017

- Aurélie COINTE, Master 2 Sciences du médicament "Parcours : "Microbiologie (bactéries, virus, parasites) : microbiotes, agents pathogènes et thérapeutiques anti-infectieuses. Analyse de la diversité des *Escherichia coli* de pathotype hybride, producteurs de Shiga toxine et associés à une virulence extra-intestinale
- Jeanne TRUONG, Master 2 Sciences du médicament "Parcours : "Microbiologie (bactéries, virus, parasites) : microbiotes, agents pathogènes et thérapeutiques anti-infectieuses" Caractérisation de souches de *Escherichia coli* non productrices de Shigatoxines, responsables d'infections extra-intestinales associées à un syndrome hémolytique et urémique.
- Claire Hobson, Master 2 Sciences du médicament "Parcours : "Microbiologie (bactéries, virus, parasites) : microbiotes, agents pathogènes et thérapeutiques anti-infectieuses" Evaluation de l'impact des chimiothérapies anti-cancéreuses sur *Escherichia coli* et sa niche écologique

### **5.1.3 Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**

Les responsables du CNR-ESS aident les laboratoires nationaux à identifier les sérotypes de *Salmonella*, notamment en diffusant un guide dans lequel sont répertoriés tous les sérotypes connus avec leur formule antigénique complète. L'édition 2007 du schéma de White-Kauffmann-Le Minor par P.A.D. Grimont et F.X. Weill est accessible en version française et anglaise sous forme d'un fichier pdf téléchargeable à l'adresse suivante :

<http://www.pasteur.fr/ccoms/salmonella>

### **5.1.4 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR**

La plupart des informations concernant le CNR-ESS ET LA-RD (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais de pages Internet dédiés dont voici les liens :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/salmonella>

<http://cnr-escherichiacoli-robertdebre.aphp.fr>

En 2017, le CNR a communiqué avec tous les laboratoires correspondants afin de les avertir de la nouvelle organisation des activités dans le cadre du nouveau mandat : activité diagnostique *E. coli* au LA-RD ainsi que l'arrêt des sérologies EHEC. De la même façon un courrier a été adressé à chaque laboratoire lorsqu'une souche envoyée n'était pas sélectionnée pour être sérotypée pour expliquer l'arrêt du sérotypage systématique de l'ensemble des souches reçues au CNR et la sélection des souches pour séquençage. Un autre courrier encourageait également les laboratoires correspondants à déclarer leurs souches en ligne sur la plateforme Voozаноо du CNR. Ces 3000 courriers envoyés ont engendré de nombreux échanges par courriels et téléphone avec les laboratoires correspondants (annexe supplémentaire).

### 5.1.5 Activités de conseil aux professionnels de santé

Les résultats des analyses sont envoyés au laboratoire ayant adressé la souche par courrier, une copie peut être envoyée par fax ou par courrier électronique sur demande du laboratoire. Des conseils à la fois pratiques (milieu de transport, feuille d'information...), diagnostic (importance des gènes de pathogénicité ou du sérotype détecté...), thérapeutiques et/ou épidémiologiques sont donnés de façon quasi quotidienne par téléphone ou courrier électronique ([colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr) ou [salmonella@pasteur.fr](mailto:salmonella@pasteur.fr) ou [e.coli@aphp.fr](mailto:e.coli@aphp.fr)).

### 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Simon Le Hello est membre du **réseau *Salmonella***, ANSES, Maisons-Alfort (depuis 2008), expert national au réseau Food- and Waterborne Diseases de l'European Center of Disease Control (**FWD-ECDC**, depuis 2008) et du Working Group **FWD-CRESP**, Molecular surveillance and cluster response de l'ECDC Stockholm (depuis 2015), expert du Comité d'Experts Spécialisés **CES-BIORISK** : évaluation des risques biologiques dans les aliments (depuis 2015), membre du groupe de travail **Attribution des sources de maladies infectieuses d'origine alimentaire**, ANSES Maisons-Alfort (depuis 2016), membre du groupe de travail de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) sur l'optimisation de la surveillance des salmonelles en filière bovine et filière fromages au lait cru (depuis 2017) et enfin membre du Comité d'Administration de l'Observatoire Nationale de l'Épidémiologie de la Résistance aux antibiotiques, **ONERBA**

Par ailleurs, le CNR-ESS et le CCOMS *Salmonella* participent au réseau Global Foodborne Infections Network de l'OMS, aux réunions et avis d'expertises pour l'ECDC et sont sollicités pour avis d'experts lors de saisines nationales.

Pour 2017, nous avons participé aux saisines suivantes :

- « mesures de maîtrise des salmonelles dans la filière porcine, dans l'alimentation animale et vis-à-vis de *Salmonella* Kentucky » saisine conjointe DGCCRF/DGAL
- « Etat des connaissances sur *Salmonella* Agona et plus particulièrement sa persistance dans l'environnement » saisine Direction Générale de la Santé.

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

Très nombreuses interviews de Simon Le Hello et François-Xavier Weill pour la presse écrite, radiophonique et télévisuelle nationale et internationale dans le cadre de l'épidémie à *Salmonella* Agona et d'un communiqué de presse sur l'antibiorésistance (publication de Tran-Dien et al, Lancet Inf Dis). Il y a ainsi eu 100 retombées médiatiques en 2017.

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

### 6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Pour *Salmonella* et *Shigella* :

**Impact des sélections sur le système de surveillance des salmonelles d'origine humaine, France CNR** – (S. Le Hello) – collaboration avec Unité de modélisation des maladies infectieuses (M. Churakov, S. Cauchemez)

Sur les 9000 souches de *Salmonella* reçues au CNR, 6000 peuvent être séquencées annuellement du fait des contraintes budgétaires supplémentaires liées à cette technologie hautement discriminante.

Objectif : Quelle serait la meilleure sélection possible, la meilleure proportion séquençage/sérotypage ? Ce qui revient à identifier d'éventuels algorithmes d'échantillonnages susceptibles de minimiser le risque de non signalement d'une épidémie.

Matériel : La base du CNR-ESS est disponible sur plusieurs années. Méthode : Programme de simulations sous R.

- Simuler une année de données, y incorporer des alertes et des épidémies (s'inspirer de la base réelle mais attention pour les épidémies, il y a eu investigations, échelle de temps journalière). Cette base est fixée pour un jeu de simulation.
- Imaginer différents scénarios :
  - a. Au départ : envoi 1 souche sur X ? Par région ?
  - b. A l'arrivée : analyse une souche sur X ? conserver toutes les souches ;
- En sortie, nombre d'alertes/épidémies, et dates correspondantes.

Pour ce projet, il est nécessaire d'étudier finement le circuit global (de la souche au calcul des seuils) pour concevoir un algorithme dynamique qui reproduise l'activité du CNR ESS (package R va devoir être reprogrammé en partie (calcul des 3 seuils)). Ce développement est effectif et en « essai » à Santé Publique France depuis avril 2018.

***Salmonella enterica* serotype Typhimurium et CRISPOL, France CNR** – (C. Renaudat) – collaboration ANSES

Depuis des décennies, Typhimurium est le sérotype prédominant dans les infections humaines à *Salmonella* avec près de 3000 souches reçues annuellement par le CNR en France. La méthode CRISPOL, est une méthode de sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de son variant monophasique. Il semblerait que certains CRISPOL types soient spécifiques à certaines sources alimentaires.

Objectif : attribuer les populations clonales à des sources de production animales.

Matériel : 4000 souches humaines (2011) et 1000 souches animales (2010-2011).

Méthode : modèle d'attribution bayésien.

Dans un premier temps, une description des données (nombre de population clonales, nombre de sources alimentaires, répartition des populations ...) est nécessaire (travail effectué par Charlotte Renaudat). Ensuite, le modèle statistique de Hald modifié sera appliqué pour une étude d'attribution source.

**Etudes de populations homogènes résistantes aux antibiotiques chez *Salmonella* et *Shigella*** – S. Le Hello, F.-X. Weill, S. Lefevre

La résistance aux antibiotiques est émergente chez les *Salmonella* et les *Shigella*. Le suivi de ces résistances fait partie des missions du CNR-ESS

Objectifs : caractériser les mécanismes émergents de résistance (gènes, supports et environnements génétiques) et décrire la structure des populations bactérienne résistantes.

Matériel : souches du CNR-ESS et souches obtenues via des collaborations internationales

Méthodes : microbiologie classique et WGS.

Ces approches ont pour but d'identifier l'émergence, comprendre l'évolution et la propagation de certains clones à succès (*Salmonella* sérotypes Kentucky, Typhi et Panama, *S. flexneri* 2a dans certaines communautés, ...).

### **Finalisation de l'outil génomique pour le typage des *Shigella* – F.-X. Weill**

Il est important de conserver une correspondance entre les données de WGS et les données de sérotypage des *Shigella*, méthode de référence utilisée depuis plusieurs décennies.

Objectif : Inférer un sérotype de *Shigella* à partir de séquences génomiques.

Matériel : 250 souches disponibles au CNR-ESS et couvrant la diversité génétique des différents sérotypes de *Shigella*.

Méthodes : WGS et bioinformatique.

Ce travail permettra de s'affranchir des techniques de microbiologie classique pour le typage des *Shigella* tout en gardant des résultats compatibles avec les données de sérotypage.

### **Etablissement d'un dictionnaire lysotype/genotype pour *S. enterica* sérotype Typhi – F.-X. Weill**

La distribution mondiale des populations de *S. enterica* sérotype Typhi a été étudiée durant de nombreuses décennies grâce à la lysotypie, technique qui n'est plus pratiquée depuis ces dernières années.

Objectif : Inférer un lysotype à partir de séquences génomiques de *S. enterica* sérotype Typhi.

Matériel : 500 souches disponibles au CNR-ESS et couvrant la diversité génétique des différents lysotypes de *S. enterica* sérotype Typhi.

Méthodes : WGS et bioinformatique.

Ce travail a pour but d'établir un lien entre les données de WGS et les données de lysotypage, de façon à ne pas perdre les informations précieuses accumulées depuis les années 1950.

Pour *E. coli* :

*E. coli* intestinaux :

- **Caractérisation du clone émergent de EHEC O80:H2 *stx2*** (Thèse de Science : Dr Aurelie Cointe)
- **Participation au PHRC national ZYTHROSHU** : « Intérêt de l'azithromycine dans le traitement des syndromes hémolytiques et urémiques post diarrhée »

*E. coli* extra intestinaux (LA-RD) :

- **Unité INSERM 1137** : S. Bonacorsi et P. Mariani- Kurkdjian sont membres de l'équipe 2 de l'unité INSERM 1137 nouvellement créée en 2014. La thématique de l'unité porte sur *Escherichia coli* : épidémiologie de la résistance, étude des mécanismes de virulence avec des approches évolutives et de modélisation.
- **Etude clinico-biologique des méningites néonatales à *E. coli* en France (LA-RD)** : Analyse de l'émergence du clone O1 :K1 :H7 ( Master2 – Dr Guillaume Geslain)
- **Participation au PHRC national COMBAT (LA-RD)** : « Observatoire des méningites bactériennes de l'adulte » pour la caractérisation des souches de *E. coli*.
- **Participation à l'étude du portage des BLSE dans la flore fécale chez l'enfant** en lien avec le groupe ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique du Val de Marne)
- **Participation à l'Observatoire des pyélonéphrites de l'enfant à *E. coli* BLSE** sous l'égide du GPIP (LA-RD).

## 6.2 Liste des publications et communications de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

### (i) Publications nationales

1. Weill F.-X, Le Hello S et Grimont PAD. Salmonella. In 3<sup>e</sup> édition du Précis de bactériologie clinique. Eds : Riegel P, Favennec L, Paugam A, Pozetto B. Editions ESKA.
2. Le Hello S. Enterobacteriaceae (y compris Yersinia). In 3<sup>e</sup> édition de bactériologie médicale. Techniques usuelles. Eds : Ploy M.C, Denis F.

### (ii) Publications internationales

1. Fonteneau L, Jourdan Da Silva N, Fabre L, Ashton P, Torpdahl M, Bouchrif B, El Boulani A, Valkanou E, Mattheus W, Friesema I, Varela Martínez C, Herrera Leon S, Mossong J, Severi E, Grant K, Weill F.-X, Gossner CM, Bertrand S, Dallman T, Le Hello S. *Salmonella* Chester multinational outbreak linked to travel exposures in Morocco, summer 2014 – 2015. *Euro Surveill.* 2017;22(7). pii: 30463.
2. Peters T, Bertrand S, Björkman JT, Brandal LT, Brown DJ, Erdösi T, Heck M, Ibrahim S, Johansson K, Kornschöber C, Kotila SM, Le Hello S, Lienemann T, Mattheus W, Nielsen EM, Ragimbeau C, Rumore J, Sabol A, Torpdahl M, Trees E, Tuohy A, de Pinna E. Multi-laboratory validation study of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, 2015. *Euro Surveill.* 2017;22(9). pii: 30477.
3. Vignaud ML, Cherchame E, Marault M, Chaing E, Le Hello S, Michel V, Jourdan-Da Silva N, Lailler R, Brisabois A, Cadel-Six S. MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012. *Front Microbiol.* 2017;8:295.
4. Mohammed M, Le Hello S, Leekitcharoenphon P, Hendriksen R. The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):544.
5. Kuijpers LMF, Phe T, Veng CH, Lim K, Ieng S, Kham C, Fawal N, Fabre L, Le Hello S, Vlieghe E, Weill F.-X, Jacobs J, Peetermans WE. The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008-2015. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(9):e0005964.
6. Tran-Dien A, Le Hello S, Bouchier C, Weill F.-X. Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective whole-genome sequencing study. *Lancet Infect Dis.* 2017 Nov 29. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30705-3.
7. Bruyand M, Mariani P, Gouali M, de Valk H, King LA, Le Hello S, Bonacorsi S, Loirat C. Hemolytic uremic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, an overview. *Med Mal Infect.* 2017. pii:S0399-077X(16)30859-9.

8. Delannoy S, Mariani-Kurkdjian P, Webb HE, Bonacorsi S, Fach P. The Mobilome; A Major Contributor to *Escherichia coli* stx2-Positive O26:H11 Strains Intra-Serotype Diversity. *Front Microbiol.* 2017 Sep 6;8:1625.
9. Gaschignard J, Geslain G, Mallet C, Lorrot M, Blot N, Alison M, Bonacorsi S. Spondylodiscitis in a healthy 12-year-old girl with Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) bacteraemia. *BMC Infect Dis.* 2017 May 31;17(1):380.
10. Birgy A, Bidet P, Levy C, Sobral E, Cohen R, Bonacorsi S. CTX-M-27-Producing *Escherichia coli* of Sequence Type 131 and Clade C1-M27, France. *Emerg Infect Dis.* 2017 May;23(5):885.
11. Birgy A, Delecourt M, Geslain G, Desselas E, Caseris M, Magnan M, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Bonacorsi S. A combination of mecillinam and amoxicillin/clavulanate can restore susceptibility of high-level TEM-1-producing *Escherichia coli* to mecillinam. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Jul 1;72(7):1911-1914.
12. Delannoy S, Beutin L, Mariani-Kurkdjian P, Fleiss A, Bonacorsi S, Fach P. The *Escherichia coli* Serogroup O1 and O2 Lipopolysaccharides Are Encoded by Multiple O-antigen Gene Clusters. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Feb 7;7:30.
13. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, Cattoir V, Chapuis A, Chardon H, Degand N, Doucet-Populaire F, Dubois V, Fortineau N, Grillon A, Lanotte P, Leyssene D, Patry I, Podglajen I, Recule C, Ros A, Colomb-Cotinat M, Ponties V, Ploy MC, Bonnet R. Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Feb 23;61(3).

(iii) *Communications nationales*

1. Njamkepo E. « Emerging resistance to azithromycin in non-typhoidal *Salmonella*: the example of a multidrug-resistant *S. enterica* serotype Blockley strain” Journées départementales Epidémiologie et Infection, juin 2017 Institut Pasteur.
2. Le Hello S : « Du bon usage des kits entériques face à la diversité des souches *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* » Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 18 décembre 2017, Paris.
3. Camelena F, Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Bidet P. Nouvelle technique de typage rapide de *Escherichia coli* par MLVA. RICAI, 2017
4. Cointe A, Birgy A, Mariani-Kurkdjian P, Liguori S, Courroux C, Delannoy S, Fach P, J. Hogan, E. Loukiadis, P. Bidet, S. Bonacorsi. *Escherichia coli* pathogène émergent associant Shiga-toxine, virulence extra-intestinale et multirésistance. RICAI, 2017.
5. Mariani-Kurkdjian P. Nouveaux outils diagnostiques dans le SHU à STEC. Communication orale à la Société Francophone de Néphrologie Pédiatrique. Rouen. Novembre 2017

(iv) *Communications internationales*

Oui mais pas sur l'activité CNR

(v) *Conférences sur invitations*

Oui mais pas sur l'activité CNR

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

### **7.1 *Salmonella***

Le CNR-ESS va poursuivre sa collaboration avec les laboratoires de l'ANSES, en particulier l'unité caractérisation et épidémiologie bactérienne de Maisons-Alfort et du LNR *Salmonella* à Ploufragan. Le CNR-ESS apporte son expertise sur le sérotypage et au transfert de nouvelles technologies à ces laboratoires et participent conjointement aux investigations épidémiologiques. Pour exemple, la méthodologie CRISPOL a été transférée à l'ANSES à Maisons-Alfort et une comparaison de la base de données du CNR-ESS (> 6000 souches humaines) avec celle de l'ANSES (environ 1000 souches animales ou alimentaires) est toujours en cours.

Le CNR-ESS est parfois sollicité pour avis d'experts sur certaines saisines ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2033/99/CE. Il participe également au comité d'expert scientifique CES-BIORISK.

Le CNR-ESS participe en tant qu'expert au consortium « Salmonovar » coordonné par l'Institut Français du porc (Ifip) qui consiste à suivre l'évolution de souches monophasiques de Typhimurium dans des matrices de saucisson sec.

Le CNR-ESS collabore avec des laboratoires scientifiques vétérinaires nationaux et internationaux (INRA, DTU...).

### **7.2 *Escherichia coli***

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme les Ecoles Vétérinaires de Lyon (LNR *E. coli*) et de Maisons-Alfort, ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

## 8/ Programme d'activité pour les années suivantes

### 8.1 Apporter une expertise microbiologique

#### 8.1.1 Infections à *E. coli*

##### 8.1.1.1 Infections à *E. coli* entéro-hémorragiques

Dès le 1<sup>er</sup> avril 2017, conformément aux missions définies par le décret n°2016-806 du 16 juin 2016 pour le mandat 2017-2021 (<http://Santé publique France.santepubliquefrance.fr/>), l'activité *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) se réorganise comme suit :

- **l'arrêt définitif** la recherche des anticorps anti-LPS des principaux sérogroupes d'EHEC (O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157, O80 et O104) dans le sérum. Cette technique à visée épidémiologique n'était pas valide pour le diagnostic. Aucune technique sérologique alternative n'existe par ailleurs. Le CNR-ESS se laisse éventuellement la possibilité de développer une technique plus facilement validante.
- **l'isolement et l'identification des EHEC sur souches et sur prélèvements biologiques, et ce quel que soit l'âge du patient (adulte ou enfant), seront désormais exclusivement réalisés sur le site du LA-RD** : service de microbiologie, Hôpital Robert Debré, 48 boulevard Serurier, 75019 Paris cedex 19. Cela consiste en l'agglutination des souches, le sérotypage par PCR et la recherche par PCR des gènes de virulence : les gènes des Shiga-toxines *stx1* et *stx2*, le gène de l'adhésine intimine *eae* et le gène de l'enterohémolysine *hlyA* ou *ehxA* sur souches bactériennes et dans les selles se feront désormais sur le seul site du LA:
- **Le séquençage du génome entier** des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) s'effectuera au CNR, à l'Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex afin de typer les souches dans le cadre de la détection et des investigations des infections à EHEC

Le CNR-ESS et le LA-RD va poursuivre le travail d'information des laboratoires et de formation auprès de tous les biologistes.

##### 8.1.1.2 *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (LA-RD)

- **Développement et mise en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches. Distinction des souches responsables de cas groupés de celles responsables de cas sporadiques et affiliation des souches aux différents clones**
  - Génotypage des *E. coli* responsables de méningite néonatale (ECMN)  
Les souches seront caractérisées par leur appartenance à un groupe phylogénétique, par leur empreinte de virulence et par leur antigène somatique.
  - Le groupe phylogénétique sera déterminé par une PCR multiplex permettant de distinguer les 4 principaux groupes (A, B1, B2, D).

- Les empreintes de virulence comporteront la recherche par PCR des 10 gènes de virulence suivants :
  - ⇒ Adhésines : pfimbriae (*papC*, *papGII*, *papGIII*), Sfimbriae (*sfa/foc*)
  - ⇒ Toxines: hémolysines (*hlyC*), cytotoxic necrotising factor (*cnf1*)
  - ⇒ Systèmes de captation du fer: yersiniabactine (*fyuA*), aérobactine (*iucC*), salmocheline (*iroN*)
  - ⇒ Invasines : invasine brain endothelial cell (*ibeA*)

La PCR multiplex de groupage a été mise au point dans le LA-RD et constitue actuellement l'une des méthodes de référence utilisée dans le monde (Clermont *et al.*, 2000). De plus, nous avons mis au point une PCR multiplex permettant la recherche de l'ensemble des facteurs sus-cités en seulement 2 PCR.

Les sérogroupes les plus fréquents sont recherchés par une PCR multiplex mise au point dans le laboratoire. L'ensemble de ces caractéristiques associé à la recherche phénotypique du séro groupe capsulaire K1 et des principaux antigènes somatiques O (83, 45, 18, 16, 7, 1) permettra d'affilier en temps réel chaque souche à un groupe clonal. Ce résultat sera confronté aux données cliniques de chaque patient.

Rétrospectivement, les souches seront de plus, caractérisées par la technique MLST (Bidet *et al.* J Inf Dis 2007). La combinaison du ST et du séro groupe O permet d'identifier au sein des souches responsables de pathologies extra-intestinales, 49 sous-types, certains étant plus particulièrement associés aux souches responsables d'urosepsis (STc27 (O2), STc27(6) ou à des méningites. Ces caractérisations standardisées permettent de comparer les souches sur le plan international (Mahjoub-Mesai *et al.* J Inf Dis 2011).

Le laboratoire associé apportera également son expertise dans l'analyse de la survenue de cas groupés ou de la transmission mère-enfant qui pourra être réalisée grâce au typage des souches par PFGE. Ces investigations bénéficieront de l'expérience du laboratoire depuis une quinzaine d'années dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire ce qui a permis de constituer une banque de profils type.

- **Expertise pour une aide au diagnostic des méningites décapitées par antibiothérapie**

Le LA-RD apportera une expertise pour l'aide au diagnostic des méningites néonatales décapitées par une antibiothérapie par la réalisation de PCR spécifiques vis-à-vis de *E.coli* et le cas échéant, vis-à-vis d'autres bactéries responsables de méningites néonatales. Le laboratoire a acquis une expérience en matière de diagnostic par PCR des méningites décapitées (Negre *et al.* Infect Immun. 2004).

#### 8.1.1.3. Etude et suivi de la résistance des souches de *E.coli* aux antibiotiques en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques (LA-RD)

Le LA-RD étudie la sensibilité des souches de *E.coli* intestinaux et extra-intestinaux aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, aminosides et ciprofloxacine sera étudiée par la méthode de l'antibiogramme et la détermination des CMI. Ces techniques sont réalisées quotidiennement au laboratoire. La prévalence de la résistance pour chacun de ces antibiotiques pourra être ainsi déterminée. La présence de BLSE sera caractérisée sur le plan moléculaire à l'aide d'une PCR multiplex (Dallenne *et al.* J Antimicrob Chemother 2010).

Les souches présentant des résistances particulières seront adressées au CNR de la résistance aux antibiotiques.

### 8.1.2 Infections à *Shigella*

- **Contribuer au développement de méthodes de typage**

Le WGS est maintenant utilisé en routine au CNR-ESS. Cette méthodologie sera utile dans le cadre d'investigations d'épidémies et le développement d'outils d'analyse va permettre de s'affranchir à moyen-terme de l'identification biochimique et du sérotypage.

### 8.1.3 Infections à *Salmonella*

- **Contribuer au développement des méthodes de typage**

Le WGS est désormais utilisée en routine pour une proportion conséquente des souches reçues (> 6000/an). Les bases de données concernant les séquences des gènes des flagellines et les séquençotypes (MLST), et de CRISPOL (pour la population Typhimurium) sont automatiquement extraites. Une méthode de sélection des souches à analyser est en cours de modélisation, ceci afin de conserver les pouvoirs de détection et d'investigation des épidémies au sein du CNR-ESS.

- **Suivre des tendances évolutives temporelles des différents sérotypes de *Salmonella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire**

Le réseau du CNR-ESS est stable depuis des décennies et comprenait environ 95% des LBM de France métropolitaine et ultramarine en 2016.

En 2012, une étude d'évaluation des délais de notification du système de surveillance des salmonelloses humaines, France 2007-2011 a été menée (Jones *et al.* Euro Surveill 2014). Le CNR *Salmonella* se basera sur les éléments émis de cette étude pour étudier les délais inhérents du passage du sérotypage au séquençage complet du génome et son impact dans ses missions de détections/d'investigations des épidémies.

- **Suivre l'évolution de la résistance des *Salmonella* aux antibiotiques et étudier leurs mécanismes de résistance et leurs supports génétiques**

Nous allons poursuivre l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide de méthodes standardisées (antibiogrammes suivant le CA-SFM et l'EUCAST) et la détermination des CMI par la méthode des micro-dilution (Sensititre) pour une collection d'environ 1000 souches de *Salmonella* représentative des 10 000 souches reçues environ par an.

La recherche et la compréhension de l'acquisition de certaines résistances sont privilégiées. Elles concernent les résistances aux antibiotiques clés dans le traitement des salmonelloses sévères, à savoir la ciprofloxacine, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les carbapénèmes et une alternative que représente l'azithromycine et/ou la colistine.

- **Détecter précocement les épisodes épidémiques, par la caractérisation des souches de *Salmonella* par la méthode de typage la plus adaptée au sérotype en cause et par le développement de seuils d’alerte**

Le CNR-ESS continuera à utiliser en routine hebdomadaire le programme de détection basé sur les trois algorithmes et développé par Santé publique France. Un algorithme similaire basé sur les MLST et CRISPOL types est en cours de développement depuis leurs extractions automatiques en WGS.

## **8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec Santé publique France**

- **En transmettant à Santé publique France, en temps réel, les résultats concernant les infections à EHEC, les foyers de cas groupés notifiés au CNR des EHEC, *Salmonella* ou *Shigella***

Le CNR-ESS et le Laboratoire associé continueront de transmettre quotidiennement à Santé publique France par fax et par courrier tous les foyers de cas groupés à un même groupe de EHEC, de *Shigella* et/ou de *Salmonella* (épidémies familiales, hospitalières, scolaires, crèches, toxi-infections alimentaires collectives, infections collectives) signalées au CNR-ESS ET LA-RD par les laboratoires correspondants. Tous les phénomènes d’importance seront communiqués sans attendre par téléphone. Le CNR-ESS va poursuivre son envoi hebdomadaire à Santé publique France des foyers de cas groupés notifiés par les laboratoires de son réseau ainsi que les différents relevés épidémiologiques habituels.

- **En participant à l’investigation des cas groupés (typage de souches, comparaison des souches isolées chez les malades et dans d’autres sources,..)**

Le CNR-ESS et LA-RD va poursuivre sa participation à l’investigation des cas groupés en collaboration avec Santé publique France.

Les souches EHEC d’origine humaine ou non seront étudiées désormais par séquençage complet du génome. Toutes les souches seront envoyées par le LA-RD au CNR-ESS pour cela. Le CNR-ESS va également séquencées toutes les shigelles et une sélection de souches de *Salmonella* (>50% des souches).

- **Lors de la survenue d’une épidémie, en réalisant rapidement un typage le plus discriminant possible (adapté en fonction du sérotype en cause) afin de différencier les cas épidémiques et non épidémiques et de comparer des souches isolées chez les malades et dans d’autres sources en particulier alimentaire**

Le CNR-ESS et LA-RD va poursuivre son expertise microbiologique lors d’investigations d’épidémies en collaboration avec Santé publique France (pour le choix des souches épidémiques ou non épidémiques), l’ENV-Lyon (LNR) et l’ANSES- LERQAP Maisons-Alfort (pour analyser en parallèle les souches représentatives d’origine alimentaire). Il mettra en œuvre, le plus rapidement possible le séquençage du génome complet des souches épidémiques et non-épidémiques de sa collection de façon à déterminer si les souches étudiées sont reliées génétiquement.

- **En suivant les tendances évolutives temporelles des différentes espèces de EHEC, *Shigella* ou *Salmonella* en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire**

Le réseau du CNR date des années 1950, c'est un réseau stable (environ 1200-1400 laboratoires participants), il possède une bonne couverture géographique et est relativement exhaustif. La dernière enquête CNR-AFSSAPS dans le cadre du contrôle national de qualité a montré que le CNR avait connaissance de 54% des isollements de *Shigella* et 66% des *Salmonella*. La mise en place du site web-Voozoo permet de remplacer les fiches d'informations et raccourcira ainsi les délais d'information du CNR concernant l'isolement des souches de *Shigella* et *Salmonella*.

- **En collaborant avec les structures en charge de la surveillance des STEC et des Salmonelles chez l'animal, dans les aliments et dans l'environnement (échanges de souches...)**

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme l'Ecole Vétérinaire de Lyon (Dr Loukiadis) et de Maisons-Alfort ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

Le CNR-ESS va poursuivre sa collaboration avec les réseaux de l'ANSES. Il s'engage également à instaurer des collaborations avec tout autre structure en rapport avec les *Salmonella* et *E.coli*.

- **En participant avec Santé publique France au réseau européen ECDC-FWD (Tessy) de surveillance des *Salmonella* et des STEC (envoi trimestriel des données de surveillance, collaboration en cas d'alerte européenne, ...)**

Le CNR-ESS ET LA-RD participe depuis plusieurs années au réseau européen de surveillance Enter-Net devenu ECDC-FWD qui est chargé de la surveillance internationale des infections gastro-intestinales humaines (*E. coli* entérohémorragiques, salmonelles, shigelles...). Le CNR-ESS et LA-RD participe chaque année à des contrôles qualité externes internationaux de souches STEC et salmonelles organisés par ce réseau. Par ailleurs, le CNR-ESS et LA-RD transmet ses données trimestriellement via Santé publique France à ce réseau européen et répond aux demandes d'informations qui lui sont adressées par l'ECDC-FWD ou par d'autres réseaux comme l'EFSA.

- **En collaborant aux activités des réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen notamment dans le cadre de l'application de la directive**

Le CNR-ESS et LA-RD va poursuivre sa collaboration avec les réseaux de surveillance internationaux, notamment en répondant aux collectes annuelles de données de ces structures. Il est aussi parfois sollicité pour un avis d'expert sur certaines « saisines » ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2003/99/CE.

Dans le cadre des infections à *E. coli* extra-intestinaux, la surveillance épidémiologique se fera grâce au réseau national de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques...). La coordination de l'Observatoire national des méningites bactériennes de l'enfant, créé à l'initiative du Groupe de Pathologie Infectieuse pédiatrique (GPIP) de la

Société Française de Pédiatrie (SFP) et de l'association clinique et thérapeutique infantile du Val de Marne (ACTIV), est poursuivi. Cet observatoire comprend un réseau de 259 services de pédiatrie et 168 services de bactériologie répartis dans toute la France. Grâce à ce réseau, le recueil exhaustif des données cliniques auprès de chaque service de pédiatrie permettra de mieux caractériser la méningite à *E. coli*, notamment sur les antécédents familiaux, le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et des suites de couches, l'examen clinique à la naissance et le terme de l'enfant, les antécédents personnels, le tableau clinique au moment de la prise en charge de la méningite, l'évolution avec en particulier, l'apparition de complications et localisations parenchymateuses. Le bilan infectieux réalisé sera détaillé ainsi que l'antibiogramme de chaque souche. Enfin, la prise en charge thérapeutique sera étudiée en particulier avec le type, la dose et la durée des antibiotiques.

Parallèlement à la caractérisation clinique, la caractérisation génétique des souches de *E. coli* sera réalisée au sein du LA-RD.

### **8.3 Contribuer à l'alerte en signalant à Santé publique France, tout événement inhabituel**

Grâce à ses différents réseaux, le CNR-ESS et le LA-RD poursuivra sa collaboration quotidienne avec Santé publique France en signalant et en participant activement à l'investigation de tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles...), survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles.

# **Annexes**

## **ANNEXE 1/ Missions et organisation du CNR**

### **A1.1 Missions et objectifs du CNR-ESS et de son laboratoire associé à l'Hopital Robert Debré**

Les objectifs du Centre National de Référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS) sont de surveiller au niveau national et de caractériser les souches d'*E. coli*, *Shigella* et de *Salmonella* sur le plan moléculaire afin d'analyser leurs diversités génétiques et leurs facteurs de pathogénicité.

*Les missions du CNR-ESS ET LA-RD se répartissent de la manière suivante :*

#### ***Pour les E. coli responsables d'infections digestives :***

- contribuer au développement du diagnostic de routine des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et en particulier des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les laboratoires de diagnostic (CNR-ESS ET LA-RD),
- contribuer à la surveillance des infections à STEC (*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en lien avec Santé publique France, en mettant en évidence la présence de STEC dans les selles (CNR-ESS ET LA-RD),
- participer, en lien avec Santé publique France, à l'investigation de cas groupés par séquençage complet du génome des souches et comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources en collaboration avec les structures en charge de la surveillance ou d'études ponctuelles sur les STEC chez l'animal, dans les aliments et dans l'environnement telles que l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et l'ANSES,
- contribuer à des études de recherche appliquée (CNR-ESS ET LA-RD),
- contribuer avec Santé publique France aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE (CNR-ESS ET LA-RD),
- contribuer à l'alerte en signalant à Santé publique France tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles (CNR-ESS ET LA-RD).

#### ***Pour les E. coli responsables de méningites néonatales (LA-RD):***

- développer et mettre en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches permettant de les caractériser (typage, génotypage, empreinte de virulence) et de distinguer les souches responsables de cas groupés de celles qui sont responsables de cas sporadiques et l'affiliation des souches aux différents clones,
- développer en liaison avec Santé publique France, un réseau de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques, etc.),
- étudier et suivre la résistance des souches aux antibiotiques,
- apporter une expertise pour une aide au diagnostic des méningites décapitées par antibiothérapie,
- contribuer à l'alerte en signalant à Santé publique France tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, cas groupés, formes cliniques ou souches inhabituelles, etc.

### ***Pour les Shigella (CNR-ESS):***

- suivre les tendances évolutives temporelles des différentes espèces/sérogroupe de *Shigella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyses de biologie médicale sur tout le territoire.
  - suivre l'évolution de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques et des mécanismes de résistance en liaison avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.
  - contribuer à la détection et l'investigation des cas groupés en lien avec Santé publique France, par séquençage complet du génome.
  - contribuer à des études de recherche appliquée.
  - participer, en lien avec Santé publique France, aux réseaux de surveillance et d'alerte internationaux et en particulier européens.
  - contribuer à l'alerte en signalant à Santé publique France, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance, apparition de souches inhabituelles, etc...
- Toutes ces missions sont possibles avec la collaboration de nombreux hôpitaux et laboratoires répartis dans toute la France et à une collaboration étroite avec Santé publique France.

### ***Pour les Salmonella (CNR-ESS):***

- contribuer à la mise en place du séquençage complet du génome en routine.
- suivre les tendances évolutives temporelles des différents clones de *Salmonella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire.
- contribuer à la surveillance et à l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* en signalant à Santé publique France les foyers de cas groupés notifiés au CNR-ESS.
- suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* et étudier les mécanismes de résistance notamment en collaboration avec le CNR des mécanismes de résistance aux antibiotiques.
- détecter précocement les épisodes épidémiques, par la caractérisation des souches de *Salmonella* par séquençage complet du génome.
- développer la capacité, lors de la survenue d'une épidémie, de réaliser rapidement un typage des souches de *Salmonella* concernées afin de différencier les cas épidémiques et non épidémiques et de comparer des souches isolées chez les malades et dans d'autres sources, en particulier alimentaire.
- collaborer avec les réseaux nationaux de surveillance des salmonelles chez l'animal, dans les aliments et l'environnement.
- participer avec Santé publiques France au réseau européen des surveillance des *Salmonella* de l'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) : envoi trimestriel des données de surveillance, collaboration en cas d'alerte européenne, ...
- collaborer aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.
- contribuer à l'alerte en signalant à Santé publique France, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance, apparition de souches inhabituelles...

## A1.2 Organisation du CNR et de son laboratoire associé à l'Hopital Robert Debré

### A1.2.1 Le CNR-ESS: Effectif / Qualification du Personnel

#### - Effectif par catégories de fonctions

L'Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques (UBPE) a été créée en 2010 et a remplacé le laboratoire des Bactéries Pathogènes Entériques. Cette unité est dirigée par le Dr François-Xavier Weill et regroupe le CNR-ESS, le CNR des Vibrions et choléra et le Centre Collaborateur de l'OMS pour la Référence et la Recherche sur les *Salmonella*. Le personnel du CNR-ESS se répartissant de la façon suivante :

#### ETAT DES EMPLOIS DESTINES A L'ACTIVITE DU CNR

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP
<b>WEILL François-Xavier</b>	<b>Chef de laboratoire (Responsable du CNR)</b>	0,10
<b>LE HELLO Simon</b>	<b>Cadre médical (Co-Responsable du CNR)</b>	0,50
<b>LEFEVRE Sophie</b>	<b>Ingénieure de recherche confirmé (Responsable adjoint)</b>	0,90
<b>RENAUDAT Charlotte (*)</b>	<b>Cadre médical</b>	0,40
<b>FABRE Laétitia</b>	<b>Ingénieur de recherche confirmé</b>	0,50
<b>BELHASSEN Chantal</b>	<b>Technicien recherche</b>	0,75
<b>CARLE Isabelle</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,75
<b>GUIBERT Véronique</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,75
<b>LEJAY-COLLIN Monique</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,75
<b>RAVEL Magali</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,75
<b>RUCKLY Corinne</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,75
<b>SERRE Estelle</b>	<b>Technicien supérieure de recherche</b>	0,90
<b>GASTON Carole</b>	<b>Employée administrative</b>	1,00
<b>LEMESLE Marie</b>	<b>Technicienne supérieure administrative</b>	0,30
<b>TOTAL ETP</b>		9,10

(\*) en renfort en 2017, en raison d'un surcroît d'activité. Hors convention, son coût annuel a été pris en charge à 100% par l'Institut Pasteur

- *Les responsables scientifiques*

**François-Xavier Weill**

Docteur en médecine, DES de Biologie Médicale, Doctorat d'université de Microbiologie, ancien Interne et Assistant Hospitalier Universitaire (Bordeaux). Habilitation à diriger les recherches (Paris V).

**Simon Le Hello**

Docteur en pharmacie, DES de Biologie Médicale, Doctorat d'université de Microbiologie, DEA, ancien Interne de l'AP-HP. Habilitation à Diriger des Recherches (Paris Sud)

**Sophie Lefèvre**

Docteur en pharmacie, DES de Pharmacie spécialisée, Doctorat d'université de Microbiologie, ancien interne de Strasbourg.

**Charlotte Renaudat**

Docteur en médecine et épidémiologiste.

- *Le personnel technique*

**\* Techniciens effectuant les analyses:**

- **Laëtitia Fabre**, Ingénieure de Recherche, Bachelor in Science (Kingston, RU), Master 2 de Microbiologie, Doctorat d'Université de Microbiologie. Expérience : 16 ans au CNR-ESS.

- **Véronique Guibert**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 22 ans au CNR-ESS.

- **Corinne Ruckly**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 10 ans au CNR des méningocoques, 15 ans au CNR-ESS.

- **Monique Lejay-Collin**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 31 ans au CNR-ESS.

- **Isabelle Carle**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 30 ans au CNR-ESS.

- **Estelle Serre**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : depuis septembre 2016 au CNR-ESS.

- **Magali Ravel**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 2 an au CNR-ESS.

**\* Technicien du Centre Collaborateur OMS, décrivant les nouveaux sérotypes et développant de nouvelles techniques pour le CNR:**

- **Sylvie Issenhuth-Jeanjean**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 17 ans au CNR-ESS et au CCOMS.

**\*Technicien du laboratoire de préparation réalisant les milieux spéciaux pour le CNR :**

- **Chantal Belhassen**, technicienne de recherche. Expérience : 3 ans au CNR-ESS.

**\* Technicien du Centre Collaborateur OMS préparant les sérums et effectuant le sérotypage pour le CNR:**

- **Brigitte Chavinier-Jové**, technicienne supérieure de recherche. Expérience : 13 ans au CNR-ESS.

- *Le personnel administratif*

- **Carole Gaston**, employée administrative du CNR-ESS, enregistrement des dossiers et archivage

- **Marie Lemesle**, BTS Assistante Secrétaire Trilingue, secrétaire de l'unité BPE. Expérience : 5 ans au CNR-ESS.

### A1.2.2 Le laboratoire associé (LA-RD): Effectif / Qualification du Personnel

#### - Effectif par catégories de fonctions

Nom - Prénom	Libellé Emploi	ETP
M. BONACORSI Stéphane	PU-PH	0,2
Mme MARIANI-KURKDJIAN Patricia	PH	0,2
Melle LIGUORI Sandrine	ARC	1

### A1.3 Les locaux et équipements

#### A1.3.1 CNR-ESS (Institut Pasteur)

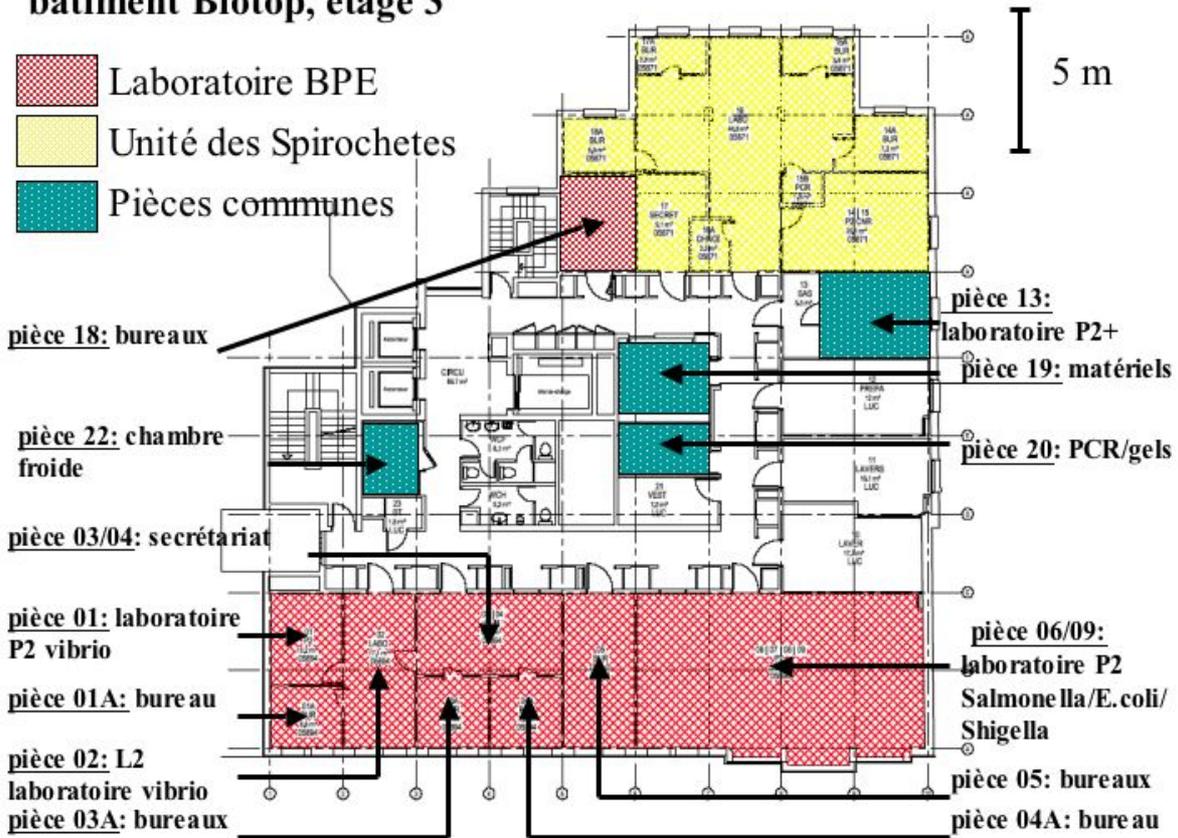
Le CNR-ESS, le CNR des Vibrions et du choléra, le CCOMS des *Salmonella* font partie de l'Unité d'Expertise et de Recherche des Bactéries Pathogènes Entériques dont les locaux se situent au 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biotop.

Les activités du CNR-ESS ont lieu dans les pièces suivantes:

- Pièce bureaux : directeur du CNR (pièce 4a), 2 directeurs adjoints (pièce 3a), 2 secrétaires (pièce 03/04), 8 techniciennes (pièce 5), 3 technicien(ne)s, 3 stagiaires et 1 bureau de biologiste (pièce 11) et 1 technicienne, 2 postes stagiaires partagés avec 1 technicien et 1 stagiaire du CNR Choléra (pièce 18) avec un ordinateur par personne.
- Laboratoire P2 avec 2 PSM (pièce 06/09) de 72.8m<sup>2</sup> avec 12 paillasse dont 6 sont dédiées à l'activité *Salmonella* (5 techniciennes + 1 stagiaire), pour le sérotypage, la détermination de la résistance aux antibiotiques et les amplifications géniques (PCR) et le WGS (PSM). Les autres paillasse se répartissent en 4 pour l'activité *E. coli/Shigella* et 2 pour le CCOMS *Salmonella*,
- Laboratoire P2+ de 13,5 m<sup>2</sup> pour l'analyse des souches STEC
- Trois autres pièces climatisées partagées avec l'unité postulante des Spirochètes et les 3 CNR de l'UBPE : une pièce de 11,6 m<sup>2</sup> où se trouvent les agitateurs Infors, les 2 congélateurs à -80°C et l'ultracentrifugeuse, une pièce, une pièce de 7,5 m<sup>2</sup> dédié comme îlot déchet et une pièce de 16,1 m<sup>2</sup> où se trouvent les appareils d'électrophorèses, les extracteurs ADN, la machine à galce et l'appareil d'acquisition d'image de gels Geldoc.

Pour réduire les coûts, le circuit des souches est commun pour tous les CNR de l'unité BPE (ouverture des paquets, enregistrement des informations épidémiologiques au secrétariat, local commun pour conserver les souches, pièce pour matériels et chambre froide communes).

### bâtiment Biotop, étage 3



Au 4<sup>ème</sup> étage: deux bureaux d'une superficie de 5 m<sup>2</sup> chacun donnant sur un laboratoire de 22,5 m<sup>2</sup>

Les deux bureaux numérotés 4A et 3A pouvant accueillir 2 personnes chacun sont occupés par une technicienne supérieure dédiée à l'activité de recherche et développement du CNR-ESS (4A), par la collaboratrice principale du CCOMS (3A) et par une ingénieure de recherche de l'Unité BPE (3A).

Le laboratoire déjà fonctionnel est consacré aux activités de recherche (techniques MLST, CRISPR, MLVA...) et est équipé du matériel suivant :

- 2 congélateurs à -20°C
- 2 réfrigérateurs à +4°C
- Un bain-marie sec
- Une étuve à 37°C
- Une centrifugeuse de paillasse

Au 1<sup>er</sup> étage, l'Unité BPE a acquis des locaux qui seront partagés avec le CNR des Leptospires (Unité des Spirochètes). Ces locaux de 33 m<sup>2</sup> ont été aménagés pour un circuit de marche en avant pour réaliser de la PCR diagnostique.

La mise en place d'une marche en avant permettra d'envisager l'accréditation COFRAC de ces méthodes de diagnostic selon la norme NF EN ISO 15189 dans les meilleures conditions.

Ces laboratoires ont été équipés par les deux unités.

**Matériel, équipement du CNR-ESS:**

- Équipement habituel d'un laboratoire de bactériologie : enceintes climatiques (+4°C, 30°C, 37°C, réfrigérée de 4° à 30°C)
- Postes de sécurité microbiologique de type II (x 2)
- Matériel d'électrophorèse en agarose et d'hybridation, capture électronique d'images\*
- Thermocycleurs (x 5)
- Appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad)
- Appareil d'électrophorèse en champ pulsé Bio-Rad DRIII (x2)
- Système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan (I2A) avec logiciel d'épidémiologie
- Équipement informatique : 6 ordinateurs Macintosh, 11 PC
- Congélateur à -80°C

\* Partagé avec les autres CNR de l'Unité et § de l'Unité des Spirochètes.

**Moyens extérieurs à la structure:**

- Collaboration importante avec la Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) au sein d'une structure transversale PIBnet (Pasteur International Bioresources network) pour les méthodes à haut-débit (WGS et Maldi toff).
- Réseau informatique de l'Institut Pasteur et le Centre d'Information pour la Biologie.
- L'assistance d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé en routine au CNR depuis novembre 2009 pour enregistrer les analyses et éditer les résultats.

### **A1.3.2 LA-RD**

Le Laboratoire Associé est situé dans le Service de Microbiologie du CHU Robert Debré (APHP). Il comprend :

- Une pièce pour l'étude des selles avec un poste de sécurité microbiologique pour l'isolement et l'identification des *E. coli* (local dédié au Laboratoire Associé).
- Une pièce pré PCR avec poste de sécurité PCR (locaux communs).
- Une pièce dédiée aux électrophorèses en agarose et au champ pulsé (locaux communs).
- Une chambre froide (locaux communs).

#### **Matériels et Equipements de la structure actuelle:**

##### Matériel appartenant au laboratoire:

- Poste de sécurité microbiologique de type II
- Étuve
- Microscope
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur à -20°C
- Maldi-TOF Bruker Microflex pour identification bactérienne

##### En commun:

- Pièce pré PCR avec poste de sécurité PCR
- Une pièce climatisée comprenant :
  - o Thermocyclers (x 3)
  - o Appareil PCR temps réel (Smart Cycler)
  - o Appareil d'électrophorèse en champ pulsé (Chef mapper- BioRad)
  - o Diversilab (Rep-PCR)
  - o Pièce post PCR comprenant
  - o Matériel d'électrophorèse en agarose
  - o Appareils de capture électronique des images (Gel docXRS /Biorad et Biocapture/Vilbert Lourmat)
- Laverie
- Réserve matériel en verre et matériel plastique à usage unique
- Chambre froide
- Congélateurs à -80°C (x 4)
- Logiciel de gestion des laboratoires (Lab400)
- Équipements informatiques de bureau en réseau protégé avec sauvegarde en salle informatique centrale de l'hôpital
- Bureaux médicaux

#### **Moyens extérieurs à la structure:**

- Accès à la structure de recherche IAME (Université Paris Diderot- Unité INSERM 1137)
- Utilisation d'un prestataire de service (Génome Express) pour le séquençage d'ADN

## **A1.4 Collection de matériel biologique**

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à noter que la collection CNR est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

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

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

Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

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

A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

## **A1.5 Démarche qualité**

### **A1.5.1 Démarche qualité du CNR-ESS**

**Le CNR *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*** fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

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

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

12 CNR et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Les 2 autres CNR, CNR *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* et CNR des vibrions et choléra ont déposé leur demande d'extension le 1<sup>er</sup> avril 2016. Leur audit d'extension s'est déroulé du 23 au 25 janvier 2018 et la confiance des évaluateurs a été accordée à ces CNR. Les conclusions officielles de l'évaluation doivent être communiquées au LREMS et publiées sur le site du COFRAC prochainement.

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

#### Engagement du CNR-ESS dans une démarche qualité

Le CNR-ESS est engagé dans une démarche qualité selon la norme ISO 15189 : la totalité des membres du personnel impliqués dans cette activité a suivi une formation à l'Assurance Qualité. Sophie Lefèvre a été nommée correspondante qualité en mai 2016 pour reprendre le suivi de notre projet qualité. Corinne Ruckly a été nommée suppléante correspondante qualité.

Un système qualité efficace a été mis en place avec une gestion documentaire électronique des documents (procédures, modes opératoires et enregistrement) et une mise en ligne progressive sur la plateforme webcampus de l'Institut Pasteur dans l'espace dédié à notre CNR.

Le 28 juin 2016, notre CNR a participé à un audit interne externalisé sur la technique suivante : « **Détection des gènes codant les Shiga-toxines Stx1 et Stx2 chez *Escherichia coli* par un système de PCR multiplex en point final.** ». Bilan : 6 écarts (dont 0 écarts critiques) et 7 remarques.

Le 22 novembre 2016, notre CNR a participé à un audit interne organisationnel. Bilan : 0 écarts et 12 remarques.

Le 27 février 2017, nous avons effectué une revue de qualité pour l'année 2016, présentant la dynamique de notre démarche qualité, un bilan des différents audits internes, un bilan des différents processus, une évaluation des indicateurs qualité de la politique qualité du LREMS, une évaluation des fournisseurs, ainsi que les axes d'amélioration à travailler sur l'année à venir.

En mai 2017 nous avons participé à la revue de direction du LREMS.

Un nouvel audit interne technique et qualité ont été réalisés en juin et octobre 2017, respectivement. L'audit COFRAC s'est déroulé du 23 au 25 janvier 2018.

Le périmètre de la démarche, restreint initialement aux activités *E. coli*, est en train de s'étendre à l'ensemble du CNR-ESS, en terme organisationnel et de gestion et traçabilité du matériel, des réactifs et des consommables.

### Evaluation externe de la qualité

Le CNR-ESS participe chaque année aux contrôles de qualité externe européens proposés par l'ECDC via le Statens Serum Institut (Copenhague, Danemark).

- Les résultats du CNR-ESS à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (méthode de diffusion en milieu gélosé et détection de la production de BLSE, AmpC acquise et carbapénémase) étaient 100% conformes aux résultats attendus.
- Le sous-typage moléculaire des *Salmonella* par PFGE a montré une bonne analyse BioNumerics avec des commentaires mineurs sur la qualité de nos gels.
- Le sous-typage moléculaire des *Salmonella* par MLVA a montré quant à lui 100% de résultats corrects parmi les profils alléliques.

Comme indiqué dans un paragraphe précédent sur l'évolution des activités de sous-typage au cours de l'année 2016, les techniques de PFGE et de MLVA ont été arrêtées pour être avantageusement remplacées par l'activité de WGS.

- Le dépistage des souches de *E. coli* susceptibles de produire des Shiga-toxines a montré : 100% de dépistage des gènes de pathogénicité *eae*, *stx1* et *stx2* et de leurs variants ; 100% de dépistage de la fermentation du sorbitol ; 90% d'exactitude dans le sérotypage des antigènes O et H. Les discordances obtenues ont fait l'objet d'une action corrective.

### Reconnaissance du laboratoire par des instances nationales et internationales

L'Unité BPE a été redésignée le 16 juin 2009 (1<sup>ère</sup> désignation le 1<sup>er</sup> janvier 1965) par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme Centre Collaborateur de l'OMS pour la Référence et la Recherche pour les *Salmonella*. Ce centre dirigé par François-Xavier Weill a pour principales missions : la mise à jour du Schéma de White-Kauffmann-Le Minor, l'appui aux Centres Nationaux de Références (sérotypage de souches complexes distribution de souches pour production d'antisérums...) et des activités de recherche. Le CCOMS participe comme organisateur du Contrôle de Qualité Externe international du réseau de l'OMS, GFN.

F.-X. Weill a été membre d'un groupe de travail Européen en charge de l'élaboration d'une norme ISO pour le sérotypage des *Salmonella*.

Le CNR-ESS effectue le sérotypage des souches complexes provenant du Laboratoire National de Référence de l'ANSES Maisons-Alfort.

### **A1.5.2 Démarche qualité du LA-RD**

En raison de l'obligation faite aux laboratoires de biologie de respecter la norme NF EN ISO 15189 (ordonnance du 13 janvier 2010), le service de Microbiologie ainsi que le Pôle de Biologie du CHU Robert Debré sont entrés dans la démarche d'accréditation en 2013. Des procédures spécifiques à l'activité du laboratoire associé ont été rédigées : procédures générales, procédures pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

La visite d'accréditation a eu lieu le 31 mars et le 1<sup>er</sup> avril 2014. Le service de Microbiologie et l'ensemble du Pôle de Biologie ont été accrédités (Accréditation n°8-3318). Aucun écart critique n'a été relevé au cours de cette évaluation, seuls des axes d'amélioration ont été définis.

## ANNEXE 2/ Capacités techniques du CNR

### A2.1 Pour Salmonella

#### A2.1.1 Liste des techniques de référence

##### \* Des techniques d'identification du genre, des espèces et des sous-espèces de *Salmonella*

###### *Bactériologie classique*

- **Culture sur différents milieux** (Drigalski, TSA, BCP, XLT4, Hektoen, Kligler–Hajna, Mannitol-Mobilité).

- **Tests biochimiques** réalisés en macro-galerie :

- Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose, du Mucate, du Citrate de Christensen, de l'Acétate de Trabulsi et du Glycérol. Production de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (Indole), bêta-galactosidase (ONPG) et bêta-glucuronidase. Culture sur Citrate de Simmons. Lyse par le phage 01. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

###### *Autres méthodes de différenciation d'espèces et de sous-espèces utilisables si besoin*

- **Séquençage du gène *rrs*** (codant pour l'ARN 16S) ou du **gène *rpoB*** (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches au genre *Salmonella* (*rrs*) et aux différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* (*rpoB*) grâce à la comparaison des séquences obtenues à celles contenues dans la base de données de l'UBPE.

##### \* Des techniques d'identification des sérotypes

- Le **sérotypage classique par agglutination**. Il nécessite l'emploi d'environ 200 antisérums (polyvalents et monovalents) polyclonaux absorbés, préparés chez le lapin. Le 1/3 des sérums est d'origine commerciale (principalement BioRad), le reste est préparé dans l'UBPE. Le sérotypage classique par agglutination reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2500 sérotypes.

- Le **sérotypage moléculaire** d'une souche de *Salmonella*. Trois techniques permettent de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique :

- **L'analyse MLST** (Multilocus sequence typing). Cette méthode est basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes conservés (dits gènes de ménage) après amplification génique. Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman *et al*, PloS Pathogens 2012).

- **Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB***. Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*.

- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 7100 spacers

différents ont été décrits par cette méthode ; ils sont accessibles sur le site web dédié (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Cette méthode originale a été mise au point au CNR-ESS (Fabre L *et al*, PloS One 2012).

**\* Des techniques de sous-typage des *Salmonella*:**

- **L'électrophorèse en champ pulsé** (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée et de référence PulseNet, accessible à <http://www.cdc.gov/pulsenet/>).

- **L'analyse MLVA** (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour les sérotypes Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011). Des schémas MLVA pour les sérotypes Enteritidis, Derby, Dublin, Typhi, Paratyphi A et Newport existent et sont en cours de validation et/ou harmonisation.

- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques **basée sur** le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein par le CNR-ESS en 2009, repose sur la détection de 68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes (68 spacers et 4 variants de spacers) fixées sur des microbilles grâce à la **technologie xMAP de Luminex®**.

De façon plus spécifique, le CNR-ESS dispose des techniques pour:

- **Le profil d'hybridation à l'aide d'une sonde IS200** pour le sérotype Paratyphi B,

- **La recherche par PCR de la présence de prophages** pour le sérotype Typhimurium,

**\* Des techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella***

- **L'antibiogramme** par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les dernières recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et la détermination de la CMI par la méthode E-test® (BioMérieux®).

- **L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques** (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support).

**\* Des techniques de séquençage complet des génomes des *Salmonella*:**

Cette technique est proposée par une une plateforme (P2M) permettant l'extraction d'ADN à grand volume (MagNAPure 96, Roche) et le séquençage par la technologie Illumina (NextSeq500). Les analyses bio-informatiques sont issues du CNR-ESS

**\* Des techniques de spectrométrie de masse:**

La plateforme P2M propose également une analyse des échantillons par MALDI-TOFF, mais très peu utile en routine pour l'identification des types de *Salmonella*.

## A2.1.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Le **sérotypage** des souches doit être réalisé conformément au schéma de White-Kauffmann-Le Minor (WKL) (9<sup>ème</sup> édition 2007), maintenu par le CCOMS (dirigé par les responsables du CNR-ESS). La demande d'un schéma WKL en format pdf se faisant en écrivant à l'adresse [whosalm@pasteur.fr](mailto:whosalm@pasteur.fr) (prière de mentionner les coordonnées professionnelles) ou téléchargeable en version anglaise ou française à l'adresse [www.pasteur.fr/ccoms/salmonella](http://www.pasteur.fr/ccoms/salmonella).

Le sous-typage par **électrophorèse en champ pulsé** doit être réalisé à l'aide d'un protocole standardisé sur le plan international (protocole PulseNet disponible à <http://www.cdc.gov/pulsenet/>). Des renseignements techniques sont disponibles auprès des responsables du CNR-ESS.

- **L'analyse MLVA** pour le sérotype Typhimurium et Enteritidis est standardisée et harmonisée. Le CNR-ESS aide à la mise en place et à l'harmonisation de cette technique pour les laboratoires français.

- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques est utilisée en routine au CNR-ESS (Institut Pasteur, Paris) et au Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES, Maisons-Alfort).

- **Le séquençage des génomes entiers (WGS)** des *Salmonella* est utilisé en routine au CNR-ESS (Institut Pasteur, Paris). Il permet d'extraire le sérotype moléculaire (MLST + séquence fliC et fljB), le CRISPOL-type des populations de Typhimurium, le contenu en gène de résistance, le contenu en plasmide ainsi que d'en connaître leur replicon-type. Il permet aussi les analyses microbiologiques les plus fines par comparaison SNPs, en utilisant les méthodologies les plus adaptées à l'investigation.

## A2.2 Pour Shigella

### A2.2.1 Liste des techniques de référence

*a. Techniques d'identification du genre, des espèces et des sous-espèces*

#### ***Bactériologie classique***

- Possibilité de culture sur différents milieux (Drigalski, TSA, BCP, XLD, Hektoen, Kligler Hajna, Mannitol-Mobilité...)

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose et du Glycérol. Production d'o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG), de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (indole) et bêta-glucuronidase. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

### Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisées en routine

- La recherche par **PCR du gène *uidA*, codant pour la bêta-glucuronidase**, la présence de ce gène permet de valider l'identification *E. coli* –*Shigella*.

- **La détection par PCR des gènes codant pour l'invasivité (*ial* et *ipaH*)** pour différencier une souche déficiente de *E. coli* d'une *Shigella*. Ces gènes sont aussi présents chez les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), mais ces derniers sont plus rares.

### Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisables si besoin

- **Le séquençage du gène *rpoB*** (codant pour la sous unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches aux genres *E. coli*-*Shigella* ou de les classer avec les autres entérobactéries correspondantes grâce à la comparaison aux bases de données de l'Unité BPE.

### *b. Techniques d'identification de Shigella*

#### Le sérotypage classique

##### **\* *Shigella***

Le **sérotypage complet** par agglutination permet d'identifier 20 sérotypes de *S. boydii*, 17 sérotypes de *S. dysenteriae* et 6 sérotypes de *S. flexneri*. Les souches de *S. sonnei* sont divisées en 5 biotypes en fonction des caractères biochimiques. Les sérums utilisés sont commercialisés par Eurobio ou Sifin, quelques sérums spécifiques sont fabriqués dans l'Unité BPE.

#### Le sérotypage moléculaire

Celui-ci est utile quand les souches ne sont pas sérotypables (nouveaux sérotypes en l'absence d'antisérums spécifiques ou quand les souches sont autoagglutinables [rough]).

- **Le sérotypage moléculaire O des *E. coli* et *Shigella* par *rfb*-RFLP**, mis au point dans l'Unité BPE (Pr P.A.D. Grimont) consiste en une analyse des profils de restriction obtenus par amplification de la région génétique *rfb* (antigène O, environ 20kb) puis restriction enzymatique avec *MboI*. Les profils de restriction ainsi obtenus sont comparés à une base de données dans le logiciel BioNumerics contenant 250 profils déterminés pour 148 sérogroupes O de *E. coli* et 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes O déterminés de façon moléculaire sont notés R (et non « O »).

- **Le sérotypage moléculaire de l'antigène H par séquençage du gène *fliC***. Il permet de déterminer le « H » moléculaire (nommé « F ») par comparaison à la base de données de l'Unité BPE qui comprend les séquences de 92 sérotypes de *E. coli* et près de 40 sérotypes de *Shigella*.

### *c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR des Shigella*

- Les gènes *ial* et *ipaH*
- Le gène *stx* chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1).

#### *d. Techniques de sous-typage des Shigella*

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée PulseNet). Méthode de référence à l'heure actuelle pour le sous-typage.

#### *e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des Shigella*

- L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et détermination de la CMI à tous les antibiotiques par la méthode en micro-dilution (Sensititre)
- L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support).

#### *g. séquençage du génome entier des Shigella*

Cette technique est réalisée grâce à une plateforme (P2M) de l'Institut Pasteur permettant une extraction d'ADN à haut-débit (MagNAPure 96, Roche) et le séquençage par la technologie Illumina (NextSeq500). Les analyses bio-informatiques réalisées au CNR-ESS permettent de connaître le séquençotype MLST, le type CRISPR, la séquence *fliC* et le contenu en gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques.

### **A2.2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Désormais l'analyse du génome des *Shigella* prédomine l'expertise et les investigations microbiologiques à mener.

### **A2.2.3 Collection de souches**

Au CNR-ESS, toutes les souches de *Shigella* ont été conservées au laboratoire, sur milieu gélosé sans glucose, depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs dizaines de milliers de souches conservées avec leurs informations microbiologiques et cliniques (si disponible). Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances aux antibiotiques. Les souches importantes sont en plus conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , parmi ces souches, on trouve :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *Shigella*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines.
- les souches de *S. dysenteriae* de type 1.
- les souches de *Shigella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques.

Pour les autres souches, elles sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches des CNR.

#### **A2.2.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS**

Concernant les *Shigella*, la caractérisation biochimique suivie de la séroagglutination reste la seule méthode diagnostique utilisable en laboratoire en routine. Le CNR-ESS peut séquencer les souches afin d'extraire les données utiles à une expertise.

### **A2.3 Pour Escherichia coli**

#### **A2.3.1 Liste des techniques de référence**

##### A2.3.1.1 au CNR-ESS

Séquençage du génome entier (WGS)

Cette technique est réalisée grâce à une plateforme (P2M) de l'Institut Pasteur permettant une extraction d'ADN à haut-débit (MagNAPure 96, Roche) et le séquençage par la technologie Illumina (NextSeq500). Les analyses bio-informatiques réalisées au CNR-ESS permettent de connaître le séquençotype MLST, l'opéron O et la séquence fliC (=sérotypage moléculaire), la détection de plus de 70 gènes de virulence (incluant les gènes classiquement recherchés par PCR et l'identification des variants) et le contenu en gènes de résistance aux antibiotiques.

##### A2.3.1.2 Techniques du LA-RD

###### *a. Diagnostic/identification*

- Mise en culture sur milieux spécifiques : Mac Conkey Sorbitol Cefixime Tellurite (BioMérieux), Milieu chromogène pour entérobactéries et milieu de Drigalski
- Agglutination par des antisérums (BioRad et Sifin)
- Identification biochimique sur galerie API20E (BioMérieux)
- PCR spécifique des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA*
- Groupage phylogénétique

###### *b. Typage*

- Sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145. Les sérotypes O104 et O121 ont été rajoutés à cette PCR multiplex
- RAPD, Rep -PCR
- PFGE
- Puces : 77 cibles et 11 sérotypes

### c. Sensibilité aux anti-infectieux

- étude par méthode de diffusion en milieu gélosé et méthode du E-test pour la détermination de la sensibilité à l'azithromycine

#### A2.3.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Lors d'investigations d'épidémies, la plupart des techniques exposées précédemment sont utilisables pour le suivi de l'épidémie. Pour *E. coli*, nous réalisons en priorité, le sérotypage (par agglutination ou moléculaire) et effectuons la recherche des gènes de virulence. Par la suite, le WGS est effectuée.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

#### A2.3.3 Collection de souches

Au CNR-ESS, toutes les souches de *E. coli* sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches des CNR. Les souches importantes sont de plus conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , parmi ces souches, on trouve :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *E. coli*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines.

Au LA-RD à l'hôpital Robert Debré, les souches sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une pièce dédiée. Plusieurs collections de souches humaines sont ainsi disponibles depuis 1987 :

- Les souches de *E. coli* responsables de SHU de l'enfant.
- Les souches de *E. coli* responsables de méningites néonatales.
- Les souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires de l'enfant.

#### A2.3.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS ET LA-RD

Concernant le diagnostic des EHEC : un article a été rédigé en 2008 par Santé publique France et le CNR-ECS-LA (Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Filliol I, Vaillant V et de Valk H. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : Aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue Francophone des Laboratoires. Mars 2008, n°400, p59-65). Cet article, toujours d'actualité permet aux laboratoires d'avoir toutes les informations et le schéma d'isolement concernant la détection des souches STEC.

Un autre article de référence est paru en janvier 2013 rédigé par le CNR-ESS (Gouali M et Weill FX) : Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. Jan 2013, Volume 42, N°1. 68-75). Cet article a l'avantage de rappeler les caractéristiques, la pathogénie, l'épidémiologie et les méthodes de diagnostic des infections à EHEC.

Désormais, l'expertise des *E. coli* nécessite une analyse du génome.

# ANNEXE supplémentaire

Courrier adressé par le CNR-ESS à l'ensemble de ses laboratoires collaborateurs en 2017



Centre National de Référence  
*Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*

Unité des  
Bactéries Pathogènes Entériques

Dr François-Xavier Weill  
Dr Simon Le Hello  
Dr Sophie Lefèvre

Paris, le 24 mars 2017

Aux laboratoires participant à la surveillance nationale  
des infections à *E. coli* entéro-hémorragiques

## LETTRE D'INFORMATION URGENTE

**Objet:** Réorganisation des activités du Centre National de Référence (CNR-IP) et de son Laboratoire Associé (LA-RD) pour les activités *Escherichia coli*.

Chers/Chères collègues,

Conformément à l'arrêté du 7 mars 2017 fixant la liste des CNR-LA pour la période du 1er avril 2017 au 31 mars 2022 et à l'arrêté du 16 juin 2016 fixant leurs cahiers des charges, l'activité de surveillance des infections à *E. coli* entéro-hémorragiques/*E. coli* producteur de Shiga-toxines (EHEC/STEC) sera réorganisée de la façon suivante:

- **L'arrêt définitif de la sérologie des EHEC.** Cette technique à visée épidémiologique n'était pas valide pour le diagnostic. Le CNR n'a pas connaissance à l'heure actuelle d'autres laboratoires réalisant cette sérologie.
- **L'isolement et l'identification des EHEC sur souches et sur prélèvements biologiques,** et ce quel que soit l'âge du patient (adulte ou enfant), **seront désormais exclusivement réalisés sur le site du LA-RD:** service de microbiologie, Hôpital Robert Debré, 48 boulevard Sérurier, 75019 Paris cedex 19.  
Courriel : [e.coli@aphp.fr](mailto:e.coli@aphp.fr)  
**RAPPEL:** les échantillons devront obligatoirement être accompagnés de la fiche de renseignement téléchargeable sur <http://cnr-escherichiacoli-robertdebre.aphp.fr/>
- les souches de STEC du LA-RD seront ensuite envoyées au **CNR-IP pour séquençage complet du génome.**

**Afin d'assurer cette transition, l'activité d'isolement et d'identification des EHEC/STEC chez l'adulte, sera maintenue temporairement au CNR-IP jusqu'au 1<sup>er</sup> mai 2017.**

Pour toute demande concernant les autres pathovars entériques de *E. coli*, l'analyse se fera après entente préalable avec le CNR-IP ([colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr)) ou le LA-RD ([e.coli@aphp.fr](mailto:e.coli@aphp.fr)).

Concernant les activités *Shigella* et *Salmonella*, de *E. coli* responsable de méningite, l'activité reste inchangée avec l'identification gratuite des souches bactériennes sous réserve d'avoir toutes les informations épidémiologiques. Les fiches sont téléchargeables à:

[https://www.pasteur.fr/sites/default/files/ficheinfosshigella\\_sep\\_2016.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/ficheinfosshigella_sep_2016.pdf)  
[https://www.pasteur.fr/sites/default/files/ficheinfosalmonellasept\\_2016.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/ficheinfosalmonellasept_2016.pdf)  
<http://cnr-escherichiacoli-robertdebre.aphp.fr/>

Nous restons à votre disposition pour tous renseignements complémentaires à [colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr), [salmonella@pasteur.fr](mailto:salmonella@pasteur.fr) et [e.coli@aphp.fr](mailto:e.coli@aphp.fr).

Confraternellement,

Les biologistes du CNR *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* et de son Laboratoire Associé

25-28, rue du Docteur Roux - 75724 Paris Cedex 15  
Téléphone secrétariat : +33 (0)1 45 68 83 39 - Téléphone responsables : +33 (0)1 45 68 83 44 / +33 (0)1 40 61 37 24 - Télécopie : +33 (0)1 45 68 88 37

Droit d'accès et de rectification auprès du Centre National de Référence, loi du 06 janvier 1978



# Multinational outbreak of travel-related *Salmonella* Chester infections in Europe, summers 2014 and 2015

L Fonteneau<sup>1,2</sup>, N Jourdan Da Silva<sup>1</sup>, L Fabre<sup>3</sup>, P Ashton<sup>4</sup>, M Torpdahl<sup>5</sup>, L Müller<sup>5</sup>, B Bouchrif<sup>6</sup>, A El Boulani<sup>7</sup>, E Valkanou<sup>8</sup>, W Mattheus<sup>9</sup>, I Friesema<sup>10</sup>, S Herrera Leon<sup>11</sup>, C Varela Martínez<sup>12</sup>, J Mossong<sup>13</sup>, E Severi<sup>14</sup>, K Grant<sup>4</sup>, F Weill<sup>3</sup>, CM Gossner<sup>14</sup>, S Bertrand<sup>9</sup>, T Dallman<sup>4</sup>, S Le Hello<sup>3</sup>

1. Santé publique France, the French national public health agency, Saint-Maurice, France
2. European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden
3. Institut Pasteur, French National Reference Center for *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*, Paris, France
4. Public Health England, Gastrointestinal Bacterial Reference Unit, London, England
5. Statens Serum institut (SSI), Denmark
6. Institut Pasteur du Maroc, Sécurité alimentaire et environnement, Casablanca, Morocco
7. University Ibn Zohr, LBVRN, Agadir, Morocco
8. NRL Salmonella & AMR, Veterinary Laboratory of Chalkida, Greece
9. NRL Salmonella, Institute of Public Health, Belgium
10. Netherlands National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), the Netherlands
11. National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Spain.
12. Instituto de Salud Carlos III, CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain
13. Laboratoire National de Santé, Luxembourg
14. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden
15. School of Public Health and Primary Care (CAPHRI), Maastricht University Medical Center (MUMC+), Maastricht, the Netherlands

**Correspondence:** Simon Le Hello (slehello@pasteur.fr) and Nathalie Jourdan-Da Silva (Nathalie.JOURDAN-DASILVA@santepubliquefrance.fr)

## Citation style for this article:

Fonteneau L, Jourdan Da Silva N, Fabre L, Ashton P, Torpdahl M, Müller L, Bouchrif B, El Boulani A, Valkanou E, Mattheus W, Friesema I, Herrera Leon S, Varela Martínez C, Mossong J, Severi E, Grant K, Weill F, Gossner CM, Bertrand S, Dallman T, Le Hello S. Multinational outbreak of travel-related *Salmonella* Chester infections in Europe, summers 2014 and 2015. *Euro Surveill.* 2017;22(7):pii=30463. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.7.3046>

Article submitted on 07 July 2016 / accepted on 06 February 2017 / published on 16 February 2017

Between 2014 and 2015, the European Centre for Disease Prevention and Control was informed of an increase in numbers of *Salmonella enterica* serotype Chester cases with travel to Morocco occurring in six European countries. Epidemiological and microbiological investigations were conducted. In addition to gathering information on the characteristics of cases from the different countries in 2014, the epidemiological investigation comprised a matched case–case study involving French patients with salmonellosis who travelled to Morocco that year. A univariate conditional logistic regression was performed to quantify associations. The microbiological study included a whole genome sequencing (WGS) analysis of clinical and non-human isolates of *S. Chester* of varied place and year of isolation. A total of 162 cases, mostly from France, followed by Belgium, the Netherlands, Spain, Denmark and Sweden were reported, including 86 (53%) women. The median age per country ranged from 3 to 38 years. Cases of *S. Chester* were more likely to have eaten in a restaurant and visited the coast of Morocco. The results of WGS showed five multilocus sequence types (ST), with 96 of 153 isolates analysed clustering into a tight group that corresponded to a novel ST, ST1954. Of these 96 isolates, 46 (48%) were derived from food or patients returning from Morocco

and carried two types of plasmids containing either *qnrS1* or *qnrB19* genes. This European-wide outbreak associated with travel to Morocco was likely a multi-source outbreak with several food vehicles contaminated by multidrug-resistant *S. Chester* strains.

## Introduction

Non-typhoidal *Salmonella* infections are the most common cause of reported food-borne outbreaks in the European Union (EU) [1,2]. These infections mostly cause mild disease (gastroenteritis), however life-threatening infections (e.g. bacteraemia) may occur, particularly in cases involving patients at the extremes of age or who are immunocompromised. Due to the large animal reservoir, including farm animals, pets and wild animals, *Salmonella* is mainly transmitted by consumption of contaminated food and to a lesser extent by contaminated environments, contact with animals, or person-to-person [3]. The mean incubation period is between 1 and 3 days. More than 2,500 serotypes of the genus *Salmonella* have been described so far [4].

Of these, serotype Chester is not commonly identified through human surveillance. Between 2009 and 2013, EU and European Economic Area (EU/EEA) countries



# MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012

Marie-Léone Vignaud<sup>1</sup>, Emeline Cherchame<sup>1</sup>, Muriel Marault<sup>1</sup>, Emilie Chaing<sup>1</sup>, Simon Le Hello<sup>2</sup>, Valerie Michel<sup>3</sup>, Nathalie Jourdan-Da Silva<sup>4</sup>, Renaud Lailier<sup>1</sup>, Anne Brisabois<sup>1</sup> and Sabrina Cadel-Six<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giovanna Suzzi,  
University of Teramo, Italy

### Reviewed by:

Hong Du,  
Soochow University, China  
Burkhard Malorny,  
Federal Institute for Risk Assessment,  
Germany

### \*Correspondence:

Sabrina Cadel-Six  
sabrina.cadelsix@anses.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 23 December 2016

**Accepted:** 13 February 2017

**Published:** 27 February 2017

### Citation:

Vignaud M-L, Cherchame E,  
Marault M, Chaing E, Le Hello S,  
Michel V, Jourdan-Da Silva N,  
Lailier R, Brisabois A and  
Cadel-Six S (2017)  
MLVA for *Salmonella enterica* subsp.  
*enterica* Serovar Dublin: Development  
of a Method Suitable  
for Inter-Laboratory Surveillance  
and Application in the Context of a  
Raw Milk Cheese Outbreak in France  
in 2012. *Front. Microbiol.* 8:295.  
doi: 10.3389/fmicb.2017.00295

<sup>1</sup> Université PARIS-EST, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort, France, <sup>2</sup> French National Reference Center for *E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, <sup>3</sup> Department of Dairy Products, Center of Expertise for the Food Industry, La Roche-sur-Foron, France, <sup>4</sup> French National Public Health Agency, Saint-Maurice, France

*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Dublin (S. Dublin) figures among the most frequently isolated *Salmonella* strains in humans in France. This serovar may affect production and animal health mainly in cattle herds with corresponding high economic losses. Given that the current gold standard method, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), provides insufficient discrimination for epidemiological investigations, we propose a standard operating procedure in this study for multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) of *S. Dublin*, suitable for inter-laboratory surveillance. An *in silico* analysis on the genome of *S. Dublin* strains CT\_02021853 was performed to identify appropriate microsatellite regions. Of 21 VNTR loci screened, six were selected and 401 epidemiologically unrelated and related strains, isolated from humans, food and animals were analyzed to assess performance criteria such as typeability, discriminatory power and epidemiological concordance. The MLVA scheme developed was applied to an outbreak involving *Saint-Nectaire* cheese for which investigations were conducted in France in 2012, making it possible to discriminate between epidemiologically related strains and sporadic case strains, while PFGE assigned only a single profile. The six loci selected were sequenced on a large set of strains to determine the sequence of the repeated units and flanking regions, and their stability was evaluated *in vivo* through the analysis of the strains investigated from humans, food and the farm environment during the outbreak. The six VNTR selected were found to be stable and the discriminatory power of the MLVA method developed was calculated to be 0.954 compared with that for PFGE, which was only 0.625. Twenty-four reference strains were selected from the 401 examined strains in order to represent most of the allele diversity observed

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing

Manal Mohammed<sup>1\*</sup>, Simon Le Hello<sup>2</sup>, Pimlapas Leekitcharoenphon<sup>3</sup> and Rene Hendriksen<sup>3</sup>

## Abstract

**Background:** *Salmonella enterica* serovar Dublin is a zoonotic infection that can be transmitted from cattle to humans through consumption of contaminated milk and milk products. Outbreaks of human infections by *S. Dublin* have been reported in several countries including high-income countries. A high proportion of *S. Dublin* cases in humans are associated with invasive disease and systemic illness. The genetic basis of virulence in *S. Dublin* is not well characterized.

**Methods:** Whole genome sequencing was applied to a set of clinical invasive and non-invasive *S. Dublin* isolates from different countries in order to characterize the putative genetic determinants involved in the virulence and invasiveness of *S. Dublin* in humans.

**Results:** We identified several virulence factors that form the bacterial invasome and may contribute to increasing bacterial virulence and pathogenicity including mainly Gifsy-2 prophage, two different type 6 secretion systems (T6SSs) harbored by *Salmonella* pathogenicity islands; SPI-6 and SPI-19 respectively and virulence genes; *ggt* and *PagN*. Although Vi antigen and the virulence plasmid have been reported previously to contribute to the virulence of *S. Dublin* we did not detect them in all invasive isolates indicating that they are not the main virulence determinants in *S. Dublin*.

**Conclusion:** Several virulence factors within the genome of *S. Dublin* might contribute to the ability of *S. Dublin* to invade humans' blood but there were no genomic markers that differentiate invasive from non-invasive isolates suggesting that host immune response play a crucial role in the clinical outcome of *S. Dublin* infection.

**Keywords:** *Salmonella* Dublin, Virulence, SPI-6, SPI-19, T6SS, Vi antigen, *PagN*, *Ggt*, Gifsy-2

## Background

Salmonellosis is one of the most common foodborne diseases worldwide. *Salmonella enterica* (*S. enterica*) causes a huge global burden of morbidity and mortality in humans. It is estimated that *Salmonella* serovars responsible for typhoid fever kill over 250,000 humans each year [1] while non-typhoidal *Salmonella* (NTS) serovars that are responsible for diarrhoeal illness cause 155,000 deaths annually [2]. Moreover, NTS might have adapted to cause invasive disease and systemic infections in humans; children, the elderly and immunocompromised and it is estimated that 680,000 people die every year as a result of infection by invasive NTS (iNTS) [3].

The most predominant iNTS serovars associated with systemic illness in humans are *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* and *S. Dublin* [4, 5]. *S. Dublin* is specifically adapted to cattle [6] thus, people can be infected through contact with infected animals or consumption of contaminated food including raw milk and raw-milk cheese. Outbreaks of human *S. Dublin* infection have been reported in some European countries including Ireland and France [7, 8].

Several virulence factors have been identified within the human adapted serovars Typhi and Paratyphi [9, 10]. On the other hand, little is known about the molecular basis of virulence in iNTS more specifically *S. Dublin*. Our understanding of the genetic basis of invasiveness in *S. Dublin* is skewed by the fact that most studies have focused on the most common iNTS; *S. Typhimurium* in particular the highly invasive multidrug-resistant (MDR)

\* Correspondence: m.mohammed1@westminster.ac.uk

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Westminster, London, UK

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

RESEARCH ARTICLE

# The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008-2015

Laura M. F. Kuijpers<sup>1,2\*</sup>, Thong Phe<sup>3</sup>, Chhun H. Veng<sup>3</sup>, Krui Lim<sup>3</sup>, Sovann Ieng<sup>3</sup>, Chun Kham<sup>3</sup>, Nizar Fawal<sup>4</sup>, Laetitia Fabre<sup>4</sup>, Simon Le Hello<sup>4</sup>, Erika Vlieghe<sup>1,5</sup>, François-Xavier Weill<sup>4</sup>, Jan Jacobs<sup>1,2</sup>, Willy E. Peetermans<sup>6</sup>

**1** Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, **2** Department of Microbiology & Immunology, KU Leuven, Leuven, Belgium, **3** Sihanouk Hospital Center of HOPE, Phnom Penh, Cambodia, **4** Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, **5** Department of General Internal Medicine, Infectious diseases and Tropical Medicine, University Hospital Antwerp, Antwerp, Belgium, **6** Department of Internal Medicine, University Hospital Leuven, Leuven, Belgium

\* [kuijpers@itg.be](mailto:kuijpers@itg.be)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Kuijpers LMF, Phe T, Veng CH, Lim K, Ieng S, Kham C, et al. (2017) The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008-2015. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005964. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005964>

**Editor:** Thomas C Darton, Oxford University Clinical Research Unit Vietnam, VIET NAM

**Received:** April 21, 2017

**Accepted:** September 14, 2017

**Published:** September 20, 2017

**Copyright:** © 2017 Kuijpers et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Short-read sequences have been deposited to the European Nucleotide Archive (ENA) (<http://www.ebi.ac.uk/ena>), under study accession number PRJEB19906 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB19906>).

**Funding:** The surveillance of bloodstream infections at the Sihanouk Hospital Center of HOPE is supported by the Belgian Directorate of Development Cooperation (DGD)

## Abstract

### Background

Enteric fever remains a major public health problem in low resource settings and antibiotic resistance is increasing. In Asia, an increasing proportion of infections is caused by *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A, which for a long time was assumed to cause a milder clinical syndrome compared to *Salmonella enterica* serovar Typhi.

### Methodology

A retrospective chart review study was conducted of 254 unique cases of blood culture confirmed enteric fever who presented at a referral adult hospital in Phnom Penh, Cambodia between 2008 and 2015. Demographic, clinical and laboratory data were collected from clinical charts and antibiotic susceptibility testing was performed. Whole genome sequence analysis was performed on a subset of 121 isolates.

### Results

One-hundred-and-ninety unique patients were diagnosed with *Salmonella* Paratyphi A and 64 with *Salmonella* Typhi. In the period 2008–2012, *Salmonella* Paratyphi A comprised 25.5% of 47 enteric fever cases compared to 86.0% of 207 cases during 2013–2015. Presenting symptoms were identical for both serovars but higher median leukocyte counts ( $6.8 \times 10^9/L$  vs.  $6.3 \times 10^9/L$ ;  $p = 0.035$ ) and C-reactive protein (CRP) values (47.0 mg/L vs. 36 mg/L;  $p = 0.034$ ) were observed for *Salmonella* Typhi infections. All but one of the *Salmonella* Typhi isolates belonged to haplotype H58 associated with multidrug resistance (MDR) (*i.e.* resistance to ampicillin, chloramphenicol and co-trimoxazole).; 42.9% actually displayed MDR compared to none of the *Salmonella* Paratyphi A isolates. Decreased ciprofloxacin susceptibility (DCS) was observed in 96.9% (62/64) of *Salmonella* Typhi isolates versus



# Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study

Alicia Tran-Dien, Simon Le Hello, Christiane Bouchier, François-Xavier Weill

## Summary

**Background** Ampicillin, the first semi-synthetic penicillin active against Enterobacteriaceae, was released onto the market in 1961. The first outbreaks of disease caused by ampicillin-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium were identified in the UK in 1962 and 1964. We aimed to date the emergence of this resistance in historical isolates of *S enterica* serotype Typhimurium.

**Methods** In this retrospective, whole-genome sequencing study, we analysed 288 *S enterica* serotype Typhimurium isolates collected between 1911 and 1969 from 31 countries on four continents and from various sources including human beings, animals, feed, and food. All isolates were tested for antimicrobial drug susceptibility with the disc diffusion method, and isolates shown to be resistant to ampicillin underwent resistance-transfer experiments. To provide insights into population structure and mechanisms of ampicillin resistance, we did whole-genome sequencing on a subset of 225 isolates, selected to maximise source, spatiotemporal, and genetic diversity.

**Findings** 11 (4%) of 288 isolates were resistant to ampicillin because of acquisition of various  $\beta$  lactamase genes, including *bla*<sub>TEM-17</sub> carried by various plasmids, including the virulence plasmid of *S enterica* serotype Typhimurium. These 11 isolates were from three phylogenomic groups. One isolate producing TEM-1  $\beta$  lactamase was isolated in France in 1959 and two isolates producing TEM-1  $\beta$  lactamase were isolated in Tunisia in 1960, before ampicillin went on sale. The vectors for ampicillin resistance were different from those reported in the strains responsible for the outbreaks in the UK in the 1960s.

**Interpretation** The association between antibiotic use and selection of resistance determinants is not as direct as often presumed. Our results suggest that the non-clinical use of narrow-spectrum penicillins (eg, benzylpenicillin) might have favoured the diffusion of plasmids carrying the *bla*<sub>TEM-1</sub> gene in *S enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s.

**Funding** Institut Pasteur, Santé publique France, the French Government's Investissement d'Avenir programme, the Fondation Le Roch-Les Mousquetaires.

## Introduction

In May, 2015, the 68th World Health Assembly endorsed a global action plan to tackle antimicrobial resistance,<sup>1</sup> a global public health issue for the 21st century. The discovery and commercialisation of so-called sulfa drugs (eg, sulfonamidochrysoidine and sulfanilamide) 80 years ago opened up a new era in the fight against bacterial infections.<sup>2</sup> These synthetic bacteriostatic antibiotics were hailed as magic bullets or wonder drugs, but were rapidly eclipsed by penicillin, a natural bactericidal substance from *Penicillium rubrum* that had been discovered earlier (1928) but had not gone into mass production until World War 2.<sup>2</sup> In his landmark paper, Alexander Fleming noted that, unlike Gram-positive bacteria, the bacteria of the “coli-typhoid” group were not sensitive to penicillin.<sup>3</sup> The first penicillin drug to be active against Enterobacteriaceae was ampicillin, a broad-spectrum semi-synthetic derivative of 6-aminopenicillanic acid that was commercialised by Beecham Research Laboratories under the name Penbritin in 1961.<sup>4,5</sup>

The first report to describe  $\beta$  lactamases encoded by R factors (plasmids) in Enterobacteriaceae strains with

transmissible ampicillin resistance was published in 1965.<sup>6</sup> In this report, two of the three Enterobacteriaceae strains studied were found to produce the TEM penicillinase. One of these strains, an *Escherichia coli* isolate obtained from a patient in Greece in 1963 (the strain and its  $\beta$  lactamase were named TEM after the patient's name, Temoneria),<sup>7</sup> was subsequently shown to carry the *bla*<sub>TEM-1A</sub> gene on an IncX2 plasmid about 40 kbp in size<sup>8</sup> (table 1). The second of these strains, a *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolate obtained in the UK in 1963, was also subsequently shown to carry the *bla*<sub>TEM-1A</sub> gene on an IncF plasmid that was roughly 100 kbp in size<sup>10</sup> (table 1). A third strain, *S enterica* serotype Typhimurium phage-type 1a (later reclassified as definitive phage-type [DT] 2) isolated in Brighton, UK, in 1962 produced a  $\beta$  lactamase with a substrate profile that was different from that of TEM (table 1). This strain was isolated during the first reported outbreak caused by an ampicillin-resistant strain of *S enterica* serotype Typhimurium. The outbreak occurred in the UK in the second half of 1962, at a time when several *S enterica* serotype Typhimurium DT2 isolates resistant to

Lancet Infect Dis 2017

Published Online  
November 29, 2017  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30705-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30705-3)

See Online/Comment  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30704-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30704-1)

Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (A Tran-Dien MSc, S Le Hello PharmD, F-X Weill MD) and Plate-forme Génomique (PF1) (C Bouchier PhD), Institut Pasteur, Paris, France

Correspondence to:  
Dr François-Xavier Weill, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Institut Pasteur, Paris 75724, France  
[francois-xavier.weill@pasteur.fr](mailto:francois-xavier.weill@pasteur.fr)



Disponible en ligne sur  
**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)

**Médecine et  
maladies infectieuses**

Médecine et maladies infectieuses xxx (2017) xxx–xxx

General review

## Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection

*Syndrome hémolytique et urémique secondaire à une infection à Escherichia coli producteurs de Shiga toxines*

M. Bruyand<sup>a,\*</sup>, P. Mariani-Kurkdjian<sup>b</sup>, M. Gouali<sup>c</sup>, H. de Valk<sup>a</sup>, L.A. King<sup>a</sup>, S. Le Hello<sup>c</sup>,  
S. Bonacorsi<sup>b</sup>, C. Loirat<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Santé publique France, 12, rue du Val-d'Osne, 94415 Saint-Maurice, France

<sup>b</sup> Hôpital Robert-Debré, 75019 Paris, France

<sup>c</sup> Institut Pasteur, 75724 Paris, France

Received 20 December 2016; accepted 15 September 2017

### Abstract

The leading cause of hemolytic uremic syndrome (HUS) in children is Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection, which has a major outbreak potential. Since the early 2010s, STEC epidemiology is characterized by a decline of the historically predominant O157 serogroup and the emergence of non-O157 STEC, especially O26 and O80 in France. STEC contamination occurs through the ingestion of contaminated food or water, person-to-person transmission, or contact with ruminants or their contaminated environment. The main symptom is diarrhea, which is bloody in about 60% of patients and occurs after a median incubation period of three days. Shiga toxins released by STEC induce a cascade of thrombogenic and inflammatory changes of microvascular endothelial cells. HUS is observed in 5–15% of STEC infection cases, defined by the triad of mechanical hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal injury. The diagnosis of STEC infection relies on biological screening for Shiga toxins and STEC in stools and serology. Treatment of STEC-HUS is mainly symptomatic, as no specific drug has proved effective. The effect of antibiotics in STEC infection and STEC-HUS remains debated; however, some bacteriostatic antibiotics might have a beneficial effect. Proofs of evidence of a benefit from complement blockade therapy in STEC-HUS are also lacking. Clinical and bacteriological STEC-HUS surveillance needs to be continued. Ongoing prospective studies will document the role of bacteriostatic antibiotics in STEC infection and STEC-HUS, and of complement blockade therapy in STEC-HUS.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** STEC infection; STEC-HUS prognosis; STEC-HUS treatment

### Résumé

Chez l'enfant, les infections à *Escherichia coli* producteurs de Shiga toxines (STEC) sont les principales causes de syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ces infections ont un potentiel épidémique majeur et leur épidémiologie est marquée par un déclin de la proportion d'infections à STEC O157 au profit de sérogroupes émergents, tels le O26 et le O80 en France. La contamination se fait par ingestion d'aliments ou d'eau contaminée, par transmission interhumaine ou au contact de ruminants et de leur environnement contaminé. La diarrhée, sanglante dans 60 % des cas, survient après une incubation médiane de trois jours. Les Shiga toxines sécrétées par les STEC entraînent au niveau des cellules endothéliales de la microvascularisation une cascade d'événements prothrombotiques et inflammatoires aboutissant dans 5 à 15 % des cas à un SHU, défini par la survenue d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie et d'une insuffisance rénale aiguë. Le diagnostic d'infection à STEC repose

\* Corresponding author. Santé publique France, Saint-Maurice, France.  
E-mail address: [mathias.bruyand@santepubliquefrance.fr](mailto:mathias.bruyand@santepubliquefrance.fr) (M. Bruyand).



# The Mobilome; A Major Contributor to *Escherichia coli* stx2-Positive O26:H11 Strains Intra-Serotype Diversity

Sabine Delannoy<sup>1\*</sup>, Patricia Mariani-Kurkdjian<sup>2,3,4</sup>, Hattie E. Webb<sup>5</sup>,  
Stephane Bonacorsi<sup>2,3,4</sup> and Patrick Fach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Est, ANSES, Food Safety Laboratory, Platform IdentityPath, Maisons-Alfort, France, <sup>2</sup> Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert-Debré, Service de Microbiologie, CNR Associé *Escherichia coli*, Paris, France, <sup>3</sup> Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France, <sup>4</sup> Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, <sup>5</sup> Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX, United States

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Frank T. Robb,  
University of Maryland, Baltimore,  
United States

### Reviewed by:

Zhuofei Xu,  
Huazhong Agricultural University,  
China

Tim Dallman,  
Public Health England,  
United Kingdom

Claire Jenkins,  
Public Health England,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Sabine Delannoy  
sabine.delannoy@anses.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Genomic  
Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 15 December 2016

**Accepted:** 10 August 2017

**Published:** 06 September 2017

### Citation:

Delannoy S, Mariani-Kurkdjian P,  
Webb HE, Bonacorsi S and Fach P  
(2017) The Mobilome; A Major  
Contributor to *Escherichia coli*  
stx2-Positive O26:H11 Strains  
Intra-Serotype Diversity.  
*Front. Microbiol.* 8:1625.  
doi: 10.3389/fmicb.2017.01625

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O26:H11/H- constitute a diverse group of strains and several clones with distinct genetic characteristics have been identified and characterized. Whole genome sequencing was performed using Illumina and PacBio technologies on eight stx2-positive O26:H11 strains circulating in France. Comparative analyses of the whole genome of the stx2-positive O26:H11 strains indicate that several clones of EHEC O26:H11 are co-circulating in France. Phylogenetic analysis of the French strains together with stx2-positive and stx-negative *E. coli* O26:H11 genomes obtained from Genbank indicates the existence of four clonal complexes (SNP-CCs) separated in two distinct lineages, one of which comprises the “new French clone” (SNP-CC1) that appears genetically closely related to stx-negative attaching and effacing *E. coli* (AEEC) strains. Interestingly, the whole genome SNP (wgSNP) phylogeny is summarized in the *cas* gene phylogeny, and a simple qPCR assay targeting the CRISPR array specific to SNP-CC1 (SP\_O26-E) can distinguish between the two main lineages. The PacBio sequencing allowed a detailed analysis of the mobile genetic elements (MGEs) of the strains. Numerous MGEs were identified in each strain, including a large number of prophages and up to four large plasmids, representing overall 8.7–19.8% of the total genome size. Analysis of the prophage pool of the strains shows a considerable diversity with a complex history of recombination. Each clonal complex (SNP-CC) is characterized by a unique set of plasmids and phages, including stx-prophages, suggesting evolution through separate acquisition events. Overall, the MGEs appear to play a major role in O26:H11 intra-serotype clonal diversification.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *E. coli*, STEC, stx2, Shiga toxin-producing *E. coli*, mobile genetic elements, comparative genomics, phylogenetic relationship

## INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of serotype O26:H11/H- have been recognized for several years as public health threats. Indeed, they constitute the second most frequent serotype associated with clinical *E. coli* cases worldwide (Brooks et al., 2005; Mellmann et al., 2008; Vally et al., 2012; Marejkova et al., 2013; Byrne et al., 2014; EFSA and ECDC, 2014). STEC O26 are a

CASE REPORT

Open Access



# Spondylodiscitis in a healthy 12-year-old girl with Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) bacteraemia

J. Gaschignard<sup>1,2</sup>, G. Geslain<sup>2,3\*</sup>, C. Mallet<sup>4</sup>, M. Lorrot<sup>1,2</sup>, N. Blot<sup>5</sup>, M. Alison<sup>2,6</sup> and S. Bonacorsi<sup>2,3</sup>

## Abstract

**Background:** *Escherichia coli* (*E. coli*) is rarely implicated in bone or joint infections in children.

**Case presentation:** We discuss the case of a healthy 12-year-old girl with an *E. coli* bacteraemia and a T11-T12 spondylodiscitis revealed by magnetic resonance imaging. The strain harboured serogroup O1:K1 and virulence factors common to highly virulent extra intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Immunological work-up was normal.

**Conclusion:** The identification of *E. coli* in a spondylodiscitis should lead to the search for immunosuppression of the host and virulence factors of the strain, particularly those of ExPEC.

## Background

Bone and joint infections are common in children, and spine is affected in 1–4% of cases [1]. Native vertebral osteomyelitis is often the result of hematogenous seeding of the adjacent disc space from a distant focus, as the disc is avascular. Pyogenic spondylodiscitis usually occur in young children, and the main pathogen is *Staphylococcus aureus* [2]; Gram-negative bacteria are rarely implicated in children as in adults. Among Gram-negative bacteria, *E. coli* is the most frequent in spondylodiscitis in adults [3]; the main risk factors are a pre-existing or synchronous genitourinary tract infection or an intra-abdominal infection [3, 4].

## Case presentation

A 12-year-old caucasian girl presented with a 1-day history of fever (39 °C) with right lumbar pain. She had no medical history and had never travelled outside Western Europe. There was no report of dysuria, frequent daytime urination, abdominal pain or diarrhoea. Physical examination was normal apart from a right lumbar punch. White blood cell (WBC) count was 9400/mm<sup>3</sup>, neutrophils 7600/mm<sup>3</sup> and CRP 16 mg/L. Blood and urines were collected for culture and ceftriaxone was

started for suspicion of pyelonephritis. Urinalysis was negative for leukocyte, nitrite and pyuria. Urinary culture was sterile but one blood culture was positive for an *Escherichia coli* strain susceptible to all antibiotics. Abdominal ultrasound and abdominal tomodensitometry with intravenous injection of an iodised contrast product were normal. The patient was afebrile after 48 h of ceftriaxone. C-Reactive Protein (CRP) culminated at 78 mg/L on day 2 and lowered at 12 mg/L on day 5.

However, lumbar pain persisted despite paracetamol and required morphine. A second renal ultrasound was performed and showed no sign of urinary lithiasis. A magnetic resonance imaging of the spine on day 7 revealed a T11-T12 spondylodiscitis without adjacent epidural or soft tissue inflammation (Fig. 1). No bone biopsy was attempted. It would have been considered if the clinical evolution had been unfavourable despite antibiotic treatment. A corset was prescribed and ciprofloxacin was added on day 6 to complete a 14-day course of intravenous antibiotherapy. She had minimal back pain on day 14 and was discharged with oral ciprofloxacin for another 4 weeks. She complained of arthralgia of both wrists on day 35. Physical examination was normal. Ciprofloxacin was stopped on day 42 and arthralgia resolved spontaneously.

Polymerase chain reactions (PCR) were performed to analyze *E. coli* strain, as described previously [5–7]. It harbored serogroup O1:K1 and belonged to the major

\* Correspondence: guillaumegeslain@hotmail.fr

<sup>2</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup>Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



## A combination of mecillinam and amoxicillin/clavulanate can restore susceptibility of high-level TEM-1-producing *Escherichia coli* to mecillinam

André Birgy<sup>1,2</sup>, Marine Delecourt<sup>2</sup>, Guillaume Geslain<sup>1,2</sup>, Emilie Desselas<sup>3</sup>, Marion Caseris<sup>3</sup>, Mélanie Magnan<sup>1</sup>, Patricia Mariani-Kurkdjian<sup>1,2</sup>, Philippe Bidet<sup>1,2</sup> and Stéphane Bonacorsi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>2</sup>Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France; <sup>3</sup>Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France

\*Corresponding author. E-mail: stephane.bonacorsi@aphp.fr

Received 6 February 2017; accepted 24 February 2017

**Objectives:** Mecillinam is recommended in France as a first-line treatment for lower urinary tract infections, due to the large increase in resistance of *Escherichia coli* to other oral treatments, such as co-trimoxazole or fluoroquinolones, its limited impact on faecal microbiota and its stability in the presence of numerous  $\beta$ -lactamases. However, we recently identified several mecillinam-resistant *E. coli* isolates with a high-level expression penicillinase (HEP) phenotype that merit further study.

**Patients and methods:** We studied two isogenic clinical isolates from one patient (one susceptible to mecillinam and one resistant to mecillinam) by WGS to determine the mechanism of mecillinam resistance and compared it with other mecillinam-resistant *E. coli*. We evaluated the synergistic combination of amoxicillin/clavulanate and mecillinam using a simple test, suitable for daily laboratory practice, to determine the MIC of this combination.

**Results:** We showed that the presence of an SNP in the promoter of the plasmidic TEM-1  $\beta$ -lactamase gene is sufficient to confer resistance to mecillinam. This mechanism was present in 67% of HEP-phenotype *E. coli* tested. Combining mecillinam with amoxicillin/clavulanate abolished resistance, with an MIC compatible with clinical use. This association was not sensitive to the inoculum effect, in contrast to mecillinam alone.

**Conclusions:** An HEP phenotype can confer mecillinam resistance *in vitro*. This resistance is abolished, regardless of the inoculum, by combining mecillinam with amoxicillin/clavulanate, and can be easily tested in the laboratory. This combination may be used as an oral relay treatment of non-complicated pyelonephritis due to multiresistant *E. coli* strains.

### Introduction

Mecillinam (amdinocillin) is an extended-spectrum penicillin antibiotic with a high affinity for *Escherichia coli* PBP-2. Mecillinam resistance in *E. coli* is low in Europe, ranging from 0.5% to 6.5%.<sup>1,2</sup> Mecillinam is recommended in France as a first-line treatment for uncomplicated lower urinary tract infections, because of the large increase in resistance of *E. coli* to oral treatment, including co-trimoxazole or fluoroquinolones, and its limited impact on faecal microbiota.<sup>1,3,4</sup>

Several mechanisms of mecillinam resistance have been described, such as mutations in metabolic genes or the production of certain  $\beta$ -lactamases.<sup>5</sup> However, mecillinam is more stable than other  $\beta$ -lactams in the presence of  $\beta$ -lactamases,<sup>5-7</sup> highlighted by the low resistance rate among ESBL-producing

Enterobacteriaceae (from 2.1% to 10%).<sup>6,8</sup> Nonetheless, several mecillinam-resistant *E. coli* isolates have been identified that do not produce OXA  $\beta$ -lactamase or ESBL but have a high-level expression penicillinase (HEP) phenotype.<sup>9,10</sup>

In this study, we show that the presence of an SNP in the promoter of the plasmidic TEM-1  $\beta$ -lactamase gene can confer resistance to mecillinam by comparing two isogenic isolates, one resistant to mecillinam and one susceptible to mecillinam. This resistance was abolished by the synergistic activity of the combination of mecillinam and amoxicillin/clavulanate, measured by a simple test to determine the MIC of this combination, suitable for daily laboratory practice.



# The *Escherichia coli* Serogroup O1 and O2 Lipopolysaccharides Are Encoded by Multiple O-antigen Gene Clusters

Sabine Delannoy<sup>1\*</sup>, Lothar Beutin<sup>2,3</sup>, Patricia Mariani-Kurkdjian<sup>4,5,6</sup>, Aubin Fleiss<sup>1†</sup>, Stéphane Bonacorsi<sup>4,5,6</sup> and Patrick Fach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IdentyPath Platform, Food Safety Laboratory, Anses, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France, <sup>2</sup> National Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany, <sup>3</sup> Department of Biology, Chemistry, Pharmacy, Institute for Biology - Microbiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, <sup>4</sup> CNR Associé *Escherichia coli*, Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, Paris, France, <sup>5</sup> IAME, UMR 1137, INSERM, Paris, France, <sup>6</sup> IAME, UMR 1137, University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Nora Lía Padola,  
National University of Central Buenos  
Aires, Argentina

### Reviewed by:

Charles Martin Dozois,  
Institut National de la Recherche  
Scientifique, Canada  
Roxane Piazza,  
Instituto Butantan, Brazil

### \*Correspondence:

Sabine Delannoy  
sabine.delannoy@anses.fr

### † Present Address:

Aubin Fleiss,  
Laboratory of Computational and  
Quantitative Biology, Centre National  
de la Recherche Scientifique, Institut  
de Biologie Paris-Seine, Sorbonne  
Universités, UPMC, Paris, France

**Received:** 21 November 2016

**Accepted:** 23 January 2017

**Published:** 07 February 2017

### Citation:

Delannoy S, Beutin L,  
Mariani-Kurkdjian P, Fleiss A,  
Bonacorsi S and Fach P (2017) The  
*Escherichia coli* Serogroup O1 and O2  
Lipopolysaccharides Are Encoded by  
Multiple O-antigen Gene Clusters.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:30.  
doi: 10.3389/fcimb.2017.00030

*Escherichia coli* strains belonging to serogroups O1 and O2 are frequently associated with human infections, especially extra-intestinal infections such as bloodstream infections or urinary tract infections. These strains can be associated with a large array of flagellar antigens. Because of their frequency and clinical importance, a reliable detection of *E. coli* O1 and O2 strains and also the frequently associated K1 capsule is important for diagnosis and source attribution of *E. coli* infections in humans and animals. By sequencing the O-antigen clusters of various O1 and O2 strains we showed that the serogroups O1 and O2 are encoded by different sets of O-antigen encoding genes and identified potentially new O-groups. We developed qPCR-assays to detect the various O1 and O2 variants and the K1-encoding gene. These qPCR assays proved to be 100% sensitive and 100% specific and could be valuable tools for the investigations of zoonotic and food-borne infection of humans with O1 and O2 extra-intestinal (ExPEC) or Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains.

**Keywords:** *E. coli*, extraintestinal *E. coli*, ExPEC, Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC, serotyping, O-antigen gene cluster, O-AGC

## INTRODUCTION

Strains of the *E. coli* species are currently divided into 183 O-groups (lipopolysaccharide) and 53 H-types (flagellar antigen) (Joensen et al., 2015). For many decades serotyping of O- and H-antigens and in some cases capsular (K-antigens) was the only way to classify *E. coli* which shared similarities in their fermentation reactions, hosts, virulence markers, and their pathogenicity to humans or animals (Orskov and Orskov, 1984, 1992; Edwards and Ewing, 1986). Most of the genes responsible for the biosynthesis of the O-antigen are located in a single cluster, the O-antigen gene cluster or O-AGC (Reeves et al., 1996; Iguchi et al., 2015a; DebRoy et al., 2016). The size and gene content of the O-AGC vary between serogroups, and two genes, *wzx* (O-antigen flippase) and *wzy* (O-antigen polymerase) or *wzm* (O-antigen ABC transporter permease gene) and *wzt* (ABC transporter ATP-binding gene), appear highly specific for each serogroup. These can serve as targets for molecular determination of the serogroup by PCR, qPCR or nucleotide sequencing (Iguchi et al., 2015b; Joensen et al., 2015; Fratamico et al., 2016). The conventional serotype identification,