

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Laboratoire associé au CNR
Clostridium difficile



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

* * *

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2018 Année d'exercice 2017

CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme
Christelle MAZUET, Laure DIANCOURT

Laboratoire associé *Clostridium difficile*
Frédéric BARBUT, Cécile GATEAU, Jeanne COUTURIER

SOMMAIRE

Résumé analytique (version française)	5
Résumé analytique (version anglaise).....	6
1- Missions et organisation du CNR.....	7
1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	7
1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	7
2- Activités d'expertise	8
2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2017.....	9
2-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	9
2-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	9
2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trouses	9
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2-4 Collections de matériel biologique.....	10
2-5 Activités d'expertise.....	10
2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (CNR).....	10
2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme (CNR)	11
2-5-3 Activité d'expertise sur <i>Clostridium difficile</i> (Laboratoire associé)	12
2-6 Activités de séquençage génomique (WGS, NGS...).....	12
2-6-1 CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme.....	12
2-6-1-1 Accès aux plateformes de séquençage de l'Institut Pasteur	12
2-6-1-2 Accès à une expertise bio-informatique	13
2-6-1-3 Appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique.....	13
2-6-1-4 Stockage et dépôt des données brutes	14
2-6-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	14
3- ACTIVITES DE SURVEILLANCE	14
3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	14
3-1-1 Surveillance du botulisme (CNR)	14
3-1-1-1 Réseau de partenaires	15
3-1-1-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du botulisme	15
3-1-1-3 Botulisme agro-alimentaire et environnemental	17
3-1-1-4 Botulisme animal.....	17
3-1-2 Surveillance des infections à bactéries anaérobies (CNR)	17
3-1-2-1 Souches d'origine humaine	18
3-1-2-2 Investigations de TIAC à <i>Clostridium perfringens</i>	20
3-1-2-3 Souches d'origine vétérinaire	20
3-1-2-4 Souches d'autres origines (alimentaire, industrielle, environnementale)	21
3-1-3 Surveillance des infections à <i>C. difficile</i> (Laboratoire associé)	21
3-1-3-1 Description du réseau de partenaires.....	21
3-1-3-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	23
3-2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	28
3-2-1 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR).....	28
3-2-2 Surveillance de la résistance de <i>C. difficile</i> aux anti-infectieux.....	29
3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	30
3-3-1 CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme.....	30
3-3-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	31
3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisées	31
4- Alerte	34
4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	34
4-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	34
5- Activités de Rétro-information, de formation et de conseil	35

5-1	Conseil et expertise aux professionnels de santé	35
5-1-1-1	Enseignements	35
5-1-1-2	Activités de Formations continues	36
5-1-2	Stagiaires accueillis	36
5-1-2-1	CNR Bactéries anaérobies et Botulisme	36
5-1-2-2	Laboratoire associé <i>C. difficile</i>	36
5-1-3	Liste des guides élaborés - Laboratoire associé	36
5-1-4	Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé.....	37
5-1-5	Activités de conseils aux professionnels de santé.....	37
5-2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	38
5-3	Conseil et expertise pour d'autres cibles.....	38
6-	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR..	39
6-1	TRAVAUX DE RECHERCHE.....	39
6-1-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	39
6-1-1-1	Travaux de recherche sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i>	39
6-1-1-2	Développement d'outils et investigation autour des foyers de botulisme animal	41
6-1-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	42
6-1-2-1	Etude SERODIFF : réponse immunitaire vis-à-vis de <i>C. difficile</i>	42
6-1-2-2	Etude INFLADIFF: signification clinique de la présence d'une souche toxigène de <i>C. difficile</i> dans les selles sans la présence de toxines libres.....	42
6-1-2-3	Etude EVADE : évaluation in situ de l'activité sporicide de l'Anioxyfloor	43
6-1-2-4	PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de <i>C. difficile</i> isolées dans une population de prématurés	44
6-1-2-5	Etude FOCUS : utilisation de la fidaxomicine en France.....	44
6-1-2-6	Etude QALIFF : Qualité de vie des patients infectés par <i>C. difficile</i>	45
6-1-2-7	Etude DCDiff : Surmortalité liée aux infections à <i>C. difficile</i>	46
6-1-2-8	Microbiological support to European surveillance of <i>Clostridium difficile</i> infections (2016-2018).....	46
6-1-2-9	Impact du DAV132 sur les tests diagnostiques de <i>C. difficile</i>	47
6-1-2-10	Prévalence des souches de <i>Clostridium difficile</i> productrices de toxine binaire en France	47
6-2	Publications et communications 2017.....	47
6-2-1	Publications et communications du CNR	47
6-2-1-1	Publications nationales	47
6-2-1-2	Publications dans des revues internationales à comité de lecture.....	48
6-2-1-3	Congrès, workshops, séminaires.....	48
6-2-2	Publications et communications du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	49
6-2-2-1	Publications nationales	49
6-2-2-2	Publications internationales	49
6-2-2-3	Communications nationales.....	50
6-2-2-4	Communications internationales.....	51
6-2-2-5	Conférences sur invitation	51
6-2-2-6	Autres.....	53
7-	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	53
8-	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019	54
8-1	Programme du CNR Bactéries anaérobies et botulisme	54
8-1-1	Bactériologie anaérobie	54
8-1-1-1	Expertise en bactériologie anaérobie	54
8-1-1-2	Botulisme humain	56
8-1-1-3	Botulisme animal.....	56
8-2	Programme du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	58

8-2-1	Détermination des CMI d'inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de <i>C. difficile</i> et détermination du support génétique de la résistance.....	58
8-2-2	Apport du whole genome sequencing (WGS) dans l'épidémiologie des infections à <i>Clostridium difficile</i>	58
8-2-3	COMBACTE-CDI	59
8-2-4	Evaluation de la technologie SIMOA pour la détection des toxines de <i>C. difficile</i>	60
9-	Tableaux (CNR Bactéries anaérobies et botulisme)	61
10-	Annexe 1 : Missions et organisation du CNR	74
10-1	Missions et objectifs majeurs	74
10-1-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	74
10-1-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	74
10-2	Equipes.....	74
10-2-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	74
10-2-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	75
10-3	Locaux et équipements	75
10-3-1	Locaux.....	75
10-3-1-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	75
10-3-1-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	77
10-3-2	Equipements.....	77
10-3-2-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	77
10-3-2-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	78
10-4	Collections de matériel biologique.....	79
10-4-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	79
10-4-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	80
10-5	Démarche qualité	80
10-5-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	80
10-5-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	81
11-	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR et du laboratoire associé.....	83
11-1	Liste des techniques de référence.....	83
11-1-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	83
11-1-2	Laboratoire associé <i>C. difficile</i>	84
11-2	Collection de souches et sérums de référence.....	84
11-2-1	CNR Bactéries anaérobies et botulisme	84
12-	Annexe 3 : Autres informations	86
12-1	CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme	86
12-1-1	Permanence du CNR.....	86
12-1-2	Autorisation MOT	86
12-1-3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	86
12-1-4	Résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo	86
12-1-5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N	86
12-1-6	Autres remarques à destination du comité des CNR	86
12-2	Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>.....	86
12-2-1	Permanence du laboratoire associé	86
12-2-2	Autorisation MOT	86
12-2-3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	86
12-2-4	Résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo	87
12-2-5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N	87
12-2-6	Autres remarques à destination du comité des CNR	87

RESUME ANALYTIQUE (VERSION FRANÇAISE)

Le CNR bactéries anaérobies et botulisme et le laboratoire associé *Clostridium difficile* assurent la surveillance du botulisme, des infections à *C. difficile*, ainsi que l'identification de souches de bactéries anaérobies.

En 2017, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 150 échantillons de sérum, 51 selles, 18 échantillons alimentaires et 14 prélèvements environnementaux. Cette année est marquée par un faible nombre de foyers et de cas en France : 3 foyers confirmés (plus 1 suspicion) de botulisme regroupant 4 cas (et 1 cas suspect) ont été identifiés. Le CNR a également confirmé 2 foyers à l'étranger : 1 foyer (3 cas) en Arabie Saoudite et 1 foyer (nombre de cas inconnu) en Amérique du Sud. L'ensemble des patients a été hospitalisé dont 2/3 en service de réanimation. Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (2 foyers confirmés sur 3, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour le foyer suspect bien que non confirmé). Un foyer de botulisme infantile (1 cas) a également été confirmé. Tous les foyers et cas de botulisme étaient de type B.

Le CNR a par ailleurs été réquisitionné le week-end à deux reprises cette année dans le cadre du plan BioTox (2 décès violents, simultanés inexpliqués et une suspicion de tentative d'empoisonnement).

En 2017, 252 souches de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR. Les 205 souches d'origine humaine identifiées se répartissent en 45 genres différents, 74 espèces nommées (178 souches) et 27 souches représentant de nouvelles espèces potentielles. Le séquençage NGS (next-generation sequencing) a été utilisé à l'occasion d'investigations de plusieurs TIAC à *Clostridium perfringens* survenues cette année. La comparaison génétique des différentes souches de *C. perfringens* entérotoxigènes isolées des aliments suspects et/ou des selles des patients a largement contribué à l'investigation clinique, alimentaire et épidémiologique de ces foyers. Le séquençage NGS de souches de *Propionibacterium acnes* isolées de patients opérés par un même chirurgien orthopédiste a également permis de montrer que ces souches n'étaient pas clonales.

Bien que les bactéries anaérobies restent en général sensibles aux traitements antibiotiques, le suivi de l'évolution de la résistance effectué par le CNR confirme que certaines espèces (particulièrement les *Bacteroides* du groupe *fragilis*) deviennent de plus en plus résistantes notamment aux bêta-lactamines incluant les carbapénèmes.

Clostridium difficile représente le principal entéropathogène responsable de diarrhées associées aux soins. Le laboratoire associé « *Clostridium difficile* » a pour principales missions les expertises et le développement des techniques d'identification, de typage et d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de *Clostridium difficile*, ainsi que la contribution à la surveillance et à l'alerte des infections nosocomiales et des cas groupés d'infections à *C. difficile* (ICD).

Au cours de l'année 2017, 437 prélèvements ont été reçus par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 387 correspondaient à des souches de *C. difficile* toxigènes ; 9.6% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 2 autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 014/020/077 (15,76%) et le 002 (8.01%).

L'année 2017 a été marquée par une diminution des souches 027 épidémiques reçues par le CNR. Seules 12 souches épidémiques ont été caractérisées. Elles provenaient de 6 départements. Cette diminution (en nombre) peut en partie être expliquée par l'utilisation de plus en plus importante par les laboratoires du test GeneXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive des souches 027.

RÉSUMÉ ANALYTIQUE (VERSION ANGLAISE)

The NRC anaerobic bacteria and botulism and the *Clostridium difficile* associated laboratory provide surveillance for botulism, *C. difficile* infections, and the identification of anaerobic bacterial strains.

In 2017, the CNR proceeded to the biological diagnosis of human botulism from 150 serum samples, 51 stools, 18 food samples and 14 environmental samples. This year is marked by a small number of outbreaks and cases in France: 3 confirmed outbreaks (plus 1 suspicion) of botulism *ie* 4 cases (and 1 suspected case) were identified. The NRC also confirmed 2 outbreaks abroad: 1 outbreak (3 cases) in Saudi Arabia and 1 outbreak (number of cases unknown) in South America. All patients were hospitalized including 2/3 in intensive care unit. Food-born botulism remains the most common form (2 out of 3 confirmed outbreaks, and strong suspicion of a food origin for the suspected but not confirmed one). An outbreak of infant botulism (1 case) was also confirmed. All outbreaks and cases of botulism were type B.

The NRC was also requisitioned twice at the weekend this year as part of the BioTox plan (2 violent deaths, simultaneous unexplained and a suspicion of poisoning).

In 2017, 252 strains of anaerobic bacteria were registered by NRC. The 205 strains of human origin identified fall into 45 different genera, 74 named species (178 strains) and 27 strains representing potential new species. NGS (next-generation sequencing) was used during investigations of several *Clostridium perfringens* food-poisoning outbreaks that occurred this year. Genetic comparison of different strains of enterotoxigenic *C. perfringens* isolated from suspect foods and / or stools of patients has significantly contributed to the clinical, alimentary and epidemiological investigation of these outbreaks. NGS sequencing of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from patients operated by the same orthopedic surgeon also showed that these strains were not clonal.

Although anaerobic bacteria remain generally sensitive to antibiotic treatments, the monitoring of the resistance evolution carried out by the CNR confirms that some species (particularly *Bacteroides* of the *fragilis* group) are becoming more and more resistant, particularly to beta-lactam antibiotics including carbapenems.

Clostridium difficile is the major cause of healthcare-associated diarrhea. The main objectives of National Reference Laboratory (NRL) for "*Clostridium difficile*" are expertise, development of new techniques for identifying and typing, evaluation of the susceptibility of *Clostridium difficile* strains to antimicrobials and contribution to the surveillance and control of nosocomial infections and outbreaks of *C. difficile* infection (CDI).

In 2017, 437 samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 387 *C. difficile* strains were toxigenic; 9.6% were identified as PCR-ribotype 027. The 2 other predominant PCR-ribotypes were 014/020/077 (15.76%) and 002 (8.01%).

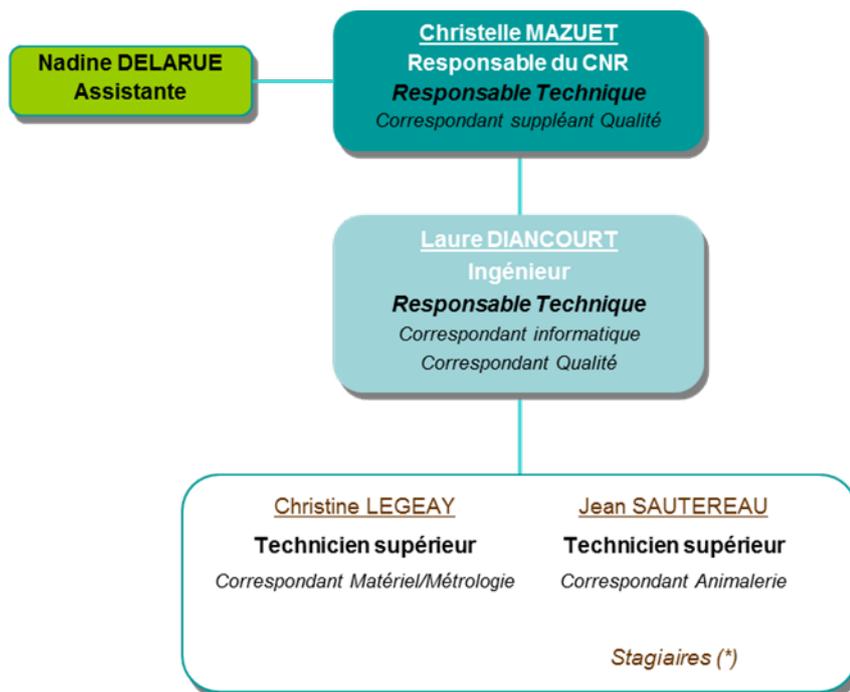
This year was marked by a decrease in epidemic 027 strains received by the NRL. Only 12 epidemic strains have been characterized. They came from 6 departments. This decrease (in number) can partly be explained by the increasing use of GeneXpert assay for *C. difficile* (Cepheid) which allows a presumptive identification of 027 strains.

1- MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

La description détaillée est présentée en **annexe 1**

Organigramme du CNR



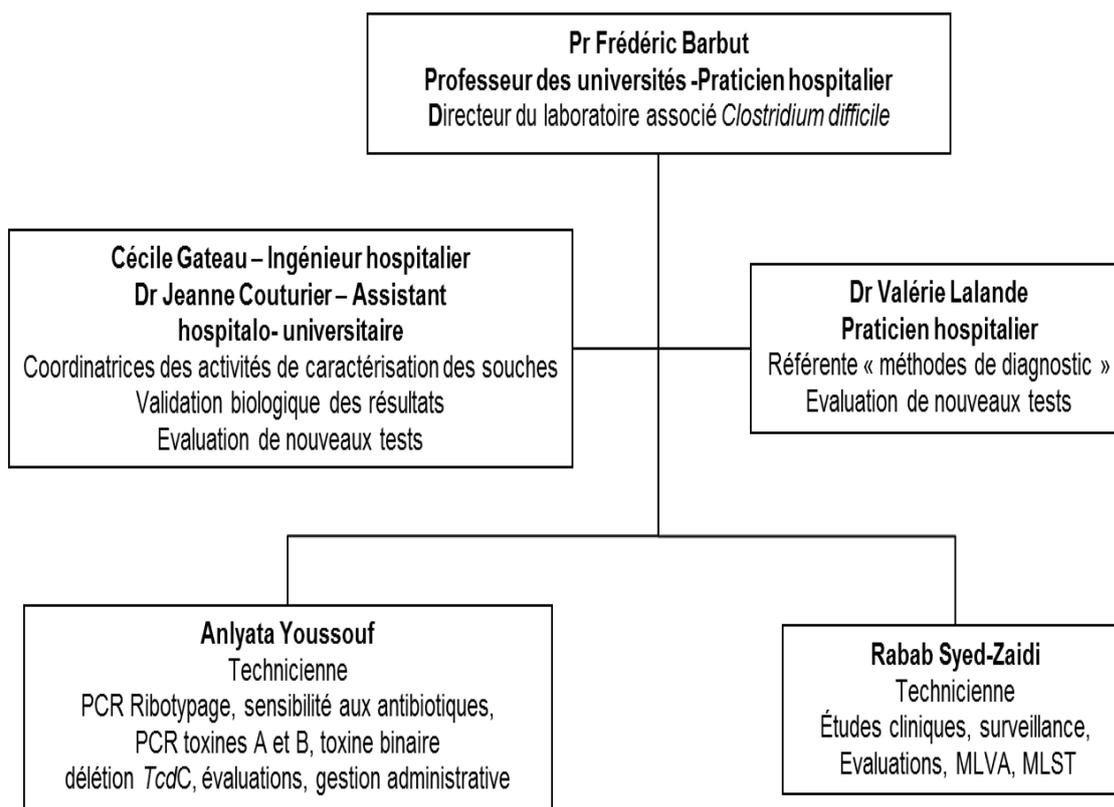
MOT : les personnes dont le nom est souligné sont habilitées MOT

(*) manipulation de MOT (après autorisation délivrée par l'ANSM) sous le contrôle du détenteur de l'autorisation MOT et selon le thème du travail.

1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

La description détaillée est présentée en **annexe 1**.

Organigramme du laboratoire associé



2- ACTIVITES D'EXPERTISE

Eléments clefs de l'année 2017 en termes de production d'expertise **CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme**

Faible de nombre de foyers/cas de botulisme
 2 foyers de botulisme à l'étranger (Arabie Saoudite et Amérique du Sud)
 2 Réquisitions judiciaires (Biotox/Piratox)
 Investigations de TIAC à *Clostridium perfringens*
 Augmentation du nombre de demande d'analyses pour « Mort inexpliquée du nourrisson

Eléments clefs de l'année 2017 en termes de production d'expertise **Laboratoire associé *Clostridium difficile***

Augmentation de +8.7% du nombre de prélèvements envoyés par rapport à l'année 2016.

Les descriptions des techniques et marqueurs disponibles ainsi que la liste des techniques recommandées sont présentées en **annexe 2**.

2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2017

2-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Des techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection et l'identification des toxines botuliques sont en cours d'évaluation et de développement.

Le séquençage du génome complet (PIBNet et Pôle Biomics) est de plus en plus utilisé pour l'identification et le typage des bactéries anaérobies en remplacement des techniques de PCR classique et de séquençage Sanger.

2-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Les souches de *Clostridium difficile* reçues au laboratoire, sont caractérisées par PCR mutliplex permettant la détection simultanée de 7 cibles (dont les principaux facteurs de virulence) : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvé chez les souches non toxigènes. Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire. La détection des fragments amplifiés se fait par électrophorèse capillaire.

La technique de PCR-ribotypage permet la détection des fragments amplifiés par PCR sur séquenceur (capillary PCR-ribotyping) (Fawley et al, PlosOne 2015, DOI :10.1371). Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire.

2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2017, plusieurs trousse diagnostiques ont été évaluées par le laboratoire associé *Clostridium difficile*

- Le test **GenePOC C.Diff (GenePOC)** sur l'instrument GenePOC qui permet de détecter la présence du gène de la toxine B de *Clostridium difficile* à partir d'échantillons de selles (2016-2017).

Soutien financier : biosynex

Le test GenePoc C. diff est une méthode génomique « point of care » pour la détection des souches toxigènes de *C. difficile* à partir de selles de patients suspects d'ICD. Les objectifs de cette étude étaient (i) d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN), y compris leurs intervalles de confiance (IC) à 95%) de GenePOC™ CDiff par rapport à la culture toxigénique et (ii) de comparer les performances du GenePOC™ CDiff à celle d'un algorithme en deux étapes basé sur la détection de la GDH (Quik chek®, Alere) suivi de la PCR (GeneXpert® CDiff, Cepheid). Un total de 308 échantillons de selles diarrhéiques consécutives provenant de patients hospitalisés reçus par le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Saint-Antoine (Paris) sur la période de janvier à mars 2017 a été inclus. La culture a été réalisée sur un milieu sélectif (ChromID CDiff, Biomérieux). Après extraction d'ADN, le statut toxigène des souches (ou culture toxigénique, CT) a été déterminé in vitro par une PCR-multiplex « maison » utilisant des amorces spécifiques pour *tpi* (triose phosphate isomérase), *tcdA* (toxine A), *tcdB* (toxine B), *cdtA*, *cdtB* (composantes de la toxine binaire), *tcdC* (gène régulateur négatif des toxines) et *lok* (caractéristiques des souches non toxigènes). Les tests GDH, GeneXpert® et GenePOC™ CDiff ont été réalisés conformément aux recommandations des fabricants. Le pourcentage d'échantillons avec une CT positive était de 11,4%. Dix-huit résultats (5,8%) étaient indéterminés (IND) (n=9) ou non-résolus (UNR) (n=9) avec GenePOC™ CDiff. Quatre résultats (1,3%) étaient de faux négatifs (n=3) ou de faux positifs (n=1) avec GenePOC™. La concordance entre le test GenePOC™ CDiff et l'algorithme GDH/GeneXpert® était de 99%. Le test GenePOC™ CDiff est un test moléculaire simple et rapide pour la détection des souches toxigéniques de *C. difficile* à partir de selles liquides ou molles. Les performances de ce test sont comparables à celles de l'algorithme en deux étapes associant screening par GDH puis PCR.

GATEAU C., COUTURIER J., LALANDE V., ECKERT C., BARBUT F.

Evaluation of a molecular assay for the detection of toxigenic Clostridium difficile isolates.

37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Paris, 18-19 décembre 2017 (Poster).

- Le test **Xpert C.difficile BT (GeneXpert, Cepheid)** permet de détecter la toxine binaire de *C. difficile* indépendamment du gène de la toxine B. L'évaluation a porté sur 155 souches appartenant à différents PCR-ribotypes.

Soutien financier : laboratoire Cepheid

Une nouvelle version du test GeneXpert a été récemment mise à disposition des laboratoires pour la détection du gène de la toxine binaire indépendamment du gène de la toxine B. Nous avons évalué ce test à partir d'une collection de 155 isolats de *C. difficile* positifs pour *cdtA* et *cdtB* et précédemment caractérisés par PCR multiplex (détection de *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC* [y compris les différents types de délétion] et *tpi*) et par PCR- ribotypage. Les souches ont été isolées chez des patients suspectés d'avoir une infection à *C. difficile*. Les résultats entre le test GeneXpert pour le gène de la toxine B, la toxine binaire et la délétion dans *tcdC* ont été comparés à ceux trouvés par nos méthodes de référence (PCR multiplex). Toutes les souches à l'exception de la souche de PCR-ribotype 033 étaient positives pour le gène *tcdB* et toutes les souches positives pour la toxine binaire ont été détectées par le test GeneXpert C. diff. La sensibilité du test pour la toxine binaire était de 100%. Cent trois souches présentaient une délétion en position 117 dans *tcdC*, ce qui a conduit à l'identification présomptive de souches 027. Ces souches comprenaient toutes les 027 épidémiques et historiques. D'autres souches appartenant aux PCR-ribotypes 056 (n = 4), 073 (n = 2), 75 (n = 1), 176 (n = 2), 244 (n = 1), FR47 (n = 2), FR49 (n = 2), FR52 (n = 1), FR95 (n = 2), FR102 (n = 1), FR108 (n = 1), FR109 (n = 1) étaient également positifs pour la délétion en position 117 et ont été identifiés à tort comme "027 presomptive". Toutes ces souches ont été séquencées et une délétion en position 117 dans *tcdC* a été confirmée.

2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

2-4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**

2-5 Activités d'expertise

2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (CNR)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés en 2017 sont donnés dans le tableau suivant :

ORIGINE	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
Humaine	205 (221)
Vétérinaire	18
Alimentaire	14
Environnementale	4
Autres (industrielle, collections, recherche...)	4
TOTAL	245 (261)

Soit une diminution de 32% par rapport à l'année précédente qui est le reflet :

- de fluctuations annuelles (une moyenne de 302 ± 71 souches ont été analysées entre 2013 et 2017)
- du transfert de l'activité « *Clostridium difficile* » vers le laboratoire associé depuis avril 2017 (début du nouveau mandat)
- du recours au Maldi-Tof des laboratoires de ville et hospitaliers pour l'identification des souches de bactéries anaérobies.

Le CNR s'est fixé pour objectif de rendre les résultats d'identification, de toxinotypage et/ou d'antibiogramme des souches humaines dans un délai maximum de 15 jours. Pour 2017, le détail du délai de rendu de résultats écrits figure dans le tableau ci-dessous.

Délais de rendu de résultats écrits:

SOUCHES HUMAINES (n=212)

	Identification et/ou toxinotypage (n=152)	Antibiogramme +/- Identification (n=60)
Réponse en 0-7 jours:	67 (44%)	38 (63%)
Réponse en 8-14 jours:	58 (38%)	18 (30%)
Réponse en 15-21 jours:	13 (8,5%)	2 (3,5%)
Réponse > 21 jours:	22 (14,5%)	2 (3,5%)

TIAC à *C.perfringens* (Selles)
Souches isolées au CNR avant caractérisation

1- Souche non repartie en subculture
2- Prélèvement contaminé (Ré isolée au CNR)

2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme (CNR)

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2017 est le suivant:

Botulisme humain		
	sérums (recherche de toxine botulique)	150
	selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>)	51
	sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	9
Echantillons agro-alimentaires		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain ou une alerte Biotox	18
	autres	53
Echantillons environnementaux		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain ou une alerte Biotox	14
	autres	14
Botulisme animal		
	échantillons biologiques	190
Echantillons d'aliment pour animaux		
	échantillons	212
TOTAL		711

Le CNR s'est fixé pour objectif de rendre les résultats écrits de diagnostic de botulisme humain dans un délai maximum de 4 jours pour la recherche de toxine botulique (sérum, selles, aliments) et de 7 jours pour la recherche de *Clostridium botulinum* (selles, aliments). Dans les faits, les résultats sont communiqués en temps réel (le plus souvent en moins de 24h) par Fax/Téléphone et/ou mail aux cliniciens : de façon systématique lorsque le diagnostic biologique de botulisme est confirmé ainsi que pour tous les patients hospitalisés en réanimation.

2-5-3 **Activité d'expertise sur *Clostridium difficile* (Laboratoire associé)**

Le tableau I présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2017 ainsi que les différentes caractérisations réalisées sur ces souches.

Le laboratoire associé rend les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours à partir de la date de réception de la souche isolée au laboratoire.

Tableau I: Activité d'expertise sur *C. difficile* et analyses effectuées sur les souches toxigènes

	2017
Nb de prélèvements reçus	437
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	410
Nb de souches toxigènes	387
Recherche du fragment A3 (%)	99.5
Recherche du fragment B1 (%)	99.5
Recherche de la toxine binaire (%)	99.5
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	99.2
Antibiogramme (%)	99.5
PCR-ribotypage (%)	100

2-6 **Activités de séquençage génomique (WGS, NGS...)**

2-6-1 **CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme**

2-6-1-1 **Accès aux plateformes de séquençage de l'Institut Pasteur**

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.

En 2017, le CNR a ainsi séquençé le génome complet d'une centaine de souches de bactéries anaérobies, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (ie séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de

gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie). A terme l'objectif est de séquencer de cette façon l'intégralité des souches de bactéries anaérobies reçues au CNR et de s'affranchir ainsi des techniques fastidieuses et chronophages de PCR classiques pour l'identification et le toxinotypage. Nous faisons cependant face pour le moment à un nombre non négligeable d'échecs de séquençage pour le genre *Clostridium* qui pourrait être dû à la technologie employée pour la préparation des banques.

Cas particulier du séquençage des Microorganismes et Toxines (MOT) : *Clostridium botulinum*, étant classé dans la liste I des MOT soumis à réglementation, le séquençage de son génome ne peut être réalisé que sur une plate-forme dont les locaux, l'activité sur le MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. C'est le cas de la Plate-Forme 1 – Génomique du pôle Biomics de l'Institut Pasteur et pour *Clostridium botulinum*.

La technologie utilisée est également de type Illumina avec accès à différentes machines : MiSeq, NextSeq 500, HiSeq. Les librairies sont réalisées avec le kit TruSeq PCRfree (Illumina). Cette collaboration comprend également l'analyse bio-informatique : extractions du gène de la neurotoxine, des gènes des protéines associées aux complexes botuliques ainsi que des gènes de maison permettant d'établir le profil MLST de la souche et d'analyser sa variabilité génétique.

En 2017, le CNR a ainsi séquençé le génome complet de 70 souches de *Clostridium botulinum*.

2-6-1-2 *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. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et 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.

Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNR fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

Le CNR utilise la suite CLC Genomics Workbench et le logiciel BioNumerics v7.6 pour l'analyse des séquences et la recherche des gènes d'intérêt. Des outils maison sont également utilisés pour réaliser certaines recherches (récupération des gènes codant pour les ARN 16S, 5S et 23S ; réorganisation des contigs le long d'un génome de référence).

2-6-1-3 *Appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique*

Depuis 2014, tous les génomes des souches de *Clostridium botulinum* isolées des prélèvements biologiques, alimentaires ou environnementaux sont systématiquement entièrement séquencées pour chaque foyer de botulisme humain à des fins d'investigations de l'épidémie. D'autres souches de *Clostridium botulinum* issues de foyers plus anciens ou d'autres sources sont également séquencées à des fins épidémiologiques et de surveillance/connaissance des souches circulant en France.

Ainsi en 2017, 10 souches de *Clostridium botulinum* ont été entièrement séquencées dans le cadre d'investigations de foyers de botulisme et 60 à des fins épidémiologiques.

En 2017 également, nous avons eu recours au séquençage génomique de souches de *Clostridium perfringens* dans le cadre d'investigations de TIAC ou de *Propionibacterium acnes* isolées

de patients opérés par le même chirurgien. Dans ce dernier cas, une analyse de type MLST a permis de montrer que les souches étaient génétiquement différentes.

2-6-1-4 *Stockage et dépôt des données brutes*

Les données brutes ainsi que les assemblages sont stockés dans un répertoire sécurisé géré par la DSI de l'Institut Pasteur. Elles sont déposées, avec les métadonnées associées, sur le site du NCBI lorsque celles-ci font l'objet ou partie d'une publication.

2-6-2 *Laboratoire associé Clostridium difficile*

En 2017, un partenariat a été signé avec les laboratoires bioMérieux pour évaluer une méthode d'analyse des souches par cg-MLST (EpiSeq V2.0). Nous avons débuté le séquençage (NGS) d'environ 150 souches de *C. difficile* dans le but :

- D'évaluer le pouvoir discriminant du cg-MLST à partir d'une collection de souches de *C. difficile* déjà caractérisées au niveau du Centre National de Référence et appartenant aux PCR-ribotypes les plus fréquents.
- D'investiguer une épidémie de *C. difficile* de PCR-ribotype 018 (PCR-ribotype peu fréquent) survenue dans un hôpital de l'Est de la France pour étudier le lien de clonalité entre ces souches. Celles-ci seront caractérisées par SNP (WGS-SNP) et cg-MLST à l'aide du programme EpiSeq V2.0 (BioMérieux). L'analyse de ces souches sera comparée à des souches de même PCR-ribotype isolées dans d'autres établissements de santé (donc non épidémiologiquement reliées). Cette étude permettra d'évaluer la pertinence de la phylogénie basée sur le cg-MLST.
- Déterminer la fréquence de transmission des souches de *C. difficile* dans un CHU en caractérisant systématiquement toutes les souches isolées sur une année par cg-MLST et en analysant les résultats en fonction des données épidémiologiques des patients (analyse spatio-temporelle des séjours des patients). Nous nous intéresserons en particulier à la composante cryptique de la transmission (c'est-à-dire la transmission de la même souche sans lien évident spatial ou temporel entre les patients). Nous évaluerons la supériorité de discrimination de la phylogénie basée sur le cg-MLST par rapport au PCR-ribotypage, en particulier son implémentation dans l'outil EpiSeq V2.0.

3- ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3-1 *Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections*

3-1-1 *Surveillance du botulisme (CNR)*

Éléments clefs de l'année 2017 en termes de surveillance du botulisme

CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme

Faible nombre de foyers/cas de botulisme
 2 foyers de botulisme à l'étranger (Arabie Saoudite et Amérique du Sud)
 2 Réquisitions judiciaires (Biotox/Piratox)
 Investigations de TIAC à *Clostridium perfringens*
 Augmentation du nombre de demande d'analyses pour « Mort inexpiquée du nourrisson

3-1-1-1 Réseau de partenaires

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

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

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

3-1-1-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du botulisme

◆ Analyse des cas de botulisme humain en 2017

En 2017, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 150 échantillons de sérum, 51 selles, 18 échantillons alimentaires et 14 prélèvements environnementaux. Cette année est marquée par un faible nombre de foyers et de cas en France : 3 foyers confirmés (plus 1 suspicion) de botulisme regroupant 4 cas (et 1 cas suspect) ont été identifiés. Le CNR a également confirmé 2 foyers à l'étranger : 1 foyer (3 cas) en Arabie Saoudite et 1 foyer (nombre de cas inconnu) en Amérique du Sud. Tous les cas renseignés étaient hospitalisés et deux étaient en service de réanimation.

Les nombres de foyers et cas sont historiquement les plus faibles depuis les 10 dernières années :

Année	Foyers (cas) déclarés
2017	3 (4)
2016	11 (20)
2015	14 (22)
2014	4 (11)
2013	11 (19)
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)
2009	25 (10)
2008	6 (9)
2007	6 (11)

Les 3 foyers de botulisme humain confirmés cette année en France étaient de type B.

L'origine du botulisme a été retrouvée pour un seul foyer : il s'agissait d'un plat industriel de boulettes de soja commercialisé sous vide et consommé après la date de péremption. Une notion de consommation de terrine de lièvre de préparation familiale a été rapportée pour 1 autre foyer (2 cas) mais non confirmée en absence de restes d'aliments suspects à analyser. Une préparation alimentaire commerciale pour enfant conservée dans de mauvaises conditions est suspectée d'être à l'origine du 3^{ème} foyer. Une éventuelle origine environnementale du foyer de botulisme infantile n'a pas pu être confirmée par l'analyse des poussières du domicile.

Le cas de botulisme infantile concernait un nourrisson féminin de 3 mois. La toxine botulique de type B a été détectée dans les selles et une souche de *C. botulinum* de sous-type B2 a été isolée. La famille vivant à proximité d'une fabrique de carrelage, une potentielle origine environnementale de ce

cas pouvait être suspectée. L'analyse des prélèvements de poussière du domicile n'a pas révélée la présence de spores de *Clostridium botulinum* et l'origine de ce cas, comme la plupart des cas de botulisme infantile, reste inexplicée. D'autres investigations de ce type autour des cas de botulisme infantile seraient utiles et précieuses.

Les foyers de botulisme alimentaire en 2017 comprenaient :

- un foyer (2 cas) pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans les sérums des deux patients ainsi que dans un extrait de selles pour l'un des cas. Une souche de *Clostridium botulinum* a été isolée à partir de chacune des selles. Les deux souches sont génétiquement identiques, de sous type B2.

- un foyer (1 cas) avec détection de toxine botulique de type B dans le sérum, les selles et le reste de plat industriel périmé consommé par le patient. Des souches de *C. botulinum* de sous-type B2 ont été isolées à partir des selles, des restes de boulettes de soja à la tomate et au basilic ainsi qu'à la surface d'un jambon retrouvé dans la poubelle. Le séquençage des génomes complets et une analyse de leur profil MLST ont confirmés que toutes ces souches étaient identiques.

- Le botulisme a été suspecté cliniquement dans 1 foyer (1 cas), mais n'a pas été confirmé par la recherche de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* dans le sérum et/ou les 6 prélèvements de selles. Il s'agissait d'un nourrisson masculin de 10 mois, pour lequel la consommation de petits pots alimentaires industriels conservés dans de mauvaises conditions (température ambiante au lieu de 4°C) a été fortement suspectée. L'analyse de ces petits pots n'a pas mis en évidence de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* mais la présence de gaz et odeur désagréable à l'ouverture ainsi que de nombreux bacilles et quelques spores à l'examen microscopique direct. Des bacilles Gram positif anaérobies du genre *Bacillus* (*licheniformis* et *paralicheniformis*) ont été isolés et identifiés.

Diagnostic différentiel des affections avec un tableau de paralysie flasque et/ou de trouble dysautonomique

Le botulisme est de plus en plus pris en compte dans le diagnostic différentiel des paralysies flasques incluant les neuropathies auto-immunes comme le syndrome de Guillain Barré ou de Miller-Fisher, la myasthénie, ou des accidents vasculaires (AVC). L'élimination d'un éventuel botulisme lors d'un tableau clinique de paralysie flasque ou de troubles dysautonomiques tels que défaut d'accommodation ou sécheresse de la bouche est la première motivation de demande d'analyse de botulisme.

En 2017, 30 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Miller Fisher), de polyradiculonévrites chroniques, de myasthénies ou d'AVC. A la suite de nos résultats négatifs en identification de botulisme et évoquant une autre origine des paralysies et diminution des sécrétions (origine auto-immune ou autre), les analyses complémentaires menées par les laboratoires demandeurs ont permis de confirmer le deuxième diagnostic. Les demandes d'analyse de botulisme qui nous sont adressées dans le cadre d'une recherche de causes de mort inexplicée de nourrissons sont en augmentation (9 en 2017 vs 2 en 2016). Ces recherches se sont toutes révélées négatives (Tableau 9 – chapitre 9).

Recherche et titrage d'anticorps anti-toxine botulique A

La toxine botulique, essentiellement le type A, est largement utilisée dans le traitement de certaines affections neurologiques comme les dystonies. Certains sujets deviennent non-répondeurs à la toxine botulique par développement d'anticorps neutralisants (Tableau 14 – chapitre 8).

Un total de 9 échantillons de sérum a été analysé en 2017, et la présence d'anticorps neutralisants a été détectée dans un seul d'entre eux vis-à-vis de la toxine botulique A et aucun vis-à-vis de la toxine botulique B.

3-1-1-3 *Botulisme agro-alimentaire et environnemental*

Des échantillons d'aliments nous sont adressés dans le cadre de foyers avérés ou suspects de botulisme humain. Ces échantillons nous sont envoyés par les agents chargés des enquêtes d'hygiène alimentaire et appartenant aux Agences régionales de santé et Directions départementales de la protection des populations ou parfois sur réquisition de la Préfecture de Police ou du Tribunal lors d'enquête judiciaire. Occasionnellement, nous recevons des échantillons alimentaires ou environnementaux de la part d'industriels pour des contrôles de fabrication ou d'enquêtes sur le botulisme animal. Les résultats sont présentés au Tableau 10 et 11 – chapitre 9

3-1-1-4 *Botulisme animal*

Le diagnostic du botulisme animal est de plus en plus réalisé par les laboratoires vétérinaires départementaux ou régionaux ainsi que par le Laboratoire National de Référence (LNR) du botulisme aviaire de Ploufragan (ANSES) avec lequel nous collaborons étroitement. Les demandes d'analyse de botulisme animal que nous recevons proviennent de laboratoires vétérinaires départementaux ou privés et concernent essentiellement des confirmations d'examens réalisés en première intention et de typage de botulisme ou des analyses de foyers et cas litigieux. Notre rôle consiste principalement en une activité d'expertise basée sur des confirmations ou infirmations de premières analyses et de typage de botulisme. Les analyses concernant le botulisme animal sont résumées au Tableau 15 – chapitre 9

Botulisme bovin. Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2017, un total de 56 échantillons représentant 24 foyers ont été analysés principalement des échantillons de contenu intestinal, du fait que la recherche de toxine botulique dans le sérum des bovins n'est pas fiable. Le botulisme a été confirmé dans 4 foyers. Il s'agit de botulisme de type mosaïque D/C dans tous les foyers.

Botulisme des oiseaux sauvages. En France et dans toute l'Europe occidentale, les oiseaux sauvages, en particulier les canards et autres oiseaux aquatiques, paient un lourd tribut au botulisme chaque année, essentiellement en saison chaude et sèche. En 2017, un total de 20 échantillons représentant 10 foyers ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 2 foyers. Le fait marquant est que cette année encore les souches de *C. botulinum* des oiseaux sauvages correspondent toutes au type mosaïque C/D, c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D (Tableau 15). Les souches de *C. botulinum* mosaïque C/D sont distinctes de celles de type D/C retrouvées chez le bovins. Une contamination croisée entre les deux espèces ou une source environnementale commune aux deux espèces semble donc peu probable.

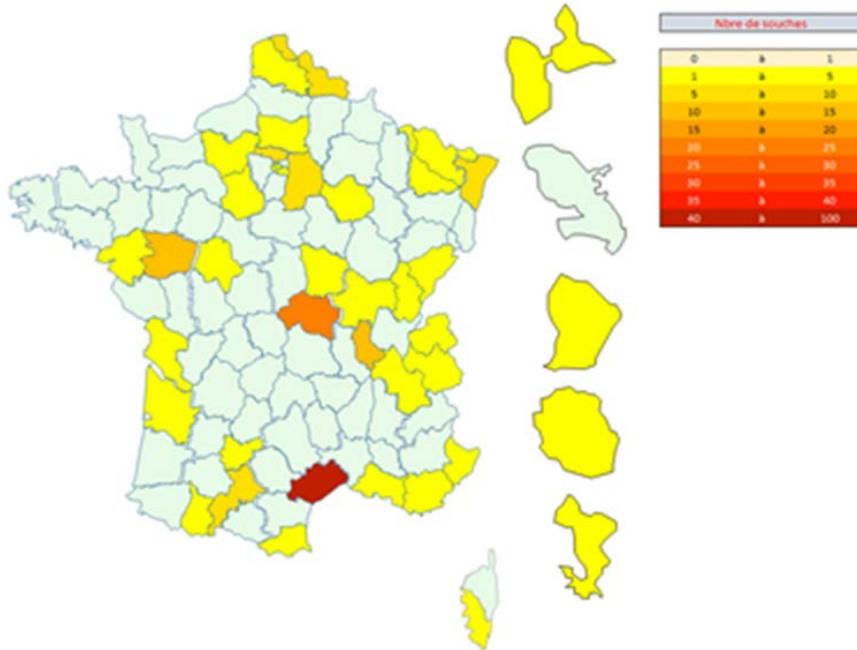
Botulisme des oiseaux d'élevage. Le botulisme est relativement fréquent ces dernières années dans les élevages industriels de volailles (poulets, dindes, canards...). Outre les pertes économiques, parfois très importantes en élevage, le botulisme aviaire représente un risque de santé humaine. En 2017, 27 échantillons provenant de 8 élevages ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 3 élevages. Le type C/D de botulisme chez les oiseaux d'élevage est identique à celui retrouvé chez les oiseaux sauvages (Tableau 15). On peut s'interroger sur une transmission possible du botulisme entre oiseaux sauvages et oiseaux d'élevage. Mais, l'apparition du botulisme des oiseaux sauvages est très saisonnière, majoritairement en période chaude, été et début d'automne, alors que le botulisme survient de façon plus continue au cours de l'année dans les élevages de volailles.

3-1-2 *Surveillance des infections à bactéries anaérobies (CNR)*

Eléments clefs de l'année 2017 en termes de surveillance des infections à bactéries anaérobies
CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme
 Investigations de TIAC à *Clostridium perfringens*
 33% des souches analysées en provenance d'un unique laboratoire

3-1-2-1 *Souches d'origine humaine*

L'origine géographique des demandes d'identification de souches d'origine humaine parvenues au CNR en 2017 est présentée ci-dessous.



Trente-sept départements métropolitains ont envoyé 212 souches au CNR parmi lesquelles 70 souches (33% du total) par les laboratoires de l'Hérault. Les départements ultra-marins envoient également des souches régulièrement pour identification (9 souches envoyées par les DROM et COM).

Entre janvier et avril 2017 (date à partir de laquelle toutes les souches de *Clostridium difficile* reçues au CNR sont renvoyées au laboratoire associé), le CNR a reçu 36 souches de *Clostridium difficile* pour identification et éventuellement toxinotypage.

Les caractéristiques des patients pour lesquels le CNR a reçu une souche sont décrits dans le tableau suivant (selon le type d'infection (CD, non CD))

	Infections non CD			Infections CD		
	Hommes	Femmes	Total	Hommes	Femmes	Total
N	111	110	221	14	22	36
Sex ratio H/F			1			0,64
Age						
moyenne	53.4	61.7	57.5	71.1	72.7	72.1
médiane	56	68	61	73	81	77.5
intervalle	0-95	0-96	0-96	0-95	26-95	0-95

NOTE : Ces chiffres sont donnés uniquement à titre indicatif (aucune analyse statistique n'a été faite).

Respect des conditions pré-analytiques (norme EN ISO15189) : envoi de la feuille de renseignements clinico-épidémiologiques par les LBM

Depuis 2010, les laboratoires correspondants du CNR remplissent très régulièrement les feuilles de renseignements devant accompagner les souches. Les informations administratives et épidémiologiques sont disponibles pour la quasi totalité des souches. Lorsque la souche n'est pas accompagnée de la feuille de renseignements, une fiche de **non-conformité** est ouverte par le CNR puis une demande est faite par téléphone ou mail auprès du LBM pour l'envoi de cette feuille. Afin de satisfaire aux exigences de la norme en ce qui concerne la transmission dématérialisée de résultats (norme ISO 15189, décret n° 2007-960 du 15.05.07), une « **convention de preuve** » est établie avec le LBM. A réception de la feuille de renseignements, la fiche de non-conformité est clôturée.

La distribution selon les sites d'infections des souches de bactéries anaérobies est présentée au Tableau 2 (chapitre 9).

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement de coprocultures (73), d'hémocultures (22), d'infections intra-abdominales (11), infections ostéo-articulaires (10), suivies par les infections cutanées et musculaires (9) et urologie/néphrologie (9). Le reste des souches provenait de différentes localisations : infections ORL (amygdales, sinus ...), infections post-opératoires, stomatologie, infections périrectales et périnéales, sperme, gynécologie... Cette année, 46 souches sur 221 prélèvements étaient non renseignées.

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté (120/252 souches soit 48%) parmi lesquelles 36 souches de *C. difficile* analysées avant avril 2017, date à laquelle toutes les souches sont prises en charge par le laboratoire associé. Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* / *Parabacteroides* / *Prevotella* / *Butyrivimonas* (21 souches), les coques à Gram + (*Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Peptococcus*, *Peptoniphilus*...) (17 souches), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*...) (5 souches), *Fusobacterium* (6 souches) et les coques à Gram négatif (*Veillonella*, *Megasphaera*, *Negativicoccus*) (5 souches.) – cf Tableau 3 (chapitre 9)

Au total les 205 souches identifiées se sont réparties en 45 genres différents de bactéries anaérobies.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 4 – chapitre 9. Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage, caractérisation de la pathogénicité et/ou identification.

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

L'augmentation exponentielle du nombre d'espèces bactériennes décrites depuis quelques années impose de plus en plus souvent le recours à l'identification par séquençage de l'ADNr 16S. C'est plus particulièrement le cas dans le groupe des bactéries anaérobies facultatives *Actinomyces* et *Bifidobacterium*, et également chez des bactéries d'origine environnementale retrouvées dans les plaies etc... (*Clostridium*...).

L'identification bactérienne a beaucoup évolué ces dernières années grâce notamment à la technique MALDI-TOF MS qui est maintenant largement répandue au niveau des plates-formes techniques des hôpitaux et des regroupements de LBM privés. Cette technique en termes de coût et de rapidité présente un grand intérêt pour la prise en charge du patient. Plusieurs fabricants se partagent le marché et de la qualité des bases de données de profils MALDI dépendent les performances de ces matériels.

Pour chaque espèce, plus le nombre de souches incluses dans ces bases est important plus la diversité de l'espèce est explorée et plus le diagnostic sera performant. Des souches peuvent ne pas être identifiées par cette technique (ci-après « échec MALDI-TOF ») soit parce que le nombre de

souches pour l'espèce est insuffisant dans la base ou soit parce que l'entrée dans la base n'existe pas (nouvelle espèce ou espèce non incluse).

Le CNR reçoit de plus en plus de souches étiquetées « échec MALDI » pour une identification précise notamment par séquençage de l'ARNr 16S.

3-1-2-2 *Investigations de TIAC à Clostridium perfringens*

Le CNR a participé activement à l'investigation microbiologique de différentes TIAC à *Clostridium perfringens* entérotoxigène en isolant notamment les souches des selles des patients et/ou des aliments et en comparant les génomes des souches. Les éléments majeurs sont résumés ci-dessous :

- Mars 2017-Drôme :

- 160 militaires partagent le même repas
- 41 malades (diarrhées, nausées, douleurs abdominales)
- Sauté de dinde incriminé

L'analyse des profils MLST (séquence de 8 gènes de ménage) des 8 souches de *C.perfringens* enterotoxigènes isolées de cette TIAC (7 isolats cliniques et un isolat alimentaire) montre que les 8 souches sont identiques.

- Avril 2017- Franche Comté

- 260 résidents EHPAD et patients du service de médecine partagent le même repas
- 47 malades (40 en EHPAD et 7 en médecine)
- Sauté d'agneau et/ou flageolets incriminés

Deux souches de *Clostridium perfringens* entérotoxigènes ont été isolées à partir de deux selles différentes (parmi 15 selles positives sur les 18 reçues).

L'analyse MLST a montré que ces deux souches étaient identiques (et différentes du foyer de la Drôme). Nous n'avons malheureusement pas pu avoir accès aux aliments.

- Juin 2017 – Haute Garonne

- 3 cas groupés dans un EHPAD
- 3 souches de *Clostridium perfringens* entérotoxigène analysées : 2 souches étaient identiques et correspondaient à une souche de type « TIAC » (ie gène de l'entérotoxine (cpe) localisé sur le chromosome). La troisième, différente des deux autres et dont le gène cpe était localisé sur un plasmide correspondait à une souche de type « cas sporadique ». Le service sécurité sanitaire des aliments de la DDPP de Haute Garonne nous a confirmé que « dans l'alimentation tout était négatif y compris pour *C.perfringens* ».

3-1-2-3 *Souches d'origine vétérinaire*

Les souches anaérobies strictes d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font toutes partie du genre *Clostridium* :

ESPECE	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	9
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	6
CLOSTRIDIUM NOVYI	1
TOTAL	18

- 11/18 sont des *Clostridium botulinum* ou *sporogenes* que nous avons isolées à partir de contenus intestinaux d'animaux atteints de botulisme.
- 6/18 sont des *Clostridium perfringens*. Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par génotypage.

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

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

3-1-2-4 *Souches d'autres origines (alimentaire, industrielle, environnementale)*

Un total de 22 souches, classées "industrielles, collections, recherche", c'est à dire non médicales et non vétérinaires, sont cette année essentiellement (20/22) des souches isolées par le CNR à partir de prélèvements alimentaires, environnementaux ou biologiques en lien avec des foyers de botulisme ou de TIAC à *Clostridium perfringens* entérotoxigène (Tableau 6 – chapitre 9). Les deux autres souches nous ont été adressées par des industriels de l'agro-alimentaire pour évaluer leur éventuelle pathogénicité. Ce sont des souches isolées d'aliments traités par la chaleur, le plus souvent des *Clostridium* thermophiles ou apparentés à *C. botulinum* qui peuvent présenter un risque de santé publique.

3-1-3 *Surveillance des infections à C. difficile (Laboratoire associé)*

Éléments clefs de l'année 2017 (en termes de surveillance)

- Au cours de l'année 2017, une épidémie de souche de PCR-ribotype (PR) 018 a été détectée au CHU de Strasbourg. (cf. partie 4 « alerte »)
- 1^{er} isolat de souche 027 épidémique en Seine Saint Denis
- nouvelles souches de *C. difficile* isolées à Cayenne : séquençage en cours

3-1-3-1 *Description du réseau de partenaires*

Le CNR des bactéries Anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur, Paris) et son laboratoire associé « *Clostridium difficile* » (Hôpital Saint-Antoine) assurent une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

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

épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours noté. Le tableau III montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (ces critères ne sont pas exclusifs).

Il est à noter que de plus en plus de laboratoires envoient des souches de *C. difficile* pour confirmation du PCR-ribotype 027 lorsque le test GeneXpert a rendu une identification présomptive 027. Ces envois permettent également de surveiller la diffusion de la souche 027 épidémique en France.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2017 (437 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	49	238	150
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	11	283	143
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	8	258	171
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	75	202	160
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	4	257	176
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	210	147	80

NR : non renseignés

La suspicion d'épidémies ou de cas groupés constitue le motif le plus fréquent d'envoi des souches au laboratoire expert pour typage (48.1% des motifs d'envoi renseignés).

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

Tableau IV : Répartition par laboratoire et par an des prélèvements reçus depuis 2008

Laboratoire	Nombre de prélèvements reçus									
	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008
CNR (Institut Pasteur)	0	0	13	14	9	22	10	4	6	4
Laboratoire associé Paris	437	266	376	427	350*	260	345	298	291	348
Laboratoire expert Nancy	0	0	18**	21	36	22	61	23	10	21
Laboratoire expert Montpellier	0	80***	59	42	31	29	30	38	27	28
Laboratoire expert Toulouse	0****	41	84	27	32	36	46	61	63	59
Laboratoire expert Rouen	0****	15	57	34	44	31	47	47	96	77
Laboratoire expert Nice	0	0	0	0	90*	64	57	80	68	80
Total	437	402	607	565	592	464	596	551	561	617

*Le laboratoire expert de Nice a cessé son activité le 20 octobre 2013, l'activité a été reprise à cette date par le laboratoire associé à Paris.

** Le laboratoire expert de Nancy a cessé son activité le 06 mai 2015, l'activité a été reprise à cette date par le laboratoire associé à Paris.

***Le laboratoire de Montpellier a cessé son activité en décembre 2016, l'activité a été reprise à cette date par le laboratoire associé à Paris.

**** Les laboratoires de Toulouse et Rouen ont cessé leurs activités en janvier 2017, l'activité a été reprise à cette date par le laboratoire associé à Paris.

3-1-3-2 *Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections*

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

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

En 2017, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient uniquement de selles (375 souches), mais dans 12 cas, l'origine du prélèvement de la souche toxigène n'était pas renseignée.

Deux cent onze souches (54.5%) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes, 173 (44.7%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 3 cas.

L'âge des patients, renseigné dans 387 cas, chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représenté sur la figure 2. **Au total, en 2017, 71.1% des patients ont plus de 65 ans** (versus 75.5% en 2016).

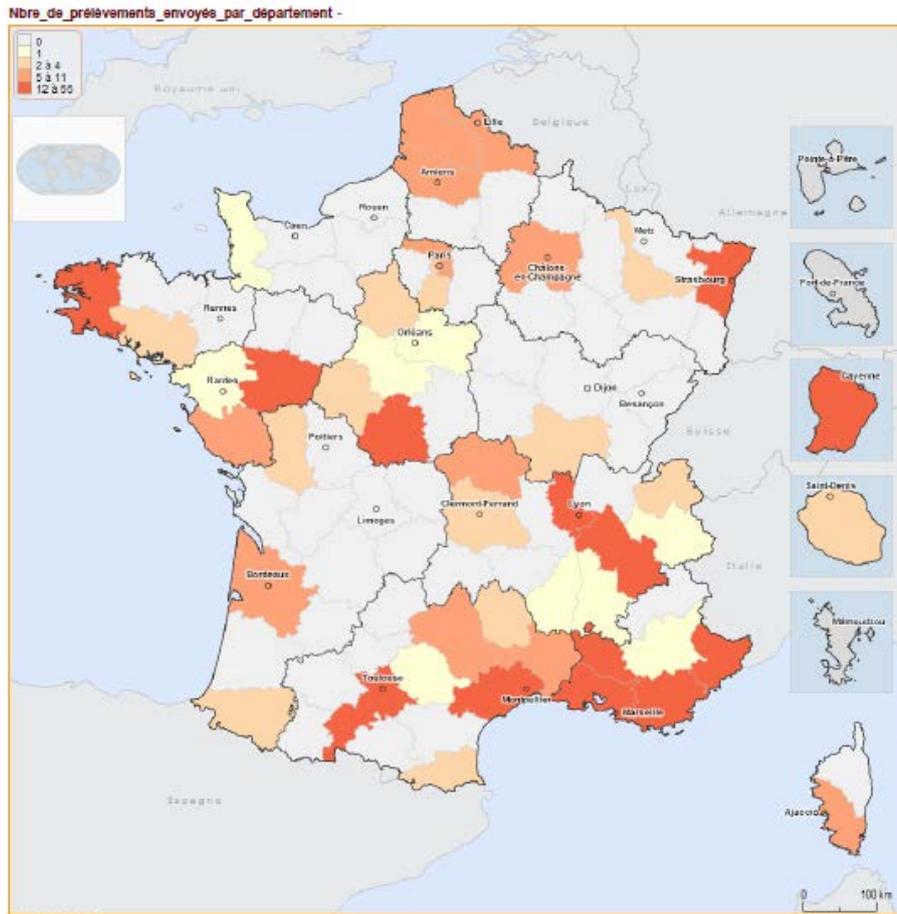


Figure 1 : Répartition des prélèvements (n=437) envoyés par département, en 2017
 A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement

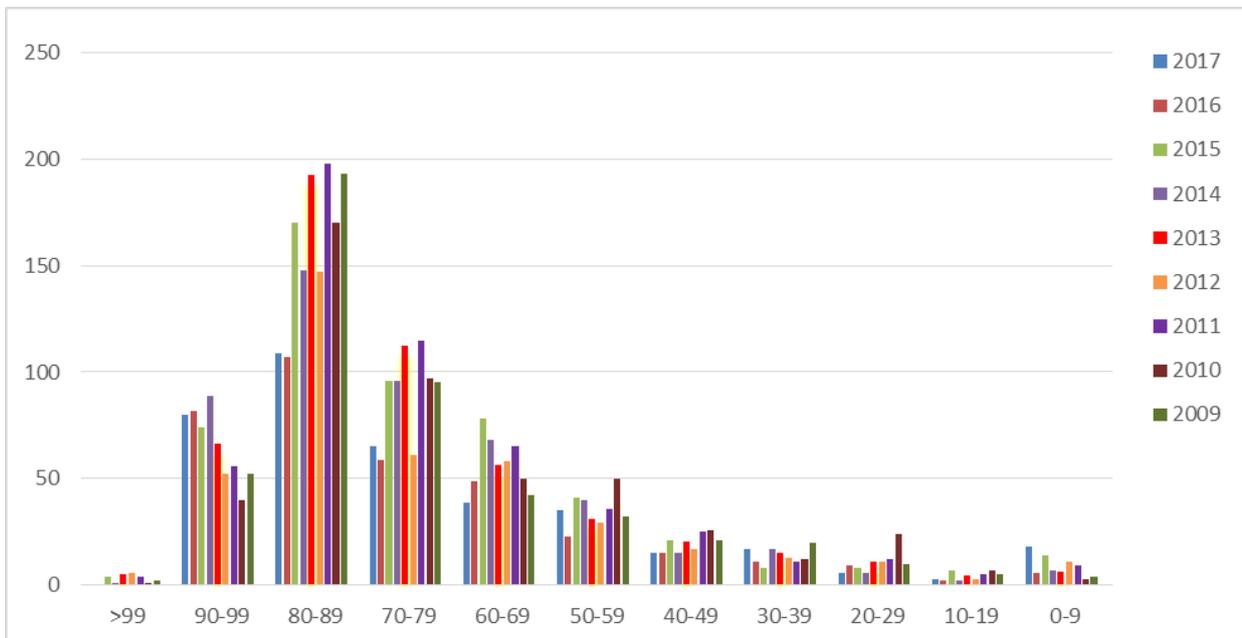


Figure 2 : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge et en fonction de l'année (2009 à 2017). Les 10 PCR ribotypes recherchés en première intention représentent 49% des souches toxigènes. Les souches 027, 014/020/077 et 002 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 33.3% des souches toxigènes (Tableau V, figure 3).

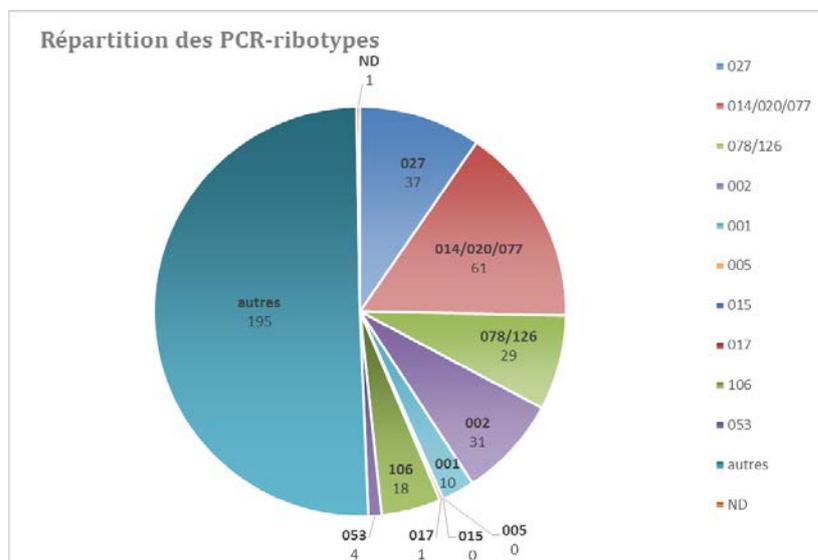
Tableau V : Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2017

PCR-ribotype*	Nombre de souches					
	2017	2016	2015	2014	2013	2012
027	37 (9,56)	60 (15,92)	75 (14,04%)	67 (13,5%)	126 (23,8%)	91 (21,7%)
014/020/077	61 (15,76)	60 (15,92)	82 (15,36%)	80 (16,1%)	92 (17,3%)	55 (13,1%)
078/126	29 (7,49)	25 (6,63)	49 (9,18%)	59 (11,9%)	46 (8,7%)	54 (12,9%)
002	31 (8,01)	23 (6,10)	27 (5,06%)	33 (6,6%)	22 (4,1%)	16 (3,8%)
001	10 (2,58)	9 (2,39)	13 (2,43%)	26 (5,2%)	11 (2,1%)	10 (2,4%)
005	0 (<1%)	15 (3,98)	24 (4,49%)	11 (2,2%)	10 (1,9%)	9 (2,1%)
015	0 (<1%)	2 (0,53)	9 (1,69%)	19 (3,8%)	10 (1,9%)	3 (<1%)
017	1 (<1%)	0 (<1%)	5 (0,94%)	4 (<1%)	8 (1,5%)	5 (1,2%)
106	18 (4,65)	21 (5,57)	11 (2,06%)	15 (3%)	10 (1,9%)	2 (<1%)
053	4 (1,03)	0 (<1%)	0 (<1%)	4 (<1%)	2 (0,4%)	0 (<1%)
Autres	197 (50,9)	162 (43,0)	239 (44,7%)	180 (36,5%)	193 (36,4%)	175 (41,7%)
Total	387	377	534	498	530	420

*PCR-ribotype de la souche ou très proche de celui-ci

ND : non déterminé (identification précise non faite)

Parmi les PCR-ribotypes « autres », les PCR-ribotypes 018 (6.7%), 015 (4.1%), et 012/048 (2.6%) sont les plus fréquemment retrouvés en 2017.

**Figure 3** : Répartition des PCR-ribotypes en 2017

Parmi les 387 souches de *C. difficile* toxigènes, 37 (9.6%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, 25 (6.4%) souches sont de PCR-ribotype 027

dit « **historique** » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine (souches isolées dans 14 départements) (figure 4b).

Les **12 souches épidémiques 027** ont été isolées dans les le Gard (n=1), dans l'Isère (n=2), dans le Nord (n=1), dans le Pas de Calais (n=2), à Paris (n=3), et en Seine Saint Denis (n=3) (figure 4a).

La souche 027 épidémique a été isolée pour la première fois en 2017 dans le département de Seine Saint Denis. La souche 027 continue sa diffusion à travers tout le territoire. En 2016, 20 souches épidémiques 027 avaient été reçues au CNR contre 12 seulement en 2017. Le nombre de souches 027 reçues est en diminution. Cette diminution pourrait être liée à une implantation plus importante du test GeneXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive de la souche.

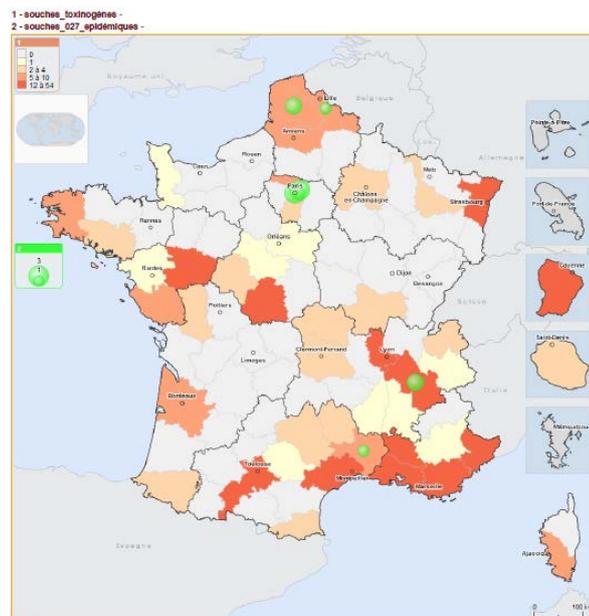


Figure 4a : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques (cercles verts) en fonction des départements, en 2017. Les départements ayant envoyé des souches toxinogènes sont représentés en couleur.

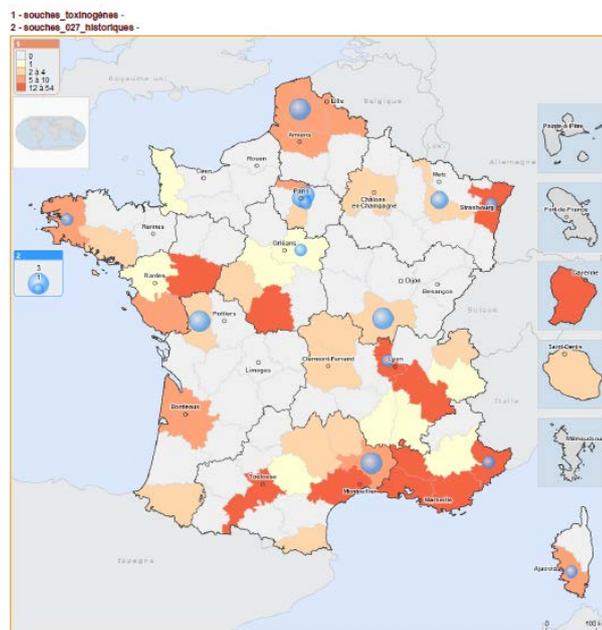


Figure 4b : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques (cercles bleus) en fonction des départements, en 2017. Les départements ayant envoyé des souches toxinogènes sont représentés en couleur.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches reçues au laboratoire est le 014/020/077, isolé sur tout le territoire (figure 5). Les souches de PCR-ribotype 002 arrivent en 2^{ème} position (figure 6). Les souches de PCR-ribotype 078/126 arrivent en 3^{ème} position.

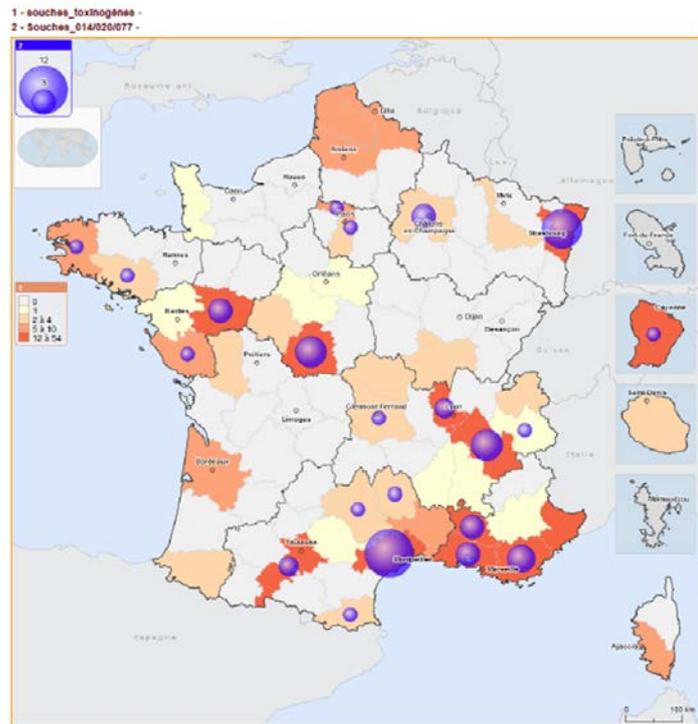


Figure 5 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 ou proches du PCR-ribotype 014/020/077 (cercles violets) en fonction des départements en 2017. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

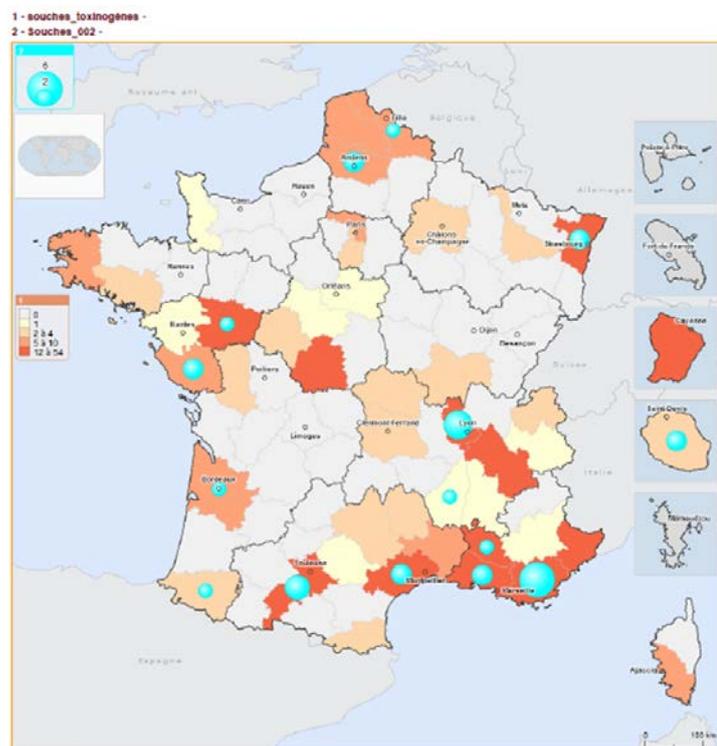


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 002 (cercles bleus) en fonction des départements en 2017. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

Au cours de l'année 2017 une diminution de la proportion de souches non 027 possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (Tableau VI).

Tableau VI : Evolution de la proportion (%) de souches productrices de toxine binaire, 2008-2017

	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	385	301	459	445	390	343	453	444	421	461
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	99	114	175	162	159	150	223	207	188	193
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	25,7	37,9	38,1	36,4	40,8	43,7	49,2	46,6	44,7	41,9
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	37	55	72	67	100	87	127	95	116	85
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs hors souches 027 (%)	16,1	24	26,6	25,1	20,3	24,6	29,4	32,1	23,6	28,7

3-2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

3-2-1 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR)

Les laboratoires ne nous demandent que rarement la réalisation d'un antibiogramme. En effet, les bactéries anaérobies ne présentent généralement pas de résistance aux anti-infectieux, le métronidazole étant une thérapeutique de choix contre les affections à bactéries anaérobies. Cependant le CNR fait le choix de réaliser ponctuellement des antibiogrammes pour certaines souches reçues à des fins de surveillance.

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

En 2017, parallèlement aux tests phénotypiques et à l'identification par analyse de la séquence ARNr 16S le CNR a effectué sur **114 souches** (90 à Gram+ dont 36 *C.difficile* et 24 à Gram-) un antibiogramme standard selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les résultats sont repris dans les tableaux 7- chapitre 9).

Les données d'antibiorésistance sont discutées ci-dessous :

Métronidazole

Le métronidazole demeure l'antibiotique donné en première intention pour lutter contre les infections à bactéries anaérobies. Il est donc important de suivre l'évolution des résistances. Les souches testées restent très sensibles au métronidazole. Les *Actinobacteriaceae* (genres *Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Propionimicrobium*, *Varibaculum*, *Bifidobacterium* et genres apparentés etc...) présentent une résistance naturelle plus ou moins importante vis-à-vis de cet antibiotique.

Tous les *Clostridium difficile* (n=36) étaient très sensibles (diamètre \geq 34mm).

Amoxicilline, amoxicilline/ac. Clavulanique

Les résistances à l'amoxicilline ont été observées essentiellement chez les bactéries anaérobies à Gram -, notamment du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. 20 souches sur 24 souches de bactéries anaérobies Gram – étaient résistantes à l'amoxicilline, dont 10 étaient aussi résistantes à l'association amoxicilline/acide clavulanique. Les taux de résistance (R+I) étaient de 85% pour l'amoxicilline (diamètre < 16 mm) et de 35% pour l'amoxicilline/acide clavulanique. Les gènes de résistance codant pour des bêta-lactamase/cephalosporinases (*cepA*, *cfxA*, *cftA*) sont identifiés systématiquement par PCR chez les bactéries anaérobies des genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*.

Seulement une souche d'anaérobie stricte Gram + (*Casaltella massiliensis*) était résistante à l'amoxicilline et à l'amoxicilline/acide clavulanique et une souche de *Peptoniphilus sp* présentait un profil de résistance intermédiaire à l'amoxicilline.

Céphalosporines: cefalotine (C1G), cefoxitine (C2G), cefotaxime (C3G)

La résistance aux céphalosporines a été identifiée principalement chez les anaérobies Gram – du genre *Bacteroides*: 14 souches résistantes à cefalotine, 11 à cefoxitine, et 12 à cefotaxime parmi 15 souches testées.

Imipénème

Quatre souches (20%) du genre *Bacteroides* étaient résistantes à l'imipénème.

Moxifloxacine (Fluoroquinolone 3^{ème} génération)

Neuf souches d'anaérobies Gram - étaient résistantes à la moxifloxacine, principalement dans les genres *Bacteroides*. Parmi les anaérobies à Gram +, cette résistance est observée essentiellement chez *C. difficile*.

Clindamycine

La résistance à la clindamycine est fréquente chez *C. difficile* (80.5 % des souches testées). Elle est également observée parmi les *Bacteroides* (4 souches parmi 15) et plus rarement dans le genre *Clostridium* (13.5% des souches testées)..

Vancomycine

La résistance à la vancomycine est fréquente chez les anaérobies à Gram – (66.7% des souches testées), plus rare chez les anaérobies à Gram + (18.5%).

Données de résistance aux antibiotiques pour les 36 de *Clostridium difficile* analysées au CNR de janvier à avril 2017.

Les résistances aux antibiotiques des souches de *C. difficile* reçues au CNR sont présentées au Tableau 7-Chapitre 9.

Les fréquences de résistance (R+I) étaient de 19.4% pour l'érythromycine, 80.6% pour la clindamycine, 33% pour la moxifloxacine, 22% pour l'imipénème, 3% pour la tétracycline. Aucune résistance à la vancomycine n'a été observée. Toutes les souches étaient résistantes à la cefoxitine (céphalosporine 2^{ème} génération) et cefotaxime (céphalosporine 3^{ème} génération).

3-2-2 Surveillance de la résistance de *C. difficile* aux anti-infectieux

La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, au métronidazole, à la tétracycline et à la vancomycine (méthode des disques) a été testée pour 385 souches de *C. difficile* toxigènes respectivement, en 2017. Une détermination de la CMI du métronidazole par la méthode des E-tests a été réalisée pour 30 souches.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm) de 38.7%, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm) de 98.9%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21 mm) de 35.6%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm) de 8% (Tableau VII).

Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine (diamètre \geq 17 mm, ou CMI \leq 2 mg/l selon l'EUCAST).

La totalité des souches toxigènes était sensible au métronidazole (diamètre \geq 21 mm pour les disques chargés à 5 μ g et $>$ 35 mm pour les disques chargés à 16 μ g, ou CMI \leq 2 mg/l selon l'EUCAST).

Tableau VII : Pourcentage de résistance (R+I) des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline depuis 2008.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline
% de souches avec un diamètre	<22 mm	<15 mm	<21 mm	<19 mm
2008	41,3	81,9	38,9	ND
2009	43,8	79,5	43,1	2,5*
2010	40,5	91,3	41,3	5,3
2011	51,3	90,4	53,3	2
2012	44,5	87,8	42,3	5,3
2013	43,2	83,2	38,2	4,4
2014	34,4	88,9	28,6	3
2015	26,4	85,3	23,2	6,5
2016	26,4	89,7	34,5	9,3
2017	38,7	98,9	35,6	8

ND : non déterminé

* : la détermination de la sensibilité à la tétracycline a été mise en place au cours de l'année 2009 (résultats partiels).

3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3-3-1 CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme

La situation épidémiologique du botulisme fait l'objet d'une mise au point régulière avec Santé Publique France (principal interlocuteur N. Jourdan da Silva). Des échanges sont établis à propos de chaque foyer ou suspicion avec SpF, les cliniciens concernés, l'ARS et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé. Des études communes présentant la situation du botulisme en France sont régulièrement publiées dans le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH).

Contribution aux réseaux de surveillance européens et international

Notre laboratoire est régulièrement sollicité pour le diagnostic et la surveillance du botulisme dans les DOM comme La Réunion et Mayotte, et occasionnellement dans d'autres pays européens (Suisse, Portugal, Espagne). Cette année, le CNR a diagnostiqué biologiquement 2 foyers de botulisme humain à l'étranger : 1 en Arabie Saoudite et un autre en Amérique du Sud.

Le CNR est partenaire du projet européen EuroBioTox (*European programme for the establishment of validated procedures for the detection and identification of biological toxins*) dans le cadre de l'appel d'offre H2020 regroupant 13 partenaires européens et une cinquantaine de laboratoires participant à des essais interlaboratoires.

Christelle Mazuet est membre du comité de nomenclature des types et sous-types de toxines botuliques coordonné par le CDC d'Atlanta.

3-3-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé (https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf).

Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches et d'éditer un compte-rendu des résultats. Depuis août 2009, l'identification de 10 PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077,015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) régulièrement retrouvés en France a été mise en place. L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à SPF. L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à Santé Publique France.

Ce site est consultable dans sa totalité par Santé publique France, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les CCLIN (ou CPias), les ARS et les laboratoires experts ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site est régulièrement mis à jour. Ce site anciennement hébergé par l'Institut Pasteur a été relocalisé en janvier 2016 au niveau de la société Epiconcept, sans que cela n'affecte le rendu ou la consultation des résultats.

De plus, F. Barbut, J. Couturier et C. Gateau sont régulièrement en contact avec B. Coignard ou A. Carbonne (Santé Publique France) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*).
- **F. Barbut** a participé au projet **CloSER** (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes) en 2017.
- **F. Barbut** a participé aux projets **LuCID2** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study) (Davies *et al.*- soumis).
- **F. Barbut** participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'**ECDC** sur la surveillance des infections à *C. difficile*. Il est notamment intervenu à un Workshop organisé par l'ECDC sur le diagnostic des infections à *C. difficile* (Vienne, Mai 2017) **F. Barbut** participe au projet « **Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections** » projet piloté par l'ECDC
- **F. Barbut** est le coordonnateur français de l'étude européenne COMBACTE-CDI. Il s'agit d'une étude **non interventionnelle** dont les objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire.

3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisées

1. Surveillance par le réseau DIFTEC

DIFTEC[®] est un logiciel accessible gratuitement à partir du site diftec.fr ou diftec.net et est destiné aux professionnels de santé hospitaliers. Cet outil a pour finalité l'évaluation des pratiques

diagnostiques et thérapeutiques des infections à *Clostridium difficile* au niveau des établissements de santé.

Ce logiciel donne la possibilité aux utilisateurs d'analyser leurs données localement mais également de regrouper leurs données anonymisées avec d'autres centres qui le souhaitent pour effectuer des analyses spécifiques, régionales voir nationales. Chaque utilisateur reste responsable de vérifier l'exactitude de l'analyse des résultats produits par le logiciel.

Le projet DIFTEC® s'inscrit dans une démarche qualité d'échanges et d'amélioration des pratiques de soins.

DIFTEC® est piloté par un comité scientifique national d'experts et a reçu le soutien de la Société Française de Microbiologie (SFM), de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H). F. Barbut appartient au comité scientifique. Cette initiative est soutenue financièrement par le laboratoire Astellas Pharma, qui est propriétaire du logiciel mais n'a pas accès aux données saisies dans l'outil et ne génère aucune analyse à partir de celles-ci. Le projet DIFTEC® a reçu l'autorisation de la CNIL (Décision DE-2015-081 - Traitements de données à caractères personnel de santé à des fins d'évaluations ou d'analyse des pratiques et des activités de soins et de prévention relevant de la procédure des articles 62 à 66 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée). Les données des patients sont traitées de telle sorte que les personnes ne peuvent être identifiées.

Les centres peuvent s'inscrire à un Observatoire National des pratiques : dans ce cas, chaque centre s'engage à renseigner de manière exhaustive **tous les épisodes d'ICD** dans la base DIFTEC au **minimum 1 mois par semestre** et à envoyer pour une caractérisation les souches isolées pendant cette période au Laboratoire *C. difficile* associé au CNR. Les centres participants acceptent que le comité scientifique visualise et analyse leurs données. Le CNR s'engage à retourner les résultats de ces caractérisations aux centres participants. Les résultats de cet observatoire au niveau local et national seront transmis par le comité scientifique à tous les centres participants.

2. Etude LuCID 2 (Longitudinal European *Clostridium difficile* Infection Diagnosis Surveillance Study) (2015-2017)

L'objectif de cette étude était de compléter les données de l'étude LuCID par des informations individuelles complémentaires sur les selles testées négatives pour une ICD, identifiées en juillet 2014 et en janvier 2015. Le nombre d'admissions et le nombre de journées d'hospitalisation pour chaque mois de l'étude ont également été demandés. De plus, cette étude a été élargie à 2 autres pays européens (Allemagne, Espagne) et 20 établissements de santé supplémentaires ont été recrutés pour chacun des 3 pays qui avaient participé à l'étude LuCID.

DAVIES K., DAVIS G., **BARBUT F.**, ECKERT C., PETROSILLO N., WILCOX M.

Variability in testing policies and impact on reported Clostridium difficile infection rates: results from the pilot Longitudinal European Clostridium difficile Infection Diagnosis surveillance study (LuCID). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2016, **35**(12):1949-1956

3. CommunoDIFF (Prévalence de *Clostridium difficile* dans les diarrhées communautaires). (2015-2016)

Cette étude est réalisée en collaboration avec le Dr Nesrine Day (Laboratoire du Chemin Vert, Paris) et est financée par le laboratoire Alère.

L'objectif principal de cette étude non interventionnelle est de mesurer la prévalence des infections à *C. difficile* (ICD) chez des patients ambulatoires présentant une diarrhée communautaire. Les objectifs secondaires sont (i) de déterminer la proportion d'ICD sous-diagnostiquée par absence de suspicion clinique et (ii) de caractériser les patients atteints d'ICD communautaires.

COUTURIER J., Eckert C., Day N., Bouée S., Youssouf A., Grandvoinet L., Castella W., Lalande V., **Barbut F.**

Clostridium difficile infections in general practice: results of a laboratory-based cohort study. Clin. Microbiol. Infect. 2017, in preparation

4. European surveillance of *Clostridium difficile* infections (Surveillance européenne des infections à *C. difficile*) (2017)

Le réseau BMR-RAISIN a introduit la composante « *Clostridium difficile* » dans la surveillance des BMR en s'appuyant sur la méthodologie proposée par l'ECDC (surveillance « light ») (données agrégées du nombre total de cas d'ICD communautaires et nosocomiales, nombre de journées d'hospitalisation, nombre de recherche de *C. difficile* réalisées)

4- ALERTE

4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

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

Botulisme : Chaque cas de botulisme confirmé biologiquement par le CNR a fait l'objet d'une déclaration par fax, email ou téléphone à Santé publique France (SpF). En outre, des contacts téléphoniques ou par courrier électronique ont régulièrement eut lieu entre SpF, le CNR, les ARS, la DGAL et les cliniciens pour faire le point sur les foyers de botulisme en cours et sur des suspicions de botulisme. L'alerte est déclenchée lorsqu'il y a un risque de santé publique, notamment avec un produit alimentaire du commerce, ce qui ne s'est pas produit en 2017.

Alertes Biotox :

Le CNR a été réquisitionné le weekend à deux reprises:

- En aout, suite à deux décès violents et simultanés dans le département 28 : suspicion de contamination à la toxine botulique de conserves industrielles.
- En octobre, suspicion de tentative d'empoisonnement à la toxine botulique d'un château d'eau dans le département 78.

Le CNR a procédé aux recherches de toxines botuliques et a également participé aux conférences téléphoniques organisées par la DGS/CORRUS pour la première suspicion.

4-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (ARS et CPIas) des épidémies et des cas sévères d'infections (*cf* guide Raisin, http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/). Il s'agit d'une surveillance ciblée. Les établissements réalisant un signalement doivent envoyer au laboratoire associé les souches isolées de l'épisode signalé afin d'assurer la surveillance de l'éventuelle dissémination du clone épidémique 027 sur le territoire français ainsi que celle d'autres clones émergents. Les données de typage sont accessibles en temps réel au responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de Santé publique France. De plus chaque responsable des CPIas a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

Au cours de l'année 2017, une épidémie de souche de PCR-ribotype (PR) 018 a été détectée au CHU de Strasbourg.

La prévalence de *Clostridium difficile* PCR-ribotype 018 est faible en Europe mais des variations sont observées entre les pays. En Italie, le PR 018 a été signalé comme un PR émergent associé à une infection sévère à *C. difficile* (ICD) et à des épidémies. En 2017, nous avons été confrontés à la première épidémie liée au PR 018 dans 4 unités gériatriques du CHU de Strasbourg. De janvier à novembre 2017, une ICD a été diagnostiquée chez 32 patients. Les souches ont d'abord été caractérisées par PCR-ribotypage: 18 souches sur 32 appartenaient au PR 018 (âge moyen = 87 ans, 50% d'hommes, mortalité à 3 mois 61,1%). Ces 18 souches ainsi que 12 souches PR 018 isolées dans d'autres établissements de santé français ont ensuite été typées par MLVA (Multi-Locus VNTR [Variable Number Tandem Repeat Analysis]) et wgMLST (Whole Genome Multi Locus Sequence Typing) (EpiSeq™, bioMérieux). Sept loci (A6, B7, C6, E7, F3, G8, H9) ont été amplifiés par PCR pour le typage MLVA. Le nombre de répétitions en tandem a été déterminé pour chaque souche par électrophorèse sur gel capillaire. La relation génétique entre deux souches a été évaluée en calculant les différences de répétition en tandem (STRD), et les données ont été concaténées dans un arbre couvrant minimum. Les souches avec un STRD ≤ 10 ont été définies comme étant génétiquement apparentées (même cluster) et les complexes clonaux ont été définis par un STRD ≤ 2.

Parmi les 30 souches de *C. difficile* PR 018, 25 (83,3%) appartenaient au même cluster. Ce cluster comprenait 2 complexes clonaux. Le premier comprenait 9 souches isolées chez des patients des unités gériatriques et le second 11 souches (7 souches des unités gériatriques, 3 souches d'un autre établissement de santé à Strasbourg et 1 souche d'un autre hôpital français non lié épidémiologiquement). Deux souches isolées dans les unités gériatriques n'appartiennent pas au même groupe. Les résultats de MLVA vont être comparés à l'analyse par WgMLST

Trois souches ayant un profil particulier en PCR multiplex ont été envoyées par le CH de Cayenne au cours de l'année 2017 :

- Deux souches possèdent uniquement le gène de la toxine B (Absence des gènes *tpi*, *lok*, *tcdA* et *cdtB*, *cdtA*). Ces souches correspondent à un nouveau PCR ribotype.
- Une souche possède uniquement le gène *tpi* (Absence de *lok*, *tcdA*, *tcdB* et *cdtB*, *cdtA*). Cette souche correspond à un nouveau PCR ribotype.

Une analyse par MLST a été réalisée et a montré que ces souches n'appartiennent pas à un clade déjà existant. Ces souches sont en cours de séquençage par NGS.

5-ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5-1-1-1 Enseignements

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement	Nb d'heures en 2017
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours	2 h
Universités Paris V, VI et VII	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours	2h
Université Paris VI, UPMC	Réanimation	DU en soins infirmiers de réanimation et urgences vitales	Cours	2h
Université Paris V, VII - Denis Diderot- Versailles - Saint-Quentin en Yvelines - Bordeaux II P. Broca	Infectiologie	DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse	Cours	2h
Université Paris V René Descartes	Infectiologie	DU antibiotiques et antibiothérapie	Cours	2h
Université Mérieux, Lyon	Bactériologie (formation sur les Anaérobies)	Techniciens de laboratoire ou biologistes	Cours	2h
Université Paris V René Descartes	bactéries anaérobies et <i>C. difficile</i>	DES de biologie médicale	Cours	1h

5-1-1-2 *Activités de Formations continues*

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées- Année
Staff de service, Hôp. Avicenne, Maladies infectieuses (Pr O. Bouchaud)	Maladies infectieuses	Médecins	Staff de service	1h00-2017
Staffs de service, Hôp. Saint Antoine, Réanimation médicale (Pr B. Guidet) Maladies infectieuses (Pr PM Girard)	Réanimation Maladies infectieuses	Médecins	Staff de service	1h00-2017
Journées Alain Feuillu	Biologie	Biologistes	OGDPC	30 min. 2017

5-1-2 *Stagiaires accueillis*5-1-2-1 *CNR Bactéries anaérobies et Botulisme*

- **Yanis SOUFRANI** du 29 mai au 28 juillet 2018 : Stage de 3ème année d'études à l'école d'ingénieur Sup'Biotech : « Initiation à l'analyse génomique des bactéries anaérobies ».
- **Diana CHAPETON**, stage post-doctoral, 2014-2018 "Etude de la régulation de la toxinogénèse chez *Clostridium tetani*".

5-1-2-2 *Laboratoire associé C. difficile*

- **Valère Husset**, BTS Biotechnologie, Ecole Technique Supérieure du Laboratoire (ETSL)
- **Hélène Amazouz**, Master 1 Epidémiologie, Santé publique, Université Paris V (2016-2017)

5-1-3 *Liste des guides élaborés - Laboratoire associé*

- **BARBUT F.**, DONSKEY CJ.
Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*
In "Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice",
Edited by David H. Persing *et al.*, 3rd Edition, Press, Washington, DC.
10.1128/9781555819071.ch16 (p185-196).
- KUIJPER E., **BARBUT F.**
« *Clostridium* »
In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press
2018 sous press
- TSCHUDIN-SUTTER S, KUIJPER E, DUROVIC A, VEHRESCHILD M, **BARBUT F**, ECKERT C, FITZPATRICK F, HELL M, NORÉN T, O'DRISCOLL J, COIA J, GASTMEIER P, VON MÜLLER L, WILCOX M., WIDMER A, on behalf of the Committee*
Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings
Clin Microbiol Infect. 2018 in press.

- BARBUT F, GATEAU C, COUTURIER J.
Prévention et contrôle des infections à *Clostridium difficile*
Hygienes 2017, XX, 5, 281-289
- Fiche EFFICATT. « *Clostridium difficile* » INRS 2018

5-1-4 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé

- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme>
Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017.
- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé au laboratoire associé, à Santé publique France et aux CCLIN (Cepias). Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats qui est adressé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- Site web RAISIN et de Santé publique France : <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>
- Collaboration à la plaquette d'information destinée au patient (<http://www.cclinparisnord.org/Usagers/PlaquettePATIENT.pdf>) [2006]
- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » (http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/conduite_clostridium_difficile.pdf)

5-1-5 Activités de conseils aux professionnels de santé

Le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme a mis à disposition des numéros de téléphone (01 45 68 84 56/01 45 68 83 10), des adresses email (christelle.mazuet@pasteur.fr, laure.diancourt@pasteur.fr et cnranaerobies@pasteur.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, pré analytiques, interprétation des résultats). Des cahiers d'enregistrement/traçabilité/transmission des prestations de conseils délivrées aux professionnels de santé, vétérinaires, particuliers ont été mis en place à chaque poste téléphonique. Ainsi en 2017 (251 jours ouvrés), le CNR a répondu à environ 160 emails et à 110 appels téléphoniques enregistrés.

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition des numéros de téléphone (01 49 28 09 89/01 71 97 09 86/01 71 97 09 85) et des adresses email (frederic.barbut@aphp.fr, cecile.gateau@aphp.fr, jeanne.couturier@aphp.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostiques, hygiène). Bien que le nombre d'appels ne soit pas formellement enregistré, on peut estimer leur fréquence à un minimum de 1 appel par jour ouvrable.

5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

C. Mazuet a été régulièrement en contact avec Nathalie Jourdan Da Silva et Dieter Van Cauteren (SpF) pour l'investigation des suspicions de botulisme.

F. Barbut, Cécile Gateau ou Jeanne Couturier ont été régulièrement en contact avec Anne Carbonne (SpF) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles

F. Barbut participe aux groupes de travail sur la transplantation fécale pilotés par l'ANSM d'une part et l'Académie de Pharmacie d'autre part. Il est membre du **GFTF** (Groupe Français de Transplantation Fécale), groupe dirigé par Harry Sokol et créé en 2016.

6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

6-1 TRAVAUX DE RECHERCHE

6-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

6-1-1-1 *Travaux de recherche sur la toxine botulique et C. botulinum*

◆ ***The European AntibotABE Framework Program and Its Update: Development of Innovative Botulinum Antibodies.***

Rasetti-Escargueil C, Avril A, Miethe S, Mazuet C, Derman Y, Selby K, Thullier P, Pelat T, Urbain R, Fontayne A, Korkeala H, Sesardic D, Hust M, Popoff MR.

Toxins (Basel). 2017 Oct 2;9(10).

Abstract

The goal of the AntiBotABE Program was the development of recombinant antibodies that neutralize botulinum neurotoxins (BoNT) A, B and E. These serotypes are lethal and responsible for most human botulinum cases. To improve therapeutic efficacy, the heavy and light chains (HC and LC) of the three BoNT serotypes were targeted to achieve a synergistic effect (oligoclonal antibodies). For antibody isolation, macaques were immunized with the recombinant and non-toxic BoNT/A, B or E, HC or LC, followed by the generation of immune phage-display libraries. Antibodies were selected from these libraries against the holotoxin and further analyzed in in vitro and ex vivo assays. For each library, the best ex vivo neutralizing antibody fragments were germline-humanized and expressed as immunoglobulin G (IgGs). The IgGs were tested in vivo, in a standardized model of protection, and challenged with toxins obtained from collections of Clostridium strains. Protective antibody combinations against BoNT/A and BoNT/B were evidenced and for BoNT/E, the anti-LC antibody alone was found highly protective. The combination of these five antibodies as an oligoclonal antibody cocktail can be clinically and regulatorily developed while their high "humanness" predicts a high tolerance in humans.

◆ **Analyse d'anticorps monoclonaux neutralisants de la toxine botulique E (collaboration avec le CEA Saclay)**

Dans le cadre du programme NRBC et en collaboration avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse, CEA, Saclay, des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine Hc de la toxine botulique de type E ont été obtenus. Ces anticorps reconnaissent BoNT/E en ELISA, mais ils ne neutralisent pas ou seulement à un faible niveau BoNT/E dans le test de létalité chez la souris. Par contre, une association de 3 de ces anticorps monoclonaux a une activité neutralisante très élevée. Ce travail de caractérisation de l'activité neutralisante de cette association d'anticorps se poursuit.

◆ **Caractérisation de l'anticorps monoclonal neutralisant de la neurotoxine botulique A (collaboration avec le CEA Saclay et la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'Institut Pasteur)**

Un total de 14 anticorps monoclonaux contre la toxine botulique A ont été obtenus chez la souris à l'aide du fragment Hc de la toxine botulique A. Un de ces anticorps a une activité neutralisante très élevée et supérieure à celle obtenue avec des anticorps polyclonaux. L'objectif actuel est de mapper sur la toxine botulique l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal ayant une activité neutralisante très élevée. Pour cela nous utilisons une technique d'incorporation de deutérium sur les amides libres du fragment Hc de la toxine botulique A seul ou lié à l'anticorps monoclonal suivi d'une analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, on a déterminé que l'anticorps monoclonal reconnaît le site

de liaison du fragment Hc à son récepteur protéique (protéine de vésicule synaptique SV2). Des analyses sont en cours pour déterminer plus en détail cet épitope et comprendre le mécanisme du haut pouvoir neutralisant de cet anticorps.

◆ Développement des tests alternatifs au test *in vivo* sur souris pour la détection et le titrage des toxines botuliques

C'est un enjeu crucial actuellement de remplacer les tests sur souris pour la détection et titrage des toxines botuliques par des tests *in vitro* qui devraient être plus rapides et plus précis, et pour autant aussi sensibles que les tests sur animaux. Cet aspect constitue une part essentielle du programme européen H2020 que nous avons obtenu pour la période 2016-2021. Actuellement nous développons les tests endoprotéases avec détection par ELISA à l'aide d'anticorps spécifiques du substrat clivé par chaque toxine botulique. Egalement, nous développons des tests basés sur l'activité endoprotéasique des toxines botuliques et détection des produits de clivage par spectrométrie de masse (collaboration avec le CEA Saclay et le laboratoire de la DGA à Vert Le Petit) ainsi que par plasmon résonance (Biacore, collaboration avec l'INSERM Marseille) tel que récemment publié (Sci Rep. 2016, 6: 20301).

Brièvement, les toxines botuliques A et E sont détectées par leur activité endoprotéasique vis à vis de SNAP25 et des anticorps monoclonaux spécifiques du substrat clivé par chaque toxine respectivement. La détection est réalisée par surface plasmon résonance (Biacore) et elle permet la détection simultanée des deux types de toxine dans un même échantillon. Cette méthode a été évaluée avec des sérums humains artificiellement contaminés par les toxines botuliques A et E. Elle apparaît 10 fois plus sensible que le test *in vivo* chez la souris.

◆ Caractérisation de souches de *Clostridium botulinum* et *Clostridium baratii*

Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature

Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, Cuervo P, Cheng LW, Derman Y, Dorner BG, Fisher A, Hill KK, Kalb SR, Korkeala H, Lindström M, Lista F, Lúquez C, Mazuet C, Pirazzini M, Popoff MR, Rossetto O, Rummel A, Sesardic D, Singh BR, Stringer SC. Toxins (Basel). 2017 Jan 18;9(1). Review.

Abstract

Botulinum neurotoxins are diverse proteins. They are currently represented by at least seven serotypes and more than 40 subtypes. New clostridial strains that produce novel neurotoxin variants are being identified with increasing frequency, which presents challenges when organizing the nomenclature surrounding these neurotoxins. Worldwide, researchers are faced with the possibility that toxins having identical sequences may be given different designations or novel toxins having unique sequences may be given the same designations on publication. In order to minimize these problems, an ad hoc committee consisting of over 20 researchers in the field of botulinum neurotoxin research was convened to discuss the clarification of the issues involved in botulinum neurotoxin nomenclature. This publication presents a historical overview of the issues and provides guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature in the future.

◆ Passage de la toxine botulique B à travers la barrière intestinale

Botulinum neurotoxin type B uses a distinct entry pathway mediated by CDC42 into intestinal cells versus neuronal cells.

Connan C, Voillequin M, Chavez CV, Mazuet C, Leveque C, Vitry S, Vandewalle A, Popoff MR. Cell Microbiol. 2017 Aug;19(8).

Abstract

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are responsible for severe flaccid paralysis by inhibiting the release of acetylcholine at the neuromuscular junctions. BoNT type B (BoNT/B) most often induces mild forms of botulism with predominant dysautonomic symptoms. In food borne botulism and botulism by intestinal colonisation such as infant botulism, which are the most frequent naturally acquired forms of botulism, the digestive tract is the main entry route of BoNTs into the organism. We previously showed that BoNT/B translocates through mouse intestinal barrier by an endocytosis-dependent mechanism and subsequently targets neuronal cells, mainly cholinergic neurons, in the intestinal mucosa and musculosa. Here, we investigated the entry pathway of BoNT/B using fluorescent C-terminal domain of the heavy chain (HcB), which is involved in the binding to specific receptor(s) and entry process into target cells. While the combination of gangliosides GD_{1a}/GD_{1b}/GT_{1b} and synaptotagmin I and to a greater extent synaptotagmin II constitutes the functional HcB receptor on NG108-15 neuronal cells, HcB only uses the gangliosides GD_{1a}/GD_{1b}/GT_{1b} to efficiently bind to m-IC_{cl2} intestinal cells. HcB enters both cell types by a dynamin-dependent endocytosis, which is efficiently prevented by Dynasore, a dynamin inhibitor, and reaches a common early endosomal compartment labeled by early endosome antigen (EEA1). In contrast to neuronal cells, HcB uses a Cdc42-dependent pathway to enter intestinal cells. Then, HcB is transported to late endosomes in neuronal cells, whereas it exploits a nonacidified pathway from apical to basal lateral side of m-IC_{cl2} cells supporting a transcytotic route in epithelial intestinal cells.

6-1-1-2 ***Développement d'outils et investigation autour des foyers de botulisme animal***

Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism.

Le Maréchal C, Rouxel S, Ballan V, Houard E, Pœzevara T, Bayon-Auboyer MH, Souillard R, Morvan H, Baudouard MA, Woudstra C, **Mazuet C**, Le Bouquin S, Fach P, Popoff M, Chemaly M. PLoS One. 2017 Jan 11;12(1)

Abstract

Liver is a reliable matrix for laboratory confirmation of avian botulism using real-time PCR. Here, we developed, optimized, and validated the analytical steps preceding PCR to maximize the detection of Clostridium botulinum group III in avian liver. These pre-PCR steps included enrichment incubation of the whole liver (maximum 25 g) at 37°C for at least 24 h in an anaerobic chamber and DNA extraction using an enzymatic digestion step followed by a DNA purification step. Conditions of sample storage before analysis appear to have a strong effect on the detection of group III C. botulinum strains and our results recommend storage at temperatures below -18°C. Short-term storage at 5°C is possible for up to 24 h, but a decrease in sensitivity was observed at 48 h of storage at this temperature. Analysis of whole livers (maximum 25 g) is required and pooling samples before enrichment culturing must be avoided. Pooling is however possible before or after DNA extraction under certain conditions. Whole livers should be 10-fold diluted in enrichment medium and homogenized using a Pulsifier® blender (Microgen, Surrey, UK) instead of a conventional paddle blender. Spiked liver samples showed a limit of detection of 5 spores/g liver for types C and D and 250 spores/g for type E. Using the method developed here, the analysis of 268 samples from 73 suspected outbreaks showed 100% specificity and 95.35% sensitivity compared with other PCR-based methods considered as reference. The mosaic type C/D was the most common neurotoxin type found in examined samples, which included both wild and domestic birds.

A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C Clostridium botulinum spores on a farm with dairy and poultry operations.

Relun A, Dorso L, Douart A, Chartier C, Guatteo R, **Mazuet C**, Popoff MR, Assié S. Epidemiol Infect. 2017 Dec;145(16):3477-3485

Abstract

Type D bovine botulism outbreaks associated with poultry litter are increasingly reported in European countries, but the circumstances of exposure to *Clostridium botulinum* toxins remain unclear. In spring 2015, a large type D/C bovine botulism outbreak affected a farm with dairy and poultry operations. Epidemiological and laboratory investigations strongly suggest that the outbreak was caused by feeding cattle with insufficiently acidified grass silage that was contaminated by type D/C *C. botulinum* spores. The source of the spores remains unclear, but could have been a stack of poultry litter stored in the grass silage pasture before harvesting. The presence of putrefied poultry carcasses mixed in with the litter is relatively unlikely considering the careful daily removal of poultry carcasses. These findings reinforce the importance of proper ensiling of feed materials and highlight the need for safe disposal of poultry litter, even in the case of good management of poultry deadstock, in order to prevent bovine botulism.

6-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Le laboratoire a été labellisé **Groupe de Recherche Clinique-UPMC** en janvier 2012 pour son projet **EPIDIFF** (Infections à *Clostridium difficile* (ICD): diagnostic, épidémiologie clinique et réponse de l'hôte). **F. Barbut** a été nommé en janvier 2014 **directeur de l'unité « Infections à *Clostridium difficile* (ICD) : diagnostic, épidémiologie clinique et réponse de l'hôte »**, unité inscrite dans la liste des **structures de recherche de l'UPMC**. En 2017, F. Barbut a été nommée PU-PH et a pris en Janvier 2018 la direction de l'EA 4065 « Ecosystème intestinal, probiotiques, antibiotiques » à la faculté de Pharmacie de Paris.

6-1-2-1 *Etude SERODIFF : réponse immunitaire vis-à-vis de C. difficile*

Investigateur principal : M. Greder, Versailles, responsable scientifique A. Le Monnier, Paris. F. Barbut fait partie du comité de pilotage (Soutien financier : Sanofi Pasteur).

Ce projet cherche à comprendre la réponse immunitaire des patients dans les infections à *C. difficile* et le poids de cette immunité comme facteur de risque d'infection. Ce projet multi-centrique (15 centres) a démarré en 2013 et est financé par Sanofi Pasteur. Les inclusions ont été terminées en 2016 et les souches ont été caractérisées par notre laboratoire. L'année 2017 a été consacrée à l'interprétation des résultats et la rédaction du rapport d'étude.

A la date du 10 juin 2017, 123 souches de *C. difficile* (directement envoyées par les centres participants ou isolées des selles de la coprothèque) ont été caractérisées. Parmi ces souches, 116 étaient des souches toxigènes et 7 souches étaient des souches non toxigènes de *C. difficile*. Toutes les souches toxigènes présentaient à la fois les gènes de la toxine A et B à l'exception d'une souche qui s'est avérée *tcdA+tcdB-* (souches de toxinotype XI, PCR ribotype 033). Deux souches épidémiques 027 ont été également isolées.

Le gène régulateur négatif *tcdC* a été caractérisé pour les souches toxigènes : 11 souches présentaient une délétion -39 pb (PCR ribotypes 078, 126, 033, FR128), 11 souches une délétion de -18pb (PCR ribotypes 027, 106, 015, FR007, FR038), et deux souches une délétion de -54 pb (PCR ribotype 023). Les autres souches n'avaient pas de délétion dans *tcdC*.

6-1-2-2 *Etude INFLADIFF: signification clinique de la présence d'une souche toxigène de C. difficile dans les selles sans la présence de toxines libres*

Soutien financier : laboratoire Astellas

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt du dosage de la lactoferrine et de la calprotectine fécales chez des patients ayant une infection à *C. difficile* (ICD). Au total 135 patients avec une ICD ont été inclus, 87 ayant un test de cytotoxicité des selles positif. Ces patients ont été comparés à un contrôle apparié sur le service et l'âge. Les médianes de calprotectine et de lactoferrine fécales étaient significativement plus élevées chez les patients infectés que chez les contrôles (218 µg/g versus 111.5 µg/g et 26.8 µg/g versus 8.0 µg/g respectivement). Chez les patients infectés, les concentrations de lactoferrine et calprotectine fécales étaient plus élevées chez les patients avec des toxines libres comparés à ceux sans toxine libre dans les selles, suggérant une corrélation entre l'inflammation intestinale et la présence de toxine dans les selles.

BARBUT F., GOUOT C., LAPIDUS N., SUZON L., SYED ZAIDI R., LALANDE V., ECKERT C.

Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with Clostridium difficile infection: a prospective case-control study.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2017 Dec;36(12):2423-2430

6-1-2-3 *Etude EVADE : évaluation in situ de l'activité sporicide de l'Anioxyfloor*

Soutien financier : laboratoire Anios.

Après avoir évalué l'activité *in vitro* de l'Anioxyfloor (APA) par la méthode des porte-germes, nous avons comparé son efficacité à celle de l'eau de Javel (EJ) en conditions réelles d'utilisation. Une étude prospective, bi-centrique de type « avant-après » en cross over multiple a été réalisée dans 2 services cliniques. Pour tout patient ayant une infection à *C. difficile* (ICD), la chambre était prélevée avant bionettoyage puis dans les 2 heures suivant le bionettoyage. La contamination environnementale a été mesurée à J0, J+1, J+2, entre J+7 et J+10 et à la sortie du patient. Quinze sites ont été prélevés (12 surfaces, 2 prélèvements d'air, un prélèvement de siphon). La satisfaction des utilisateurs a été évaluée à l'aide d'un questionnaire.

Quarante patients ayant une ICD ont été inclus : 14 chambres ont été désinfectées par l'EJ et 26 chambres par l'APA. Au total, 4441 prélèvements ont été réalisés incluant les prélèvements de surface (n=3288), d'air (n=548) et de siphons (n=221). Le taux global de contamination par *C. difficile* était de 6,66 % pour les surfaces, 10,03% pour l'air, et de 6,79 % pour les siphons. Les sites les plus fréquemment contaminés avant bionettoyage étaient : le sol des toilettes (23.13%) les lunettes de toilettes (15.67 %), et le lavabo (14.18%) ; la table de nuit (10.45%), les barreaux de lit (8.21%) et les boutons d'appel (8.21%). Le taux de contamination avant bionettoyage décroissait avec le temps et était corrélé à l'intensité de la diarrhée et l'incontinence du patient.

La comparaison de la contamination avant et après bionettoyage indique une réduction significative à la fois dans le bras EJ (13,4% versus 7,4%, réduction relative de 44,5%, p=0,0005) et dans le bras APA (10,4% versus 5,8%, réduction relative de 44,3%, p<0,0001). En revanche, la satisfaction globale des utilisateurs était largement en faveur de l'APA en raison de sa simplicité et de sa rapidité d'utilisation (p<0.001).

La contamination par *C. difficile* des chambres de patients ayant une ICD est fréquente. La réduction de la contamination est équivalente avec l'EJ et l'APA mais la satisfaction des utilisateurs est en faveur de l'APA en raison de sa simplicité d'utilisation.

COUTURIER J, FOUQUET C, SYED ZAIDI R, ECKERT C, BARBUT F.

Comparaison de l'activité in situ de l'hypochlorite de sodium et d'un détergent-désinfectant vis-à-vis des spores de Clostridium difficile : résultats d'une étude prospective en cross over.

XVIIIe Congrès de la SFHH,

Marseille, 7-9 Juin, 2017 (Communication orale)

6-1-2-4 **PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de *C. difficile* isolées dans une population de prématurés**

Cette étude se fait en collaboration avec l'équipe EA 4065 : Ecosystème intestinal, probiotiques et antibiotiques, Paris V (Pr M.J. Butel, Dr J. Aires, L. Ferraris).

Si le portage asymptomatique de *Clostridium difficile* est élevé chez le nouveau-né, il n'existe pas de données concernant les nouveau-nés prématurés (NPP) dont la période d'hospitalisation peut être prolongée. L'objectif était d'analyser la fréquence et la cinétique de colonisation par *C. difficile* des NNP pendant la 1^{ère} année de vie et de caractériser les souches isolées.

Une étude prospective longitudinale et monocentrique (Saint Vincent de Paul, Paris) a été menée sur une population de 124 NNP sains (inclusions 2008-2009). Les prélèvements de selles correspondaient aux périodes d'hospitalisation (1S: 1 semaine (≤ 8 jours) (nombre d'enfants prélevés, n=85) ; 1M : 1 mois (20j-40j) (n=84); SH : sortie de l'hôpital (j4-j149) (n=113)) et post hospitalisation (1-3 mois, n=38 ; 3-6 mois, n=23 ; 6-9 mois, n=27 ; 9-12 mois, n=23 ; >12 mois, n=34). *C. difficile* a été recherché sur milieu sélectif. La détection des toxines dans les selles a été réalisée par un test immunoenzymatique. Les souches ont été caractérisées par PCR-ribotypage et PCR-multiplex (gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB* et *tpi*).

Sur 379 échantillons analysés, 199 (52,5%) étaient positifs à *C. difficile* en culture. Parmi ces échantillons, 10 étaient positifs avec une souche toxigène (5%) et 189 avec une souche non toxigène (NT) (95%). Les souches toxigènes ont toutes été isolées de selles prélevées après la sortie de l'hôpital. La fréquence de colonisation par les souches NT était de 20, 61, et 60% respectivement pour les prélèvements à 1S, 1M et SH. La majorité (94%) des souches NT appartenait aux PCR-ribotypes (PR) FR082 et (CE)032. Après la sortie de l'hôpital et avant 12 mois, la proportion de NNP colonisés était proche de 70% (PR FR082 et (CE)032 majoritairement) ; après 12 mois, la fréquence diminue à 53% et s'accompagne d'une augmentation du nombre de PR identifiés. L'étude de la cinétique de colonisation a permis de montrer qu'un même NNP peut être colonisé par différents PR au cours du temps.

Pendant la période d'hospitalisation les NNP se colonisent avec des souches de *C. difficile* NT avec une fréquence élevée. La fréquence de colonisation tend à diminuer après la sortie de l'hôpital et se caractérise par une diversification des PR et l'apparition de souches toxigènes.

Laurent Ferraris, Jeanne Couturier, Catherine Eckert, Johanne Delannoy, Frédéric Barbut, Marie José Butel, Julio Aires

Neonates' asymptomatic C. difficile colonization: frequency, kinetics and isolates characterization.

Clin. Infect. Dis. 2018 submitted

6-1-2-5 **Etude FOCUS : utilisation de la fidaxomicine en France**

Soutien financier : laboratoire Astellas

L'objectif de cette étude est l'évaluation des pratiques de prescriptions de la fidaxomicine (Dificlir[®]) en France au regard de son indication remboursable c'est-à-dire le traitement de l'infection documentée à *Clostridium difficile* (ICD).

Ont été inclus dans cette étude tous les patients ayant eu une prescription de fidaxomicine entre le 1^{er} août 2014 et le 31 janvier 2015. Une ICD était définie par 1) un tableau clinique compatible avec une infection (diarrhée ou ileus) et la preuve microbiologique de la présence de toxines ou d'une souche toxigène dans les selles en l'absence d'autres causes évidentes de diarrhée ou 2) la présence de pseudomembranes au cours de l'examen endoscopique.

Au total, 202 patients (âge moyen 66,0 ans \pm 18,7 ans, 61,2% de femmes) ont été inclus. Une ICD était documentée chez 95% des patients qui ont reçu de la fidaxomicine (192/202; IC 95% 91,1–

97,6). La majorité des patients (86,8%) était hospitalisée au moment de la prescription, principalement dans des services de médecine (55,0%), de réanimation (15,0%), de gériatrie, rééducation ou long séjour (11,5%). Les méthodes de diagnostic utilisées étaient l'identification d'une souche toxigène par culture toxigénique ou PCR (49,2%), la recherche couplée de toxines libres dans les selles et la culture toxigénique (33,9%) et la recherche unique de toxines libres (14,3%).

En situation réelle, la fidaxomicine a été prescrite pour une ICD documentée chez 95% des patients d'un échantillon représentatif des hôpitaux français.

GALPERINE T., BOUEE S., GOURDON M., BARBUT F.

Real-world evaluation of fidaxomicin for treatment of Clostridium difficile infection in France: A retrospective drug utilization study (FOCUS) .

[Evaluation de l'utilisation de la fidaxomicine pour le traitement de l'infection à C. difficile en France; une étude rétrospective des pratiques de prescriptions (FOCUS)]

Thérapie 2018, soumis

6-1-2-6 *Etude QALIFF : Qualité de vie des patients infectés par C. difficile.*

Soutien financier : laboratoires MSD

L'impact de l'infection à *Clostridium difficile* (ICD) sur la qualité de vie des patients est peu évalué. Une étude observationnelle a été conduite dans 7 établissements de santé en 2016 pour évaluer le retentissement de l'ICD à l'aide de deux questionnaires de qualité de vie : le EQ5D (non spécifique) et le Cdiff 32 (spécifique de l'ICD). Ces questionnaires ont été remplis à 7± 2 jours après le diagnostic d'ICD. Le questionnaire Cdiff 32 comprend 32 questions explorant les domaines physique, social et mental du patient. Chaque question est cotée de 0 (pire qualité de vie) à 100 (meilleure qualité de vie). 80 patients ont été inclus : l'âge médian était de 71 ans et 45% des patients étaient des hommes. Le score global Cdiff32 était de 50.4 (SD : 17.1) avec d'importantes variations selon les patients (min 18.3, max 90.2). L'impact le plus fort concernait les plaintes physiques (41.6), et l'anxiété (41.6). Le score global était significativement corrélé à la sévérité de l'infection (définie par le score de Zar) et les récurrences d'ICD (p=0.0154). L'analyse par régression a montré une corrélation positive entre les deux échelles de qualité de vie (R²=0.317).

BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V., DUBURCQ A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, FAGNANI F

Quality of life and utility decrement associated with Clostridium difficile infection in a French hospital setting.

Inf. Control Hosp Epidemiol., 2018 submitted

FAGNANI F, DUBURCQ A, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, JEANBAT V, BARBUT F

Quality of life and utility decrement associated with Clostridium difficile infection in French acute care facilities.

20th ISPOR Annual European Congress

Glasgow, Scotland 4-8 Novembre (poster PIN78)

BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V, DUBURCQ A, FAGNANI F.

Impact of Clostridium difficile infection on patients' quality of life: a French Hospital prospective study

IdWeek 2017

San Diego, US, 4-8 Octobre 2017 (poster1283)

6-1-2-7 *Etude DCDiff: Surmortalité liée aux infections à C. difficile*

Soutien financier : laboratoires MSD

Les études évaluant la surmortalité liée aux infections à *Clostridium difficile* (ICD) aboutissant à des résultats contradictoires, cette étude avait pour objectif d'estimer, en France, l'impact des ICD en termes de mortalité et de ré-hospitalisation.

Une cohorte historique a été constituée à partir de l'échantillon au 1/97ème de la base de remboursement de l'Assurance Maladie. Afin de ne sélectionner que des primo-infections à *C. difficile*, les patients hospitalisés pour la première fois avec un diagnostic principal, relié ou associé d'ICD ont été inclus entre 2007 et 2014 après exclusion de ceux hospitalisés pour cette infection en 2006. La survie et les ré-hospitalisations de ces patients ont été comparées à celles d'un groupe contrôle de patients ayant été hospitalisés sur la même période, sans diagnostic d'ICD et appariés selon un score de propension. Ce score a été calculé à partir des variables : âge, sexe, score de Charlson, durée d'hospitalisation, année d'hospitalisation et principales comorbidités. Un modèle de Cox a permis d'estimer le *hazard ratio* de décès dans le groupe infecté par *Clostridium difficile* comparativement au groupe contrôle.

482 patients ayant eu une ICD ont été appariés à 964 témoins. Les 2 groupes étaient similaires au regard des caractéristiques ayant contribué au calcul du score de propension. Une augmentation statistiquement significative du risque de décès a été observée dans le groupe de sujets atteints d'une ICD avec un *hazard ratio* non ajusté de 1,65 (IC95%=[1,33 ; 2,04]) et ajusté de 1,58 (IC95%=[1,27 ; 1,97]). Les risques relatifs ajustés de décès étaient 1,78 (IC95%=[1,18;2,70]) à 28 jours, 1,52 (IC95%=[1,17;1,98]) à 3 mois, 1,52 (IC95%=[1,20;1,93]) à 6 mois et 1,64 (IC95%=[1,32;2,03]) à 12 mois. Les analyses de sensibilité réalisées ont abouti à des résultats similaires et statistiquement significatifs. Les proportions de sujets ré-hospitalisés dans l'année ayant suivi l'hospitalisation initiale étaient de 52,5 et 41,2% ($p < 0,0001$) et les nombres moyens de ré-hospitalisations étaient de 5,5 et 3,2 ($p < 0,0001$) respectivement dans les groupes ICD et contrôle.

Les ICD sont responsables d'une surmortalité et d'une ré-hospitalisation plus fréquente en comparaison à une population similaire en termes d'âge, de sexe, de comorbidités et de durée d'hospitalisation.

BARBUT F, BOUÉE S, LONGEPIERRE L, GOLDBERG M, BENSOUSSAN C, LEVY-BACHELOT L.

Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with Clostridium difficile infection: a French Health Insurance Database analysis.

J Hosp Infect. 2018 Jan;98(1):21-28

6-1-2-8 *Microbiological support to European surveillance of Clostridium difficile infections (2016-2018)*

Soutien financier : ECDC

Ce projet est organisé sous l'égide de l'Université de Leiden (E. Kuijper) et implique un consortium de 4 laboratoires de référence (Royaume-Uni, Autriche, Pays-Bas et France). Il est financé par l'ECDC.

Les objectifs de ce projet sont d'améliorer les stratégies de diagnostic des infections à *C. difficile* des laboratoires des Etats Membres, et d'améliorer les capacités des laboratoires à typer les souches de *C. difficile*. Notre laboratoire intervient dans 2 workpackages (Work package 1: Increase of CDI diagnostics and PCR ribotyping by train-the-trainer activities in EU/EEA Member States, and WP4: « Monitor and maximise the effectiveness of train-the-trainer activities”).

6-1-2-9 *Impact du DAV132 sur les tests diagnostiques de C. difficile*

Soutien financier : laboratoires Davolterra

Nous avons évalué l'impact du DAV132 sur les tests diagnostiques pour *C. difficile* (incluant les tests immuno-enzymatiques [EIA] pour la détection de la glutamate déshydrogénase [GDH] et des toxines A/B, et les tests d'amplification génique [NAAT] pour *Clostridium difficile*). Nous avons utilisé pour cela des selles de 3 volontaires sains ayant absorbé du DAV 132 prélevées à D1 (avant traitement), D3 (3 jours après le début du traitement) et D9 (2 jours après la fin du traitement par le DAV132).

Le DAV132 n'affecte pas les tests de détection immuno-enzymatique de la GDH et des toxines. Les résultats vis-à-vis des tests de biologie moléculaire sont plus contrastés. Lorsque les selles de patients avec une ICD sont mélangées vol/vol avec celles de volontaires sains ayant pris du DAV132, les résultats sont qualitativement identiques aux selles natives mais on observe une légère diminution des CT pour la détection de la toxine B et des gènes des contrôles internes de PCR.

6-1-2-10 *Prévalence des souches de Clostridium difficile productrices de toxine binaire en France*

Cette étude est pilotée par Y. Caspar et Max Maurin (Grenoble) et financée par les laboratoires Cepheid

Les données concernant la prévalence de la toxine binaire chez les souches autres que le PCR ribotype 027 sont relativement limitées en France. La toxine binaire a été récemment incriminée comme un facteur pouvant potentialiser les effets des toxines A et B et conduire à des formes plus sévères d'infections. Une étude multicentrique rétrospective a été conduite auprès de 9 laboratoires (Paris, Lyon, Grenoble, Nantes, Montpellier, Lille, Boulogne-Billancourt and Roubaix) utilisant le GeneXpert *C. difficile* BT comme méthode de diagnostic des ICD. Ce test dépiste le gène *tcdB*, *cdtB* et une délétion en position 117 dans le gène régulateur *tcdC*. Un total de 10154 selles a été analysé entre janvier et juin 2017 : la toxine B a été retrouvée dans 1123 selles (11.1%). La toxine binaire a été détectée dans 177/10154 échantillons de selles (1,7%) mais associée à la présence potentielle du clone 027 dans 21/177 (11.9%) des souches seulement. Parmi les 1123 souches produisant le toxine B, 153 non-027 souches (13.6%) produisaient la toxine binaire. La présence de la toxine binaire était plus importante dans le Sud de la France. Par ailleurs, 3 souches ne produisaient que la toxine binaire.

CASPAR Y., **BARBUT F.**, LALANDE V., ECKERT C., WALLET F., GRANDBASTIEN B., BEMER P., GIBAUD-PAPIN S., VACHEE A., TEISSIER G., ROUX A.-L., CHANARD E., GHOLIZADEH J., VIEILLEFOND V., MAURIN M.

Prevalence of binary toxin –producing strains in Clostridium difficile infections, France 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Madrid, Espagne , 21-24 avril 2017 (Poster #P2775).

6-2 Publications et communications 2017

6-2-1 Publications et communications du CNR

6-2-1-1 Publications nationales

- Aurélie VENTUJOL, Anouk DECORS, Caroline LE MARÉCHAL, Virginie ALLAIN, Christelle MAZUET, Marie-Hélène BAYON-AUBOYER, Eva FAURE, Matthieu GUILLEMAIN, Sophie LE BOUQUIN, Rozenn SOUILLARD

Le botulisme dans l'avifaune sauvage en France de 2000 à 2013
Réseau SAGIR, 2017, Surveillance sanitaire de la faune sauvage en France.
Lettre n° 186. Ed. Office national de la chasse et la faune sauvage.

- Aurélie VENTUJOL, Anouk DECORS, Caroline LE MARÉCHAL, Jean-Yves TOUX, Virginie ALLAIN, Christelle **MAZUET**, Marie-Hélène BAYON-AUBOYER, , Sophie LE BOUQUIN, Rozenn SOUILLARD
Le botulisme aviaire en France : Etude des cas signalés dans la faune sauvage et dans les élevages par deux réseaux de surveillance entre 2000 et 2013
Epidémiologie et Santé Animale 2017, 72, 85-102.

6-2-1-2 **Publications dans des revues internationales à comité de lecture**

- Relun A, Dorso L, Douart A, Chartier C, Guatteo R, **Mazuet C**, Popoff MR, Assié S.
A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C *Clostridium botulinum* spores on a farm with dairy and poultry operations.
Epidemiol Infect. 2017 Dec;145(16):3477-3485
- Rasetti-Escargueil C, Avril A, Miethe S, **Mazuet C**, Derman Y, Selby K, Thullier P, Pelat T, Urbain R, Fontayne A, Korkeala H, Sesardic D, Hust M, Popoff MR.
The European AntibotABE Framework Program and Its Update: Development of Innovative Botulinum Antibodies.
Toxins (Basel). 2017 Oct 2;9(10)
- Féraudet-Tarisse C, **Mazuet C**, Pauillac S, Krüger M, Lacroux C, Popoff MR, Dorner BG, Andréoletti O, Plaisance M, Volland H, Simon S.
Highly sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of Clostridial epsilon toxin in complex matrices.
PLoS One. 2017 Jul 11;12(7)
- Connan C, Voillequin M, Chavez CV, **Mazuet C**, Leveque C, Vitry S, Vandewalle A, Popoff MR.
Botulinum neurotoxin type B uses a distinct entry pathway mediated by CDC42 into intestinal cells versus neuronal cells.
Cell Microbiol. 2017 Aug;19(8)
- Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, Cuervo P, Cheng LW, Derman Y, Dorner BG, Fisher A, Hill KK, Kalb SR, Korkeala H, Lindström M, Lista F, Lúquez C, **Mazuet C**, Pirazzini M, Popoff MR, Rossetto O, Rummel A, Sesardic D, Singh BR, Stringer SC.
Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature.
Toxins (Basel). 2017 Jan 18;9(1)
- Le Maréchal C, Rouxel S, Ballan V, Houard E, Poezevara T, Bayon-Auboyer MH, Souillard R, Morvan H, Baudouard MA, Woudstra C, **Mazuet C**, Le Bouquin S, Fach P, Popoff M, Chemaly M.
Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism.
PLoS One. 2017 Jan 11;12(1)

6-2-1-3 **Congrès, workshops, séminaires**

- Séminaire du Réseau National des Laboratoires BIOTOX-PIRATOX
Institut Pasteur, Paris, 27 septembre 2017
- Séminaire des CNR-LNR
SPF, Saint Maurice, 17 novembre 2017

- Séminaire des CNR
Charenton, 16 novembre 2017
- Réunion d'information ANSM: Dossiers MOT
ANSM, Saint Denis, 20 octobre 2017
- Congrès de la SFM
Parc de la Villette, 9 au 11 octobre 2017
- H2020_KO Meeting EuroBioTox
RKI, Berlin, 18 au 20 juin 2017
C. Mazuet : Présentation du WP « Animal replacement methods »
- 6th Botulinum Toxin Kongress
Baden Baden, du 4 au 6 juin 2017
C. Mazuet (conférence sur invitation) : « Botulism in France: novel concepts of detection reveal novel BoNT subtypes”

6-2-2 Publications et communications du Laboratoire associé *Clostridium difficile*

6-2-2-1 Publications nationales

- BARBUT F, GATEAU C, COUTURIER J.
Prévention et contrôle des infections à *Clostridium difficile*
Hygienes 2017, XX, 5, 281-289

6-2-2-2 Publications internationales

- SOKOL H, LALANDE V, LANDMAN C, BOURRIER A, NION-LARMURIER I, RAJCA S, KIRCHGESNER J, SEKSIK P, COSNES J, **BARBUT F**, BEAUGERIE L.
Clostridium difficile infection in acute flares of inflammatory bowel disease: A prospective study.
Dig Liver Dis. 2017 Jan 30. pii: S1590-8658(17)30189-5. doi: 10.1016/j.dld.2017.01.162
- KHANAFER N., VANHEMS P., BARBUT F., LUXEMBURGER C, CDI01 study group.
Factors associated with *Clostridium difficile* infection : a nested case-control study in a three year prospective cohort.
Anaerobe 2017, 44:117-123.
- M. DOUFAIR, C. ECKERT, L. DRIEUX, C. AMANI, L. BODIN, H. CORDEL, M. DENIS, JD. GRANGE, G. ARLET, F. BARBUT
Clostridium difficile bacteremia: report of two cases in French hospitals and systematic review of the literature
ID cases 2017, 8, 54-62.
- BARBUT F., GOUOT C., LAPIDUS N., SUZON L., SYED ZAIDI R., LALANDE V., ECKERT C.
Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a prospective case-control study.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2017 Dec;36(12):2423-2430

- COUTURIER J., ECKERT C., BARBUT F.
Spatio-temporal variability of the epidemic 027 *Clostridium difficile* strains in France based on MLVA typing.
Anaerobes 2017, Aug 12;48:179-183.
- KRUTOVA M., KINROSS P., BARBUT F., HAJDU A., WILCOX M., KUIJPER E.
How to: Surveillance of *Clostridium difficile* infections.
Clin Microbiol Infect. 2017 Dec 20. pii: S1198-743X(17)30681-X. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.008. [Epub ahead of print] Review.
- GATEAU C., COUTURIER J., COIA J., BARBUT F.
How to: Diagnose infection caused by *Clostridium difficile*
Clin Microbiol Infect. 2017 Dec 18. pii: S1198-743X(17)30678-X. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.005. [Epub ahead of print]
- J. COUTURIER, K. DAVIES, C. GATEAU, F. BARBUT,
Ribotypes and new virulent strains across Europe ».
In: Mastrantonio P., Rupnik M. (eds) « Updates on *Clostridium difficile* in Europe »
Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1050. Springer, Cham, 2018

6-2-2-3 *Communications nationales*

- COUTURIER J., FOUQUET C., SYED ZAIDI R., ECKERT C., BARBUT F.
Comparaison de l'activité in situ de l'hypochlorite de sodium et d'un détergent-désinfectant vis-à-vis des spores de *Clostridium difficile* : résultats d'une étude prospective en cross over.
28ème Congrès de la société française d'Hygiène Hospitalière.
Nice, 7-9 juin 2017 (communication orale).
- GUERY B., BARBUT F., BOUTOILLE D., MARIE ROGUE A., VACHEE A., VANHEMS P., VANJAK D.
pour le réseau National DIFTEC.
La prise en charge des infections à *Clostridium difficile* : premières données du réseau national DIFTEC
18èmes Journées Nationales d'Infectiologie
Saint-Malo, 21-23 juin 2017 (communication orale).
- KHANAFER N., DEMONT C., BARBUT F., VANHEMS P.
Complications et pronostic des diarrhées à *C. difficile* : une cohorte prospective
18èmes Journées Nationales d'Infectiologie
Saint-Malo, 21-23 juin 2017 (accepté en communication orale).
- GATEAU C., COUTURIER J., LALANDE V., ECKERT C., BARBUT F.
Evaluation of a molecular assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* isolates.
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Paris, 18-19 décembre 2017 (Poster).
- BARBUT F., GALPERINE T., VANHEMS P., LE MONNIER A., JEANBAT V., DUBURQ A., FAGNANI F.
Impact de l'infection à *C. difficile* sur la qualité de vie des patients : une étude prospective multicentrique française.
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Paris, 18-19 décembre 2017 (Communication orale).

6-2-2-4 *Communications internationales*

- AIRES J., COUTURIER J., FERRARIS L., SYED ZAIDI R., BARBUT F., BUTEL M-J.
Premature neonates and asymptomatic *Clostridium difficile* carriage: frequency, kinetics and isolates characterization
50th European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
Prague, République Tchèque, 10-13 Mai 2017 (communication orale 532).
- KHANAFER N., VANHEMS P., BARBUT F., LUXEMBURGER C. and CDI01 STUDY GROUP
Factors associated with *Clostridium difficile* infection: a nested case-control study in a three-year prospective cohort.
27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
Vienne, Autriche, 22-25 avril 2017 (Poster #P2037).
- KHANAFER N., VANHEMS P., BARBUT F., DEMONT C. and CDI01 STUDY GROUP
Outcomes of diarrhea suspected to be related to *Clostridium difficile* in a French university hospital
27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
Vienne, Autriche, 22-25 avril 2017 (Poster P2038).
- DAVIES K., DAVIS G., BARBUT F., ECKERT C., PETROSILLO N., PISAPIA R., REIGADAS-RAMIREZ E., BOUZA E., BERGER F., HERRMANN M., WILCOX M.
Multivariate analysis of factors affecting *Clostridium difficile* infection rates; the more you look, the more you find; but should you believe what you see?
Vienne, Autriche, 22-25 avril 2017 (Communication orale OS0221).
- KNIGHT DR, ANDROGA GO, BARBUT F, ECKERT C, JOHNSON S, SPIGAGLIA P, TATEDA K, TSAI PJ AND RILEY TV
Genomic and evolutionary analysis of *Clostridium difficile* sequence type 11: a genetically diverse lineage of significant One Health importance
Clost Path 2017.
- FAGNANI F, DUBURCQ A, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, JEANBAT V, BARBUT F
Quality of life and utility decrement associated with *Clostridium difficile* infection in French acute care facilities.
20th ISPOR Annual European Congress
Glasgow, Scotland 4-8 Novembre (poster PIN78)
- BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V, DUBURCQ A, FAGNANI F.
Impact of *Clostridium difficile* infection on patients' quality of life: a French Hospital prospective study
IdWeek 2017
San Diego, US, 4-8 Octobre 2017 (poster1283)

6-2-2-5 *Conférences sur invitation*

- ◆ Congrès nationaux

BARBUT F.,

Actualités dans le diagnostic des ICD

Symposium « Prise en charge des infections à *Clostridium difficile* : du nouveau pour faire barrage aux récurrences »

18^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie

Saint-Malo, 21-23 juin 2017

BARBUT F.,

Poids de l'infection à *C. difficile* en France et dans le monde

Symposium « Nouveaux enjeux dans la prise en charge de l'ICD »

18^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie

Saint-Malo, 21-23 juin 2017.

BARBUT F.

Place de la transplantation de microbiote fécal (FMT) dans les infections à *Clostridium difficile*

Journées Alain Feuillu

Saint-Malo, 4 mars 2017

BARBUT F.

Actualités sur *Clostridium difficile*

XIII^{ème} journées de Microbiologie clinique

Paris, 14 septembre 2017

BARBUT F.

Transplantation de microbiote fécal (FMT) dans les infections à *Clostridium difficile*

Congrès de la société française de microbiologie

Paris, 9-11 octobre 2017.

COUTURIER J.

Infections à *Clostridium difficile* : épidémiologie, diagnostic, prévention

17^{ème} journée de prévention des infections associées aux soins

Caen, 10 Octobre 2017

BARBUT F.

Poids de l'infection à *C. difficile* à travers le monde

19^{ème} journée régionale d'hygiène hospitalière

Clermont Ferrand, 13 octobre 2017

BARBUT F.

Diagnostic, prévention et traitement de l'infection à *C. difficile*

19^{ème} journée régionale d'hygiène hospitalière

Clermont Ferrand, 13 octobre 2017

◆ Congrès internationaux

BARBUT F.

Clinical and Economic Consequences of Recurrent CDI

25th UEG (United European Gastroenterology)

Barcelone, Espagne, 29 octobre -2 novembre 2017

6-2-2-6 *Autres*

CH23-BARBUT F., DONSKEY CJ.

Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*

In "Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice",

Edited by David H. Persing *et al.*, 3rd Edition

2016 ASM Press, Washington, DC. 10.1128/9781555819071.ch16 (p185-196).

KUIJPER E., **BARBUT F.**

« Clostridium »

In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press

2018 sous presse

7-COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

Nous coopérons activement et efficacement avec le Laboratoire National de Référence (LNR) (ANSES Ploufragan) qui participe au diagnostic et à la surveillance du botulisme animal en France, et en particulier aviaire :

- 1) Pour valider la méthode de détection de *C. botulinum* par PCR dans les prélèvements animaux, nous leur avons transmis une souche de référence de *Clostridium botulinum* de type E via une autorisation de cession de souche MOT par l'ANSM. La validation de cette méthode de diagnostic a fait l'objet d'une publication en 2017 (cf. liste des publications).
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications et publications en 2017.
- 3) Un projet commun entre le LNR, le CNR et son laboratoire associé a été soumis à l'appel d'offre France Agrimer en octobre 2017 (cf Projet DiaBloClo chapitre 8) : *Caractérisation de souches de C. botulinum et C. difficile au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.*
- 4) Une étude du portage sain de *Clostridium botulinum* chez le porc a démarré (cf. Programme d'activité)

8- PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019

8-1 Programme du CNR Bactéries anaérobies et botulisme

8-1-1 Bactériologie anaérobie

8-1-1-1 Expertise en bactériologie anaérobie

◆ Identification et typage des souches de bactéries anaérobies

Le CNR assurera les identifications bactériennes et les toxinotypages des souches d'anaérobies qui lui sont adressées sur la base des connaissances actualisées dans ce domaine.

Notre laboratoire a jusqu'à présent réalisé l'identification des souches courantes et peu courantes de bactéries anaérobies adressées par les laboratoires d'analyses et de biologie médicale. Les techniques utilisées (séquençage notamment du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie), ont été utilisées pour plusieurs groupes bactériens. Il faut souligner l'abondance et l'extrême diversité des bactéries anaérobies, plus de 80 genres et 500 espèces actuellement identifiées. La caractérisation des souches d'intérêt médical repose aussi sur la mise en évidence des gènes potentiels de virulence (toxines, facteurs d'adhésion, flagelles, enzymes hydrolytiques ...) et des gènes d'antibiorésistance. Ces techniques notamment basées sur des amplifications par PCR de gènes spécifiques ont permis d'améliorer les identifications et caractérisations des souches, notamment l'identification de nouveaux genres et espèces. Cependant, la complexité et le nombre de gènes ciblés pour ces caractérisations ont considérablement augmenté, plus de 30 pour *C. perfringens* par exemple. Etant donné l'amélioration des techniques et procédés de séquençage de génomes complet et la plus grande facilité d'accéder à ces ressources via la structure PibNet, nous nous orienterons de plus en plus vers du séquençage systématique de génomes complets des souches à identifier et du traitement bioinformatique des données.

En parallèle, une approche rapide d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est en cours. Elle permet de valider cette technique qui est utilisée par de nombreux laboratoires et aussi de compléter la base de profils de spectrométrie pour des espèces bactériennes non encore répertoriées.

Les axes d'étude privilégiés concerneront une approche génétique plus détaillée incluant des études phylogénétiques des souches isolées de façon à apprécier la variabilité génétique et à permettre leur traçabilité pour déterminer dans la mesure du possible les voies ou les modes de transmission de ces agents.

◆ Typage toxinique des souches de bactéries anaérobies

Les facteurs majeurs de virulence des souches de bactéries anaérobies sont des toxines, qui sont le plus souvent sécrétées. La grande majorité des toxines de bactéries anaérobies ont été caractérisées au niveau génétique, ce qui permet d'utiliser des méthodes de biologie moléculaire pour la détection de leurs gènes. Nous avons développé des méthodes de mise en évidence et d'identification des gènes des toxines par amplification génique (PCR) pour le typage toxinique des bactéries anaérobies, notamment les *Clostridium* toxinogènes, les *Bacteroides* entérotoxinogènes, les *Fusobacterium necrophorum*. Ces techniques sont actuellement utilisées en routine pour le typage toxinique des souches adressées par les laboratoires d'analyses médicales. Cette approche se révèle être fiable, reproductible et réalisable en série et dans un délai rapide. Pour les espèces bactériennes dont le potentiel en gènes de toxines et de virulence est volumineux, comme *C. perfringens* et *C. botulinum*, nous procédons de plus en plus au séquençage de génome complet et analyse par bioinformatique des gènes d'intérêt. La présence d'un gène de toxine ne signifie pas nécessairement que la toxine est synthétisée et est fonctionnelle. Dans certains cas, le typage toxinique moléculaire est

confirmé par des tests d'activité biologique (cytotoxicité ou toxicité sur souris) et/ou des tests immunologiques (immunoblotting, ELISA). Ceci est pratiqué notamment pour les souches de *Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* toxigènes pour lesquelles nous disposons du test de létalité sur souris, (et) de tests ELISA et de cytotoxicité.

♦ **Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies notamment *Bacteroides* du groupe *fragilis***

Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta-lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*). Nous procédons à l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des bactéries anaérobies qui nous sont adressées par la technique d'antibiogramme par diffusion en gélose. Les concentrations minimales inhibitrices sont déterminées (notamment par Etest) lorsque les souches présentent des diamètres d'inhibition anormalement réduits. Nous projetons d'évaluer le système Sensititre. Ces examens sont d'un intérêt plus marqué pour les bacilles anaérobies à Gram négatif et les cocci anaérobies.

Bacteroides fragilis est l'une des principales espèces de bactéries anaérobies présentant des résistances aux antibiotiques nombreuses et préoccupantes pour le clinicien. La surveillance de la résistance fera toujours l'objet d'une attention particulière pour ces souches.

♦ **Projet ToxDetect: Development and harmonization of innovative methods for comprehensive analysis of food-borne toxigenic bacteria, ie. *Staphylococci*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens***

Les toxines bactériennes produites par *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* et *Clostridium spp.* sont responsables d'un grand nombre de foyers d'intoxication alimentaire dans l'Union européenne (près de 10 000 cas/an). Ce chiffre est probablement sous-estimé du fait :

- de la complexité de l'investigation liée à une symptomatologie commune des intoxications alimentaires impliquant une toxine (diarrhées, vomissements...)
- d'un manque cruel d'outils de détection pour l'ensemble des toxines bactériennes et facteurs de virulence potentiellement incriminés.

Ce projet européen de 4 ans (2017-2020) qui réunit l'ANSES, l'Institut Pasteur (CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme, Centre de Ressources Biologiques, Plateforme de Spectrométrie de Masse), l'INRA, BfR (Allemagne), WIV-ISP (Belgique) et NIV (Norvège) a été accepté pour financement dans le cadre de l'appel d'offre H2020/European Joint Programme (EJP) : « One Health-Emerging Diseases ».

Les objectifs:

- Le développement et l'harmonisation au niveau européen d'approches « non-NGS » pour une meilleure détection et quantification des toxines bactériennes ou des facteurs impliqués dans la virulence des bactéries toxigènes, y compris celles qui restent actuellement indétectables (menaces émergentes).
- Le développement de méthodes rapides (type « bandelettes ») permettant de discriminer les bactéries pathogènes et non-pathogènes en tant qu'outils complémentaires.
- L'organisation d'essais inter-laboratoires entre les partenaires et autres laboratoires européens pour évaluer et optimiser les méthodes développées.

En comblant certaines lacunes méthodologiques pour détecter les toxines bactériennes, et en caractérisant les bactéries toxigènes d'origine alimentaire, les résultats de ce projet contribueront à une protection accrue de la santé du consommateur.

8-1-1-2 *Botulisme humain*

◆ **Diagnostic du botulisme**

La surveillance du botulisme humain, qui est le plus souvent d'origine alimentaire, repose sur la confirmation biologique de cette affection incluant le typage de la toxine. Les essais sont réalisés à partir d'échantillons biologiques (sérum, selles) provenant des malades suspects et d'échantillons alimentaires afin d'identifier l'aliment responsable et de prévenir d'autres contaminations. Notre laboratoire a acquis une longue expérience dans le diagnostic du botulisme. Nous possédons les équipements et réactifs appropriés ainsi qu'un personnel spécialement formé et encadré pour ce type de diagnostic qui sera poursuivi pendant la période à venir.

Nous continuerons de répondre au quotidien à toutes demandes téléphoniques ou par messagerie électronique concernant des renseignements utiles à propos du botulisme et autres affections à bactérie anaérobie auprès de cliniciens, biologistes des hôpitaux ou autres laboratoires d'analyse.

◆ **Développement de nouvelles méthodes de mise en évidence et de caractérisation des toxines botuliques**

Le développement et l'évaluation de méthodes alternatives au test *in vivo* pour la détection et le typage des toxines botuliques se poursuivront. Ces méthodes alternatives comprennent:

- des méthodes basées sur l'activité enzymatique des toxines botuliques (protéolyse de substrats spécifiques: SNAP25, VAMP2 et syntaxin) et détection des produits de clivage par Biacore ou ELISA.

- Une variante de la méthodologie précédente est basée sur une détection des produits de clivage par spectrométrie de masse.

- des méthodes ELISA. Nous avons développé des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre les différents types de toxines botuliques. Les tests ELISA que nous avons testés avec ces anticorps sont très spécifiques mais restent moins sensibles que le test *in vivo*. Cependant, ces anticorps se révèlent très précieux pour améliorer la sensibilité des méthodes basées sur l'activité enzymatique, en permettant de développer une étape d'immuno-concentration.

8-1-1-3 *Botulisme animal*

◆ **Etude du portage sain de *C. botulinum* chez le porc**

Contexte

Le CNR a isolé des souches de *C. botulinum* de type B4 (non protéolytique) à partir de jambon artisanaux en lien avec des foyers de botulisme humain dans différentes régions de la France. Le séquençage de ces souches a montré qu'elles sont très clonales. Ce résultat est surprenant, les souches de *C. botulinum* des groupes I et II présentent en effet en général une variabilité génétique marquée (Mazuet et al., 2016).

Il n'y a pas de données disponibles sur la prévalence de *C. botulinum* chez le porc en France dans la littérature. Les souches qui pourraient être présentes chez l'animal et constituer une source de contamination des produits finis lors de l'abattage ou de la transformation n'ont jamais été caractérisées en France.

Objectifs

L'objectif de ce projet est d'évaluer la prévalence de *C. botulinum* chez le porc en France, d'isoler si possible des souches toxigènes et de les caractériser afin de les comparer aux souches impliquées dans les épisodes de botulisme humain.

Ce projet se passera en 2 temps : une préenquête sera menée afin d'obtenir une première série de données puis une recherche de financement pourra être initiée en fonction des résultats de cette préenquête.

Préenquête :

L'unité HQPAP dispose de fèces de porcs prélevés à l'abattoir en 2012 dans le cadre d'un projet européen SAFEORGANIC. Ces fèces ont été conservées au congélateur depuis leur collecte. Il s'agit de prélèvements de porcs biologiques et conventionnels.

Ces prélèvements seront expédiés par l'unité HQPAP au CNR qui se chargera de détecter la présence de *Clostridium botulinum*, d'isoler les éventuelles souches toxigènes, de les caractériser (NGS et analyse MLST) et de les comparer à celles isolées de foyers de botulisme.

◆ **Projet DiaBoClo : Caractérisation de souches de *C. botulinum* et *C. difficile* au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.**

La méthanisation à la ferme est en plein essor en Europe et notamment en France. Ce procédé de digestion anaérobie permet de valoriser les effluents d'élevage via la production de biogaz, valorisable sous forme d'énergie. Le digestat issu de la méthanisation est utilisé comme fertilisant des terres agricoles.

L'impact de la digestion anaérobie sur les bactéries pathogènes et notamment les bactéries anaérobies sporulantes a été peu étudié pour le moment. Cet aspect quelque peu polémique, notamment vis-à-vis du devenir de *C. botulinum* au cours de la méthanisation est un enjeu pour la filière bovine dont les effluents présentent un potentiel fort pour la méthanisation agricole (Degueurce et al., 2016). Le projet Clodia (financement ADEME 2016-2019) a permis de démontrer la présence de deux espèces de clostridies pathogènes dans les intrants et digestats de méthaniseurs à la ferme avec une prévalence de 67 % pour *C. botulinum* et de 100 % pour *C. difficile* lors d'une pré-enquête menée en 2017 dans 5 méthaniseurs à la ferme (Le Maréchal et al., 2017). La forte prévalence de ces deux pathogènes observée au cours de la digestion anaérobie au cours de cette pré-enquête amène à s'interroger sur le risque représenté par les souches pour la santé humaine, la santé animale et la contamination de l'environnement. Il n'existe actuellement aucune donnée relative aux caractéristiques des souches de *C. botulinum* et de *C. difficile* qui circulent dans la filière bovine, en particulier celles retrouvées dans les effluents bovins.

Le projet DiaBoClo a pour objectifs de :

- i) déterminer la prévalence de *C. botulinum* et *C. difficile* dans la filière bovine via l'analyse de contenus intestinaux de bovins,
- ii) de déterminer les caractéristiques des souches de *C. botulinum* et *C. difficile* isolées à partir des contenus intestinaux bovins,
- iii) de déterminer les caractéristiques des souches de *C. botulinum* et *C. difficile* isolées à partir des intrants et digestats de méthaniseur à la ferme de la filière bovine,
- iv) de comparer les souches isolées de la filière bovine, des méthaniseurs alimentés en effluents bovins et des souches impliquées dans les cas cliniques humains

Le projet DiaBoClo permettra de connaître les caractéristiques (sensibilité aux antibiotiques, typage des souches via l'utilisation de méthodes de référence et du séquençage des génomes d'une sélection de souches) des souches de *C. botulinum* et de *C. difficile* qui circulent dans la filière bovine et qui sont susceptibles d'être disséminées dans l'environnement lors de l'épandage des fumiers ou des digestats de méthanisation.

Degueurce, A., Capdeville, J., Perrot, C., Bioteau, T., Martinez, J., Peu, P., 2016. Fumiers de bovins, une ressource à fort potentiel pour la filière de méthanisation en France ? Sciences Eaux and Territoires : la Revue du IRSTEA Article hors-série numéro 24, 2-9.

Le Maréchal, C., Boscher, E., Repérant, E., Rouxel, S., Poezevara, T., Houdayer, C., Nagard, B., Barbut, F., Druilhe, C., Pourcher, A.M., Denis, M. 2017. Evaluation de la contamination de digestats de

méthanisation par des bactéries pathogènes sporulantes et non-sporulantes. In: Congrès de la société française de microbiologie, Cité des sciences et de l'industrie, Paris, 9-11 octobre.

◆ **Projet Européen EuroBioTox**

Nous sommes partenaires du projet européen EuroBioTox (« *European programme for the establishment of validated procedures for the detection and identification of biological toxins* ») dans le cadre de l'appel d'offre H2020 regroupant 13 partenaires européens et une cinquantaine de laboratoires participant à des essais inter-laboratoires. Ce projet de 5 ans (2017-2021) est coordonné par B. Dorner (Robert Koch Institut, Berlin) et fait suite au programme Equatox. Il concerne les toxines botuliques mais aussi d'autres toxines à risque d'attentats biologiques (ricine, abrine, entérotoxines de Staphylocoque, saxitoxine). Le principal objectif est la validation des méthodes de détection et d'identification des toxines ainsi que le développement d'échantillons de référence à travers les pays européens. Nous sommes notamment impliqués dans la coordination du work package "Animal replacement methods for *botulinum* neurotoxin detection".

8-2 Programme du Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Le programme d'activité pour 2018-19 est centré sur 4 activités principales :

8-2-1 Détermination des CMI d'inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de *C. difficile* et détermination du support génétique de la résistance.

Cette étude se fait en collaboration avec Paola Minoprio (IP Pasteur) et Philippe Uriac (Université de Rennes). Elle vise à étudier les concentrations minimales inhibitrices de différents inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de *C. difficile* par la méthode de dilution en milieu gélosé. Le support de la résistance sera étudié par séquençage des gènes de la proline racemase. L'activité des composés les plus actifs sera étudiée sur le modèle hamster de colite à *C. difficile* prétraité par clindamycine.

8-2-2 Apport du whole genome sequencing (WGS) dans l'épidémiologie des infections à *Clostridium difficile*.

Le typage moléculaire est un outil essentiel pour surveiller les ICD et les épidémies dans les établissements de santé. Il joue aussi un rôle clé dans la surveillance de la dissémination et de l'émergence de certains clones de *C. difficile* dans le monde. A l'heure actuelle, le ribotypage par PCR est la méthode la plus utilisée en Europe, notamment dans l'étude des épidémies au niveau local, national et européen. Néanmoins, cette méthode ne dispose pas d'un pouvoir discriminant suffisant pour obtenir une bonne compréhension de l'évolution de certains clones de *C. difficile*.

Le séquençage complet du génome (WGS : Whole Genome Sequencing ou NGS : Next Generation Sequencing) appliqué à une espèce bactérienne permet de suivre l'histoire naturelle et démographique des populations. L'analyse génomique rend ainsi possible l'identification précise des changements génétiques (souvent liés à la virulence et aux phénotypes de résistances aux antibiotiques). La comparaison des souches après WGS peut se faire soit par l'analyse des SNP (Single-Nucleotide Polymorphism - souches ayant une différence d'un seul nucléotide) soit par l'analyse du core genome MLST (cg-Multi Locus Sequence Typing - nombre de gènes du core génome présentant une différence quelle que soit sa nature). Ces méthodes sont caractérisées par un pouvoir discriminant

supérieur à celui issu des méthodes classiques de typage génétique. Le WGS est aussi très utile pour l'épidémiologie en santé publique car il permet un suivi plus précis des phénomènes de transmissions et de l'émergence de nouveaux clones. Par ailleurs, une étude a montré que le WGS pourrait produire des données pratiques dans un délai relativement court permettant d'influencer la gestion du patient et ainsi contrôler la dissémination lors d'une épidémie [9].

Cependant, il est encore difficile d'utiliser le WGS en routine comme méthode de typage moléculaire. Cette technique souffre d'inconvénients notables comme le coût de l'équipement et la complexité d'analyse des données et fait l'objet de nombreux travaux d'optimisation. Certains programmes informatiques basés sur l'analyse des souches par cg-MLST sont actuellement en cours d'évaluation tel le programme EpiSeq V2.0 que nous utiliserons dans cette thèse en collaboration avec les laboratoires BioMérieux.

Cécile Gateau s'est inscrite en thèse de science en 2017 et son sujet portera sur les aspects suivants :

- Evaluer le pouvoir discriminant du cg-MLST à partir d'une collection de souches de *C. difficile* déjà caractérisées au niveau du Centre National de Référence et appartenant aux PCR ribotypes les plus fréquents. Nous nous attacherons à comparer la phylogénie des souches générée par les deux méthodes de typage et leur cohérence.
- Investiguer une épidémie de *C. difficile* de PCR-ribotype 018 (PCR-ribotype peu fréquent) survenue dans un hôpital de l'Est de la France pour étudier le lien de clonalité entre ces souches. Celles-ci seront caractérisées par leurs phénotypes de résistances, par leur virulome (PCR multiplex) ainsi que par l'analyse des SNP (WGS-SNP) et du cg-MLST à l'aide du programme EpiSeq V2.0 (BioMérieux). L'analyse de ces souches sera comparée à des souches de même PCR ribotype isolées dans d'autres établissements de santé (donc non épidémiologiquement reliées). Cette étude permettra d'évaluer la pertinence de la phylogénie basée sur le cg-MLST.
- Etudier les récurrences d'ICD (principales complications) en comparant par analyse des SNP, les souches isolées du premier épisode et celles isolées de récurrences. Nous pourrions ainsi déterminer la fréquence des rechutes (même souche) et celle de réinfections (souches différentes).
- Déterminer la fréquence de transmission des souches de *C. difficile* dans un CHU en caractérisant systématiquement toutes les souches isolées sur une année par cg-MLST et en analysant les résultats en fonctions des données épidémiologiques des patients (analyse spatio-temporelle des séjours des patients). Nous nous intéresserons en particulier à la composante cryptique de la transmission (c'est-à-dire la transmission de la même souche sans lien évident spatial ou temporel entre les patients). Nous évaluerons la supériorité de discrimination de la phylogénie basée sur le cg-MLST par rapport au PCR ribotypage, en particulier son implémentation dans l'outil EpiSeq V2.0.

Ces projets bénéficieront de l'expertise de Biomérieux pour le WGS et l'analyse par cg-MLST (EpiSeq V2.0).

8-2-3 COMBACTE-CDI

COMBACTE CDI -CDI (**Combatting Bacterial Resistance in Europe- *Clostridium difficile* infections**) est une étude multicentrique européenne **non interventionnelle** concernant les infections à *Clostridium difficile*. Ses objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire. Le laboratoire *Clostridium difficile*

associé au CNR des anaérobies est chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Elle sera réalisée auprès de 22 laboratoires d'établissements hospitaliers.

Le principe de cette étude est simple. Il s'agit d'adresser un aliquot de **toutes les selles** (indépendamment de la prescription de *C. difficile*) reçues au laboratoire un « jour donné » (1 jour en **juin 2018** et un jour en **octobre 2018**) au **centre hospitalier de Leeds** (UK) qui recherchera systématiquement *C. difficile* et analysera les souches (PCR ribotypage, WGS). Il sera ensuite demandé aux laboratoires de compléter, après avoir recueilli le consentement du patient, des données rétrospectives cliniques concernant l'évolution de certains patients infectés par *C. difficile* et de témoins négatifs.

Cette étude est financée par le programme IMI Innovative Medicines Initiative (European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013))

8-2-4 **Evaluation de la technologie SIMOA pour la détection des toxines de *C. difficile***

La technologie SIMOA est une nouvelle méthode ultrasensible de détection immuno-enzymatique des toxines de *C. difficile*. Nous participons à une évaluation de cette méthode à partir de 132 selles de patients ayant une souche toxigène de *C. difficile* et de 135 contrôles indemnes de *C. difficile*. Cette étude se fait en collaboration avec les laboratoires bioMérieux.

9- TABLEAUX (CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME)

TABLEAU 1
Demandes d'identification de souches d'origine humaine
Fréquences par département
Période du 01/01/2017 au 31/12/2017

Département	Fréquence
03	22
06	3
10	1
13	2
17	1
20	1
25	2
27	4
28	3
31	8
33	4
34	70
37	4
38	4
39	4
44	2
49	12
54	3
57	1
58	1
59	7
60	1
62	3
65	1
66	4
67	8
69	10
71	1
73	2
74	2
75	2
77	8
82	2
83	1
92	2
94	1
95	5
France Métropolitaine	212

Département	Fréquence
DROM	
971 (Guadeloupe)	1
973 (Guyane)	3
974 (La Réunion)	3
976 (Mayotte)	2
978 (Saint Martin)	0
TOTAL DROM	9

TABLEAU 2**Répartition des souches d'origine humaine par site d'infection****Période du 01/01/2017 au 31/12/2017**

LOCALISATION	FREQUENCE
Hémoculture	22
Coproculture	73
Infection ostéo-articulaires	10
Infections cutanées et musculaires	9
Urologie / néphrologie	9
Infections intra-abdominales	11
Infections ORL	4
Infections post-opératoires	1
Gynécologie	7
Appareil Digestif	3
Sperme	9
Infections péri-rectales et périnéales	3
Stomatologie	1
Divers	13
Non Précisé	46
TOTAL	221

TABLEAU 3**Répartition des souches d'origine humaine par genre****Période du 01/01/2017 au 31/12/2017****205 souches anaérobies appartenant à 45 genres différents**

Genre	Nombre
ACTINOBACULUM	1
ACTINOMYCES	1
AKKERMANSIA	1
ALLOPREVOTELLA	2
ANAEROCOCCUS	7
ANAEROGLOBUS	4
ANAEROVORAX	1
BACILLUS	3
BACTEROIDES	11
BIFIDOBACTERIUM	1
CAMPYLOBACTER	1
CAPNOCYTOPHAGA	1
CASALTELLA	4
CLOSTRIDIUM	102
CORYNEBACTERIUM	1
CRYPTOBACTERIUM	1
DESULFOVIBRIO	1
DIALISTER	1
EZAKIELLA	3
FENOLLARIA	2
FINEGOLDIA	2
FUSOBACTERIUM	6

Genre	Nombre
GORDONIBACTER	2
HELCOCOCCUS	1
LACTOBACILLUS	4
LEPTOTRICHIA	1
MOGIBACTERIUM	8
NEGATIVICOCCUS	4
OLSENELLA	2
PARABACTEROIDES	3
PEPTONIPHILUS	3
PEPTOSTREPTOCOCCUS	1
PREVOTELLA	5
PREVOTELLACEAE	1
PROPIONIBACTERIUM	2
PROPIONIMICROBIUM	1
ROBINSONIELLA	1
SNEATHIA	1
SUTTERELLA	1
TERRISPOROBACTER	1
TISSIERELLA	1
TRUEPERELLA	1
VARIBACULUM	2
VEILLONELLA	1
Nouveau Taxon	1
TOTAL	205

TABLEAU 4
Répartition des souches d'origine humaine par espèce
Période du 01/01/2017 au 31/12/2017
205 souches anaérobies appartenant à 74 espèces
26 souches anaérobies strictes appartenant à des espèces non nommées

ESPECE	NOMBRE
ACTINOBACULUM SCHAALII	1
ACTINOMYCES ISRAELII	1
AKKERMANSIA MUCINIPHILA	1
ALLOPREVOTELLA RAVA	2
ANAEROCOCCUS PREVOTII	1
ANAEROCOCCUS SP.	5
ANAEROCOCCUS VAGINALIS	1
ANAEROGLOBUS GERMINATUS	4
ANAEROVORAX ODORIMUTANS	1
BACILLUS CEREUS	2
BACILLUS SP.	1
BACTEROIDES FRAGILIS	9
BACTEROIDES SP.	1
BACTEROIDES VULGATUS	1
BIFIDOBACTERIUM LONGUM	1
CAMPYLOBACTER SHOWAE	1
CAPNOCYTOPHAGA CANIMORSUS	1
CASALTELLA MASSILIENSIS	4
CLOSTRIDIUM BOLTEAE	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	6
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	1
CLOSTRIDIUM CHAUVOEI	1
CLOSTRIDIUM DAKARENSE	1
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	36
CLOSTRIDIUM LIMOSUM	1
CLOSTRIDIUM PARAPUTRIFICUM	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	42
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	4
CLOSTRIDIUM SUBTERMINALE	1
CLOSTRIDIUM TERTIUM	3
CLOSTRIDIUM TETANI	4
CORYNEBACTERIUM	1
CRYPTOBACTERIUM CURTUM	1
DESULFOVIBRIO SP.	1
DIALISTER INVISUS	1
EZAKIELLA SP.	3
FENOLLARIA MASSILIENSIS	2
FINEGOLDIA MAGNA	2

ESPECE	NOMBRE
FUSOBACTERIUM GONIDIAFORMANS	2
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	3
FUSOBACTERIUM RUSSII	1
GORDONIBACTER SP.	2
HELCOCOCCUS SP	1
LACTOBACILLUS DELBRUECKII	3
LACTOBACILLUS SP.	1
LEPTOTRICHIA TREVISIANII	1
MOGIBACTERIUM NEGLECTUM	1
MOGIBACTERIUM SP.	6
MOGIBACTERIUM TIMIDUM	1
NEGATIVICOCCUS MASSILIENSIS	1
NEGATIVICOCCUS SP.	1
NEGATIVICOCCUS SUCCINICIVORANS	2
OLSENELLA SP.	2
PARABACTEROIDES DISTASONIS	2
PARABACTEROIDES GORDONII	1
PEPTONIPHILUS SP.	2
PEPTONIPHILUS URINIMASSILIENSIS	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS RUSSELLII	1
PREVOTELLA DU GROUPE ORIS/BUCCAE	2
PREVOTELLA JEJUNI	1
PREVOTELLA MULTIFORMIS	1
PREVOTELLA SP.	1
PREVOTELLACEAE BACTERIUM	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	2
PROPIONIMICROBIUM LYMPHOPHILUM	1
ROBINSONIELLA PEORIENSIS	1
SNEATHIA SANGUINEGENS	1
SUTTERELLA WADSWORTHENSIS	1
TERRISPOROBACTER GLYCOLICUS	1
TISSIERELLA CARLIERI	1
TRUEPERELLA BERNARDIAE	1
VARIBACULUM CAMBRIENSE	2
VEILLONELLA PARVULA	1
NOUVEAU TAXON	1
TOTAL	205

TABLEAU 5

Souches d'origine vétérinaire : répartition par espèce
Période du 01/01/2017 au 31/12/2017

ESPECE	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	9
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	6
CLOSTRIDIUM NOVEYI	1
TOTAL	18

TABLEAU 6

Souches d'autres origines : répartition par espèce
Période du 01/01/2017 au 31/12/2017

Origine alimentaire

ESPECE	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	6 (*)
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	4 (**)
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
PAENIBACILLUS sp / BACILLUS sp	2

Origine industrielle, environnementale, collection

ESPECE	NOMBRE
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	4
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	2 (*)
CLOSTRIDIUM TETANI	1
BACTEROIDES FRAGILIS	1

* en lien avec des foyers de botulisme

** en lien avec des TIAC à *C. perfringens*

TABLEAU 7

Résistance (R+I) aux antibiotiques des souches isolées en 2017

Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

Bactéries à Gram + hors *Clostridium difficile* (54 souches) – nombre de souches résistantes (R) ou intermédiaires (I)

Espèce	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Imipenem	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
ACTINOBACULUM SCHAALII	1	1R	0	0	0	R	1R	0
ACTINOMYCES ISRAELII	1	1R *	0	0	0	0	0	1I
ANAEROCOCCUS VAGINALIS	1	0		0	0	1R	1R	0
BACILLUS CEREUS	2	2R	2R*	2R	0	0	0	2I
BIFIDOBACTERIUM LONGUM	1	1R	0	0	0	0	0	0
CASALTELLA MASSILIENSIS	1	0	1R	1	0	0	0	1
CLOSTRIDIUM spp**	37	0	0	0	1I	5R	5R	3R
LACTOBACILLUS DELBRUECKII	4	4R	0	0	0	0	0	3R
PEPTONIPHILUS SP.	1	1R	1I	0	0	1R	1R	0
PROPIONIBACTERIUM SP.	3	3R	0	0	0	1R	1R	1R
ROBINSONIELLA PEORIENSIS	1	0	0	0	0	1R	1R	1R
TRUEPERELLA BERNARDIAE	1		0	0	0	0	0	1R

* Espèces naturellement résistantes.

** *Clostridium botulinum* (11 souches), *C. butyricum* (1), *C. chauvoei* (1), *C. dakarensis* (1), *C. limosum* (1), *C. paraputrificum* (1), *C. perfringens* (9), *C. sporogenes* (4), *C. tertium* (3) et *C. tetani* (3).

Bactéries à Gram – (24 souches) – nombre de souches résistantes

Espèce	N	Métronidazole 16µg	pénicilline	Ampicilline	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Ticarilline	Mézlocilline	Tétracycline	Triméthopri-m-sulfa	Erythromycine	Imipenem	Céfalotine	Céfoxitine	Céfotaxime	Clindamycine	Rifampicine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxalactam	Moxifloxacine
BACTEROIDES spp	15	2	15	14	15	7	11	8	8	10	9	4	14	11	12	4	0	9	1	9	6
DESULFOVIBRIO spp	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
FUSOBACTERIUM spp.	3	0	1	1	1	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
PREVOTELLA spp	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1
SUTTERELLA WADSWORTHENSIS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
VEILLONELLA sp	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
LEPTOTRICHIA TREVISANII	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1

Antibiogramme spécifique à *Clostridium difficile* (36 souches) – nombre de souches résistantes (R) ou intermédiaires (I)

Caractéristiques	N	Métronidazole 16µg	Tétracycline	Erythromycine	Imipenem	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
078/126	2	0	0	1	0	2 (R)	0	1 (I)
A+, B+, CDT- (tcdC non délété)	31	0	11	5 (4R;1I)	7 (I)	25 (R)	0	10 (1R;9I)
A+, B+, CDT+ (tcdC non délété)	1	0	0	0	1(I)	1 (R)	0	0
A+, B+, CDT+ (tcdC délété) non 027/non 078	1	0	0	0	0	0	0	0
non toxigène	1	0	0	1 (R)	0	1 (R)	0	1 (R)

10- ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Le laboratoire des Anaérobies de l'Institut Pasteur a été reconnu comme Centre National de Référence des anaérobies en 1972, et il a été reconduit comme Centre National de Référence des Bactéries anaérobies et du botulisme en 2005, 2011 et 2017.

10-1 Missions et objectifs majeurs

10-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par Santé publique France (SpF), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à SpF des affections graves à anaérobies notamment à *C. difficile*) et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec SpF.

Depuis avril 2007, le laboratoire d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Hôpital St Antoine (responsable, F. Barbut) a été nommé par SpF comme laboratoire associé au CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridium difficile*. Il a été reconduit dans ses fonctions en 2011 et 2017.

Le CNRAB conduit des thèmes de recherche en relation avec ses activités d'expertise, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *C. botulinum*, techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection, l'identification et la quantification des toxines botuliques.

10-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

10-2 Equipes

10-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Effectif 2017 du CNR en Equivalent Temps Plein (ETP) et financement

Fonctions	ETP réels	Financement
Scientifique / biologiste	1	Institut Pasteur & SpF
Ingénieur	0,8	Institut Pasteur & SpF
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP	2	Institut Pasteur & SpF
Agent technique	1	Institut Pasteur
Administratif	0,25	Institut Pasteur & SpF

10-2-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

CNR *Clostridium difficile*

Hôpital Saint-Antoine
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage
34 rue Crozatier
75012 PARIS

Pr Frédéric Barbut +33 1 49 28 30 11 ou frederic.barbut@aphp.fr

Cécile Gateau +33 1 71 97 09 86 ou cecile.gateau@aphp.fr

Dr Jeanne Couturier +33 1 71 97 09 85 ou jeanne.couturier@aphp.fr

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	Professeur des universités - Praticien hospitalier	0,2	AP-HP
C. Gateau	Ingénieur hospitalier	1	SpF
J. Couturier	Assistant Hospitalo-universitaire	0,2	AP-HP
V. Lalande	Praticien Hospitalier	0,2	AP-HP
A. Youssouf	Technicienne	1	SpF
R. Syed-Zaidi	Technicienne	1	Autre
Réception/secrétariat/gestion		0,2	AP-HP

Personnel médical : 3 (ETP global : 0.6)

Personnel non médical : 4 (ETP global : 3.2)

10-3 Locaux et équipements

10-3-1 Locaux

10-3-1-1 CNR *Bactéries anaérobies et botulisme*

Rez-de-chaussée du bâtiment Guérin :

Les locaux hébergeant le CNR Anaérobies et botulisme comprennent: - 2 espaces bureaux de 7,5m² chacun.

- un laboratoire P2 de 19m² qui contient un PSM de type II
- une pièce "matériel" de 11m² renfermant 2 appareils de chromatographies en phase gazeuse, un appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec les mélanges gazeux pour l'anaérobiose, un incubateur à 37°C, une sorbonne et un combiné réfrigérateur/congélateur,
- une pièce avec un caisson souris réservée aux injections de souris pour le diagnostic du botulisme,
- une pièce réservée à la préparation des mix PCR avec une hotte PCR et un congélateur,
- une pièce "PCR" avec thermocycleurs, électrophorèses d'ADN, système de visualisation de gels Geldoc.

Une pièce commune avec une autre unité située au Rez-de-chaussée du même bâtiment renferme une chambre anaérobie.

Une pièce (17m²) réservée à la préparation et au stockage des toxines.

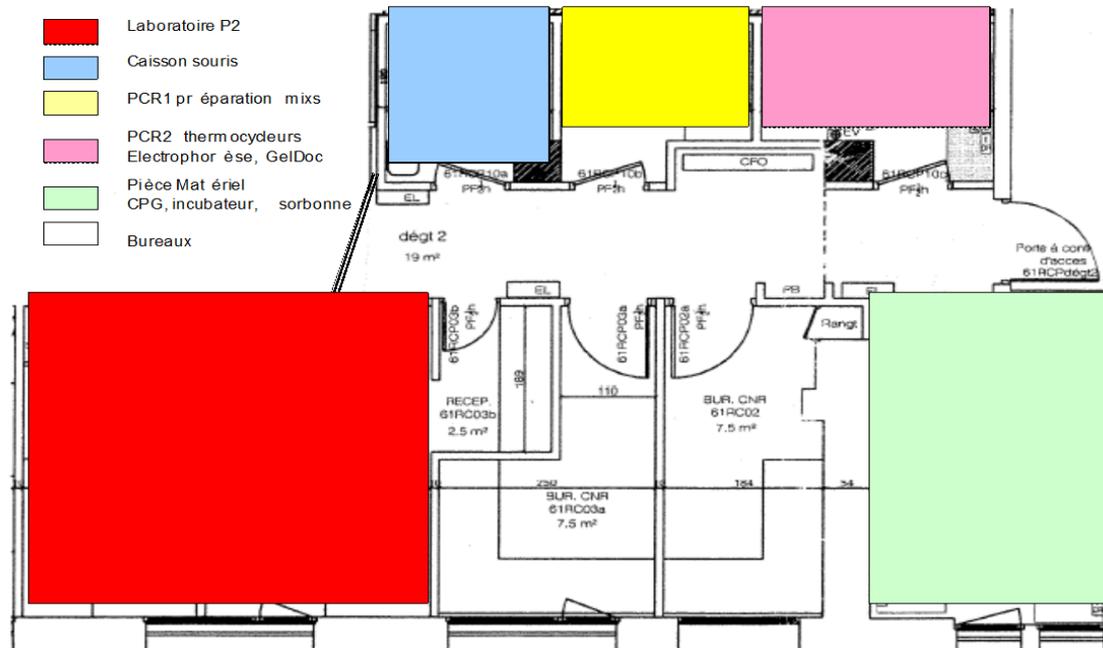


Figure : plan des locaux du CNR (rez-de-chaussée du bâtiment Guérin, Institut Pasteur)

1er étage du Bâtiment Guérin :

- Un laboratoire partagé de 55m² comportant PSM de type II, sorbonne et armoire à solvant ventilée, thermocycleurs, PCR temps réel, cuves à électrophorèse, appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec le mélange gazeux pour l'anaérobiose.
- Une pièce matériel de 11,5m² renfermant congélateurs à -80°C, centrifugeuses, incubateur.
- Une chambre froide de 9m²
- Un laboratoire P2+ (16m²) pour les cultures cellulaires, partagé avec d'autres équipes
- Deux pièces de bureaux de 15m²
- Un bureau pour le secrétariat partagé avec une autre unité.

10-3-1-2 *Laboratoire associé Clostridium difficile*

Le plan du service est représenté sur la figure 1.

Localisation :

Hôpital Saint-Antoine
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage
34 rue Crozatier
75012 PARIS

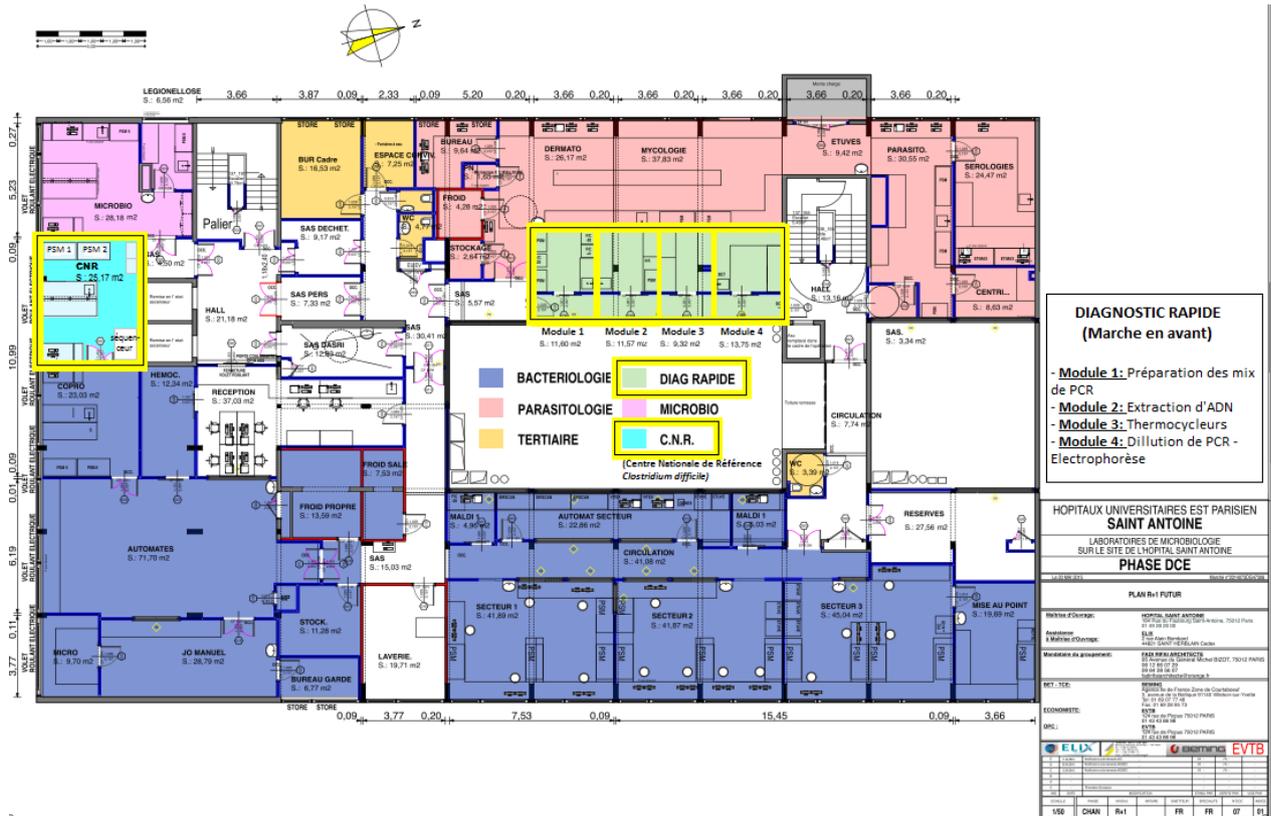


Figure 1 : plan des locaux (encadré en jaune : pièces utilisées par le personnel du CNR)

10-3-2 **Equipements**

10-3-2-1 *CNR Bactéries anaérobies et botulisme*

MATERIEL, EQUIPEMENT DE LA STRUCTURE :

Equipements de base pour la bactériologie anaérobie comprenant entre autres :

- équipements de base de bactériologie standard
- jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system).
- enceinte anaérobie.
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.
- Enceinte climatique à 37°C.
- Microscope.
- Centrifugeuses
- Bains-marie et blocs chauffants.

- Réfrigérateurs, congélateurs (-20°C).
- chromatographes en phase gazeuse pour l'identification des métabolites et des acides gras cellulaires des bactéries anaérobies.
- containers d'azote liquide et congélation -80°C pour la conservation des souches de référence et des isolats.

Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

- appareils d'amplification génique : PCR standard (2 appareils) et PCR-temps réel (2 appareils). Hottes à PCR
- cuves d'électrophorèse et générateurs
- Lecteur analyseur d'image (GelDoc 2000, BioRad).
- séquençage et clonage d'ADN.
- hybridation ADN/ADN.
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech) (renouvelé en 2016).

Equipement de culture cellulaire :

- hotte à flux laminaire, incubateur à CO₂, microscope à objectif inversé pour les cultures cellulaires et les essais de cytotoxicité des toxines. microscope à fluorescence.

Equipement de biochimie :

- équipement de chromatographie en phase liquide (chromatographie à basse pression et FPLC) pour la purification des toxines et protéines recombinantes.
- système d'analyse des protéines (électrophorèse en gel de polyacrylamide, transfert sur membrane et détection immunologique).

Locaux, matériel, équipements, moyens extérieurs à la structure, mais disponibles pour elle sur le campus (animaleries, séquenceurs, etc...) et nécessaires aux missions du CNR.

Laboratoire de préparation commun aux autres unités hébergées dans le bâtiment

Animalerie

- animalerie souris en vue des tests de toxicité, notamment détection et identification des toxines botuliques.
- animalerie lapins pour la production d'anticorps spécifiques anti-toxines.

Plateformes techniques du campus de l'Institut Pasteur dont nous sommes utilisateurs P2M (Séquenceur automatique d'ADN et bioinformaticiens), microséquençage de protéines, microscopie électronique et confocale, cytométrie de flux, Pôle Biomics, PF5.

10-3-2-2 *Laboratoire associé Clostridium difficile*

Le laboratoire « *C. difficile* » dispose des équipements suivants:

Le laboratoire « *C. difficile* » dispose des équipements suivants:

- 1 Centrifugeuse 5430R (Eppendorf)
- 1 Mini Centrifugeuse de paillasse (Extra Gen Bleu)
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)
- 1 Etuve 37°C (Thermo Scientific)
- 2 Balances
- 1 Agitateur magnétique chauffant (Bioblock)
- 5 Cuves électrophorèse BioRad et 4 Cuves Mupid-EX

- 1 Lecteur analyseur d'image (Biorad)
- 2 Hottes PCR (Thermo-copro)
- 2 Hottes Bactériologie (Optimale 12)
- 1 Réfrigérateur-congélateur (Liebherr)
- 3 Réfrigérateurs sous paillasse (Liebherr)
- 2 Congélateurs -20°C (Liebherr)
- 1 Congélateur -20°C sous paillasse (Liebherr)
- 2 Congélateur -80°C (Froilabo)
- 1 Bain-Marie (Julabo)
- 1 Balance de précision (Sartorius)
- 1 Agitateur de microplaque (Labnet)
- 3 Thermocycleurs (1 Applied 9700 + 1 Proflex, 1 Verity)
- 2 Becs chauffant
- 5 Vortex
- 2 Bain-sec chauffant
- 1 Bain-sec (thermomix Bioer)
- 1 Microscope
- 1 Electrophorèse champs pulsé (Gene Path, BioRad)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)
- 1 logiciel GenMapper
- 1 séquenceur ABI3500
- 1 spectrophotomètre 600nm (Biochrom)

10-4 Collections de matériel biologique

10-4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de bactériologie anaérobie 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.

10-4-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

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

Une collection de souches de *C. difficile* correspondant aux PCR-ribotypes les plus fréquents en France est disponible (données de l'enquête ICD-RAISIN 2009 et du volet bactériologique de l'étude LuCID 2014). Chaque souche est caractérisée par son toxinotype (souches de l'étude ICD-RAISIN), la nature de la délétion dans le gène *tcdC*, la présence ou non de la toxine binaire et sa sensibilité aux antibiotiques. La mise à disposition des souches est limitée aux établissements publics, privés et d'enseignement disposant d'un laboratoire de bactériologie, sous condition, notamment de présentation d'un projet scientifique et de signature d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA Material transfert agreement). Selon la nature du demandeur (industriel ou académique), ces accords donneront lieu à une compensation financière.

Une collection européenne de souches de référence de *C. difficile* est disponible auprès de l'ECDC (Dr Ed Kuijper, Department of Medical Microbiology, Centre for Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands, e.j.kuijper@lumc.nl).

10-5 Démarche qualité

10-5-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme 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 (QEED) 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

Les 2 autres CNR ont déposé leur demande d'extension le 1^{er} 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. Ainsi, le CNR a organisé en octobre 2017 un essai inter-laboratoire avec l'Institut Vétérinaire Central de Lelystad (Central Veterinary Institut, The Netherlands, Miriam Koene & Marc Engelsma) et le Laboratoire du Botulisme et autres Clostridies zoonotiques belge (Institut Scientifique de Santé Publique, Pathogènes alimentaires, Bruxelles, Laurence Delbrassine) afin d'évaluer, de comparer et d'échanger sur la capacité et la méthodologie de nos trois laboratoires pour le diagnostic du botulisme humain et animal. Les résultats des 3 laboratoires étaient concluants et homogènes. L'expérience sera renouvelée chaque année avec un tour de rôle de chaque institut pour l'organisation du test. Il est important de noter qu'au regard des contraintes de réglementation ANSM liées à la cession, importation, exportation et transport des Microorganismes et Toxines (MOT), ces essais sont très lourds et très onéreux à mettre en place et à réaliser.

L'année qualité 2017 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	16 au 20 janvier 2017
Revue qualité	13 mars 2017
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2017
Audits internes qualité et technique	8 juin 2017 et 28 septembre 2017

Perspectives 2018 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Audit de surveillance ET d'extension	23-25 janvier 2018
Revue qualité LRE	janvier-avril 2018
Audits internes qualité et technique	mai -juillet et septembre - novembre 2018
Revue de direction LRE-MS	16 mai 2018
Groupe de Travail MALDI TOF – Validation de méthode	juin ou octobre 2018
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

La liste des techniques accréditées du LREMS est disponible en annexe 2.

10-5-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

- Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au pôle de Biologie médicale et Pathologie du GH HUEP (**Hôpitaux Universitaires Est Parisien**) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 (site COFRAC, N° accréditation 8-2542)

- Un **contrôle externe de qualité** a été réalisé en 2017, pour la cinquième année consécutive, en **collaboration avec le Centre National de référence en Belgique** (Pr. Michel Delmée). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridium difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La souche C provenait de la collection du CNR (France ou Belgique) et correspondait à un ribotype appartenant aux 23 souches de référence de *Clostridium difficile*.

La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire), et la sensibilité à la moxifloxacin ont également été incluses dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité 2017 a permis de mettre en évidence une **bonne concordance** entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et nos méthodes.

- Le laboratoire associé a participé au **contrôle de qualité européen**, mis en place dans le cadre du projet ECDIS-Net.

11- ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR ET DU LABORATOIRE ASSOCIE

11-1 Liste des techniques de référence

11-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Test de détection, d'identification et de typage des neurotoxines botuliques par le test de létalité sur souris (Accréditée par le COFRAC).
- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturaux et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques), analyse des produits du métabolisme et des acides gras cellulaires par chromatographie phase gazeuse.
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique.
- Identification des gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C par PCR temps réel ainsi que du gène prolyl aminopeptidase permettant de distinguer les souches protéolytiques des souches non protéolytiques. Cette technique est accréditée par le COFRAC.
- Mise en évidence de cytotoxine à l'aide de culture cellulaire de différents types.
- Amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage.
- Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).
- Dosage de certaines toxines par ELISA (comme toxine epsilon de *C. perfringens*, toxine LT de *C. sordellii*, toxines botuliques)

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

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

Liste des marqueurs épidémiologiques

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

- gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques
- gènes des toxines de *C. perfringens* : alpha, bêta1, bêta2, iota, entérotoxine, delta, epsilon, théta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine théta à l'aide d'une PCR spécifique. Détermination du support (chromosomique ou plasmidique) du gène de l'entérotoxine.
- gènes des toxines de *C. difficile* et de marqueurs épidémiologiques (voir ci-dessus)
- gènes des toxines de *C. sordellii* (LT, HT), neuraminidase, lécithinase
- gènes des toxines alpha de *C. septicum*, *C. oedematiens*
- gènes des flagellines de *C. oedematiens*, *C. chauvoei*
- gène de l'entérotoxine de *Bacteroides fragilis*

Couples d'amorces pour autres gènes d'intérêt

- gènes codant l'ADN ribosomal 16S
- gènes de l'espace intergénique ARNr 16S – 23S
- gènes de ménage *hsp60*, *hsp70* et *recA*
- gènes de sporulation

- gènes de résistance aux antibiotiques [métronidazole ; β -lactamines (gènes *cepA*, *cfxA* et *cfiA*, séquences d'insertion IS 942, IS1186, ISBF417) chez *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*]
- Détermination de la sous-espèce de *Fusobacterium necrophorum* (subsp. *necrophorum* ou *funduliforme*) à l'aide de PCR spécifiques (basées sur la séquence du gène *gyrB*). Détection par PCR des gènes codant la leucotoxine (*lkt*), le promoteur du gène *lkt*, les gènes de l'hémagglutinine et d'une « Hemagglutinin related protein »

11-1-2 Laboratoire associé *C. difficile*

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

- la détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, tétracycline, vancomycine)
- la détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée)
- la détection par PCR des fragments A3 du gène *tcdA* et B1 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B
- la détection par PCR des fragments A1 et A2 du gène *tcdA* et B2 et B3 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B, notamment pour la détermination de certains toxinotypes
- la détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes de restriction.
- la mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : les différents types de délétion du gène *tcdC* existants (18 pb, 39 ou 36 pb et 54 pb) sont déterminés après amplification puis séparation sur un gel d'agarose haute résolution et comparaison à des souches témoins
- la détection simultanée de 7 cibles : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvée chez les souches non toxigènes, par PCR multiplex et détection sur gel ou sur capillaire
- le typage par PCR-ribotypage qui est actuellement la technique de référence en Europe permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de comparer les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés. En plus du PCR-ribotype 027, l'identification de 9 PCR-ribotypes fréquents (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 053, 078/126 et 106) en France est maintenant possible par le réseau de laboratoires experts. La détection des fragments amplifiés est possible sur gel ou sur capillaire
- l'amplification de l'ARN 16S, l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) et la spectrométrie de masse (Maldi-TOF, Brücker) permettant l'identification de *C. difficile*
- l'amplification d'une séquence de 115 pb qui remplace le PaLoc chez les souches non toxigènes, permettant de confirmer l'absence des gènes *tcdA* et *tcdB* (PCR lok1-lok3).
- le typage des souches par MLVA (Multilocus Variable-number tandem repeat Analysis) et MLST (MultiLocus Sequence Typing) et par électrophorèse en champ pulsé (*SmaI*)

11-2 Collection de souches et sérums de référence

11-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Collection de souches de bactéries anaérobies, comprenant les souches types pour chaque espèce. Ces souches sont conservées en azote liquide et/ou à -80°C. Les souches types ainsi que les souches d'intérêt médical sont déposées à la Collection de l'Institut Pasteur. Les souches des espèces nouvellement décrites par le CNR sont également

déposées dans une collection internationale étrangère (Culture Collection, University of Göteborg).

- Sérums de référence et sérums anti-toxines botuliques préparés au CNR
- Sérums anti-toxine *C. difficile* et *C. sordellii*, notamment sérum anti toxine LT de *C. sordellii* qui neutralise spécifiquement la cytotoxicité de *C. difficile* ToxB.
- Sérums anti-toxine de *C. perfringens*, anti-toxine alpha, bêta1, bêta2, epsilon, iota Ia et Iota Ib.
- Sérums anti-toxine alpha de *C. septicum*
- Sérum anti-toxine alpha de *C. oedematiens*
- Sérum anti *C. chauvoei*