

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines
Institut Pasteur, Paris

LABORATOIRE ASSOCIE AU CNR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*



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

* * *

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2014

Unité Bactéries anaérobies et toxines :
Michel-R. POPOFF, Philippe BOUVET, Christelle MAZUET

Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales :
Frédéric BARBUT, Catherine ECKERT

Avril 2015

SOMMAIRE

Résumé analytique	4
1- Missions et organisation du CNR.....	6
1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	6
1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	6
2- Activités d'expertise	6
2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014.....	6
2-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	6
2-1-1-1 Techniques en développement	6
2-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	7
2-1-2-1 Techniques en développement	7
2-1-2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	7
2-2 Activités d'expertise.....	7
2-2-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (CNR)	7
2-2-2 Activité d'expertise sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i>	11
2-2-3 Activité d'expertise sur <i>Clostridium difficile</i> (Laboratoire associé)	14
3- Activités de surveillance	16
3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	16
3-1-1 Surveillance du botulisme (CNR).....	16
3-1-1-1 Botulisme humain.....	16
3-1-2 Surveillance des infections à <i>C. difficile</i> (Laboratoire associé).....	20
3-1-2-1 Réseau de partenaires	20
3-1-2-2 Définition de l'échantillon de souches isolées	20
3-1-2-3 Analyse de la distribution des souches de <i>C. difficile</i> en fonction des critères pertinents et analyse des tendances	22
3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies 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 (Laboratoire associé)	33
3-3 Participation aux réseaux de surveillance	34
3-3-1 Botulisme.....	34
3-3-2 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....	34
3-3-3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens	34
3 - 4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	35
4- Alerte	39
4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	39
4-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	39
5- Activités d'information, de formation et de conseil	40
5 - 1 Enseignements réalisés en 2014.....	40
5-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	40
5-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	40
5-2 Formations aux professionnels de santé	41
5-2-1 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	41
5-3 Stagiaires accueillis	42
5-3-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	42
5-3-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	42
5-4 Liste des guides élaborés	42
5 - 5 Diffusion aux professionnels de santé	42
5 - 6 Activités d'information, de formation et de conseil	43
5 - 7 Activités d'expertises	44
5-7-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	44
5-7-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	44

6- Activités de recherche	45
6-1 Principales activités de recherche du CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	45
6-2 Activités de recherche du laboratoire associé.....	47
6-2-1 Publications et communications du CNR	49
6-2-1-1 Publications dans des revues nationales	49
6-2-1-3 Chapitres de livre	51
6-2-1-4 Congrès, workshops.....	51
6-2-2 Publications et communications du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	52
6-2-2-1 Publications dans des revues de langue française	52
6-2-2-2 Publications dans des revues internationales	53
6-2-2-3 Autres publications	54
6-2-2-4 Communications nationales	54
6-2-2-5 Communications internationales	55
6-2-2-6 Conférences sur invitations	55
6-2-2-7 Autres.....	56
7- Tableaux (CNR Bactéries anaérobies et botulisme).....	57
8- Annexe 1 : Missions et organisation du CNR.....	66
8-1 Missions et objectifs majeurs	66
8-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	66
8-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	66
8-2 Equipes.....	67
8-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	67
8-2-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	67
8-4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	69
8-4-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	70
9- Annexe 2 : Capacités techniques du CNR et du laboratoire associé	71
9-1 Techniques et marqueurs disponibles.....	71
9-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	71
9-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	72
9-2 Collection de souches, sérums de référence	73
9-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	73
9-2-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	74
9-3 Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts	74
.....	

RESUME ANALYTIQUE

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

En 2014, Le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 129 échantillons de sérum, 53 selles, 56 échantillons alimentaires dont 33 en lien avec un foyer de botulisme. Un total de 4 (plus un foyer suspect) foyers de botulisme regroupant 11 (plus un cas suspect) cas ont été identifiés. L'ensemble des patients a été hospitalisé dont la plupart en service de réanimation. Bien que le nombre de foyers soit réduit en 2014, le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (2 foyers confirmés sur 4, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour les deux autres foyers bien que non confirmée). Un botulisme de type B a été identifié pour un foyer (4 cas), non déterminé pour un autre foyer (2 cas) et est demeuré incertain entre B et E pour un 3^{ème} foyer (3 cas) alors que le type A n'était pas représenté cette année.. Le fait marquant en 2014 est un foyer de botulisme regroupant deux patients, dont un ayant développé une forme très sévère ayant nécessité une assistance respiratoire pendant 46 jours. Le botulisme identifié était de type F dû à *Clostridium baratii*. Il s'agit des deux premiers cas identifiés en France de ce type de botulisme qui est rare et qui a été rapporté essentiellement aux USA. La souche de *C. baratii* isolée des selles des malades a été caractérisée par séquençage complet de son génome.

L'origine du botulisme a été retrouvée dans 2 foyers: aliment du commerce (sauce pesto aux truffes d'origine hongroise) dans un foyer, jambon de préparation familiale dans un autre foyer. Une alerte européenne déclenchée par l'InVs suite à la déclaration du cas de botulisme lié à la consommation de la sauce pesto a conduit la Hongrie à signaler 1 cas de botulisme (lié à la consommation de Houmos fabriquée par la même entreprise bio) et à la fermeture de 4 sites de production de cette entreprise.

Des conserves maison (haricots verts) ont été fortement suspectées pour un autre foyer mais non confirmées par le CNR faute d'aliments consommés restants disponibles. De nombreux aliments ont été testés pour le foyer de botulisme de type F mais sont tous restés négatifs. L'origine de ce botulisme demeure inconnue.

Le CNR a également pratiqué la recherche d'anticorps neutralisants chez 15 patients traités à la toxine botulique. Des anticorps neutralisants ont été détectés chez 1 d'entre eux.

Le botulisme animal fait l'objet d'identification ou de typage en complément de premières analyses réalisées par les laboratoires vétérinaires. En 2014, 88 échantillons d'origine vétérinaire et 124 d'origine alimentaire ont été analysés. Le botulisme de type C, D, ou mosaïque C/D ou D/C sévit notamment dans les élevages de volailles et dans certains élevages de bovins. **Le botulisme reste une situation préoccupante en élevage bovin et volaille avec de nombreux foyers chaque année et un risque de santé publique.**

La surveillance des infections à *C. difficile* a continué au cours de l'année 2014 grâce à l'appui du Laboratoire associé et de son réseau de 4 autres laboratoires hospitaliers experts ainsi que du CNR. *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). Il travaille en collaboration avec un réseau national de 4 laboratoires experts (laboratoires experts de Rouen, Toulouse, Montpellier et Nancy) pour la caractérisation des souches.

Au cours de l'année 2014, 565 prélèvements ont été reçus par les différents laboratoires experts. Parmi ces prélèvements, 498 correspondaient à des souches de *C. difficile* toxinogènes ; 13,5% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 3 principaux PCR-ribotype identifiés étaient le 014/020/077 (16,1%), le 027 (13,5%) et le 078/126 (11,9%).

L'année 2014 a été marquée par le suivi de l'épidémie liée à la souche 027 à Marseille et sa région ainsi que par une diminution très nette des souches 027 reçues. Les souches 027 reçues provenaient majoritairement de 3 départements : la Ville de Paris, le Nord et les Bouches du Rhône. Deux nouveaux départements français ont été touchés par cette souche (Maine et Loire et Var). Cette diminution (en nombre et en proportion) peut en partie être expliquée par l'utilisation de plus en plus importante par les laboratoires du test GenXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive des souches 027. Les laboratoires du Nord et des Bouches du Rhône envoient de façon moins systématique leur souche pour typage.

En 2014, 328 souches de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR [dont les origines sont : humaine (302 souches), alimentaire (6), vétérinaire (13), et autres (industrielles, collections... : 7)]. Les 295 souches d'origine humaine identifiées se répartissaient en 47 genres différents, 89 espèces nommées (233 souches) et 58 souches représentant de nouvelles espèces potentielles. Le séquençage du gène ARNr 16S (204 séquences effectuées en 2014 soit 87,2% des souches reçues hors *Clostridium difficile*) a permis d'identifier plusieurs espèces rares (appartenant aux espèces *Bacteroides cellulosilyticus*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Clostridium bartlettii*, « *Desulfovibrio fairfieldensis* », *Fastidiosipila sanguinis*, *Robinsoniella peoriensis*, *Victivallis* sp...). Le séquençage NGS (next-generation sequencing) a été utilisé à 2 occasions : typage épidémiologique de type MLST de 3 souches de *Propionibacterium acnes* isolées d'infections sur prothèse du genou chez 3 patients opérés dans le même bloc et étude poussée d'une souche de *Clostridium perfringens* responsable d'une TIAC.

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté (91/395 souches soit 31,0%) parmi lesquelles 61 souches de *C. difficile* envoyées pour étude (identification, recherche des gènes de toxines, PCR-ribotypage). Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* / *Parabacteroides* / *Prevotella* / *Butyrivimonas* / *Dialister* (65 souches), les coques à Gram + (*Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Peptococcus*, *Peptoniphilus*...) (37 souches) , bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*...) (30 souches), les coques à Gram négatif (*Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Negativicoccus*) (18 souches), *Fusobacterium* (4 souches) et divers. Quelques cas cliniques remarquables ont été notés en 2014 : gangrène de Fournier à *Bacteroides coagulans* ; choc toxinique post-partum fatal à *Clostridium sordellii* (TcsL+) suite à une ulcération d'épisiotomie chez une jeune femme de 32 ans ; discite lombaire due à *Clostridium perfringens* ; adénite cervicale suppurée sans fièvre due à *Clostridium bartlettii* (abcès froid évoquant une mycobactérie).

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.

Des travaux d'expertises ont porté sur le développement de nouvelles méthodes d'identification et de titrage des toxines botuliques.

Les travaux de recherche de l'Unité associée au CNR ont porté sur les toxines botuliques (passage à travers la barrière intestinale), la caractérisation génétique de souches de *C. botulinum* et apparentées, les toxines de *Clostridium* formant des pores (toxine epsilon de *C. perfringens*) et les toxines de grande taille de *C. sordellii* et *C. difficile*.

1- MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

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

1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

2- ACTIVITES D'EXPERTISE

Les descriptions des techniques et marqueurs disponibles ainsi que la liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts *Clostridium difficile* sont présentées en **annexe 2**.

Une page web est disponible sur le site du CNR pour informer les centres de santé (hôpitaux, laboratoires...) des modalités de fonctionnement de ce réseau et des procédures à suivre lors d'une infection à *C. difficile* (paragraphe collaborations et réseaux) (<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>).

2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014

2-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

2-1-1-1 Techniques en développement

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 (voir section: Expertises).

L'évaluation d'anticorps monoclonaux murins et humanisés neutralisants des toxines botuliques pour un usage thérapeutique est en cours dans le cadre du programme européen ANTIBOTABE du programme NRBC avec le CEA (voir section Expertises).

2-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

2-1-2-1 Techniques en développement

La technique de PCR-ribotypage actuellement utilisée au laboratoire est une méthode longue et délicate qui nécessite une interprétation visuelle des profils obtenus après migration sur gel résophor. L'identification des PCR-ribotypes peut parfois s'avérer complexe et nécessite de déposer les souches à identifier à côté de souches de référence sur un même gel. Pour standardiser cette technique, le laboratoire associé a fait l'acquisition d'un séquenceur (ABI 3500) afin de mettre au point la détection des fragments amplifiés par PCR sur séquenceur (capillary PCR-ribotyping) (Fawley et al., PlosOne 2015, DOI :10.1371).

Pour caractériser les souches de *Clostridium difficile* reçues au laboratoire, plusieurs PCR sont mises en œuvre. Afin de gagner en rapidité et de s'affranchir du Bromure d'Ethidium (BET), une PCR multiplex avec détection des fragments amplifiés sur séquenceur est actuellement mise au point.

2-1-2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Un partenariat a été signé avec BioMérieux puis Biocartis pour le développement d'un test diagnostique de biologie moléculaire pour les infections à *C. difficile*.

2-2 Activités d'expertise

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

Origines et nombres d'échantillons reçus et des souches analysées en 2014

La répartition était la suivante :

ORIGINE	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
humaine	295 (302)
vétérinaire	12 (13)
Alimentaire	6
Autres (industrielle, collections, recherche...)	7
TOTAL	320 (328)

2-2-1-1 Souche d'origine humaine

Quarante départements métropolitains ont envoyé 279 souches au CNR parmi lesquelles 9 souches (3% du total) par les laboratoires d'Ile-de-France [vs 24 souches (14,6%) en 2013] . Les départements ultra-marins envoient également des souches très régulièrement pour identification (19 souches envoyées par les DOM et 3 souches en provenance de Nouvelle-Calédonie). Une souche provenait de Monaco.

Le CNR a reçu 61 souches de *Clostridium difficile* soit au titre de laboratoire expert *C. difficile* pour identification et éventuellement toxinotypage.

Les données démographiques des patients souffrant d'infections à *Clostridium difficile* (ICD) et d'infections non ICD sont détaillées dans les tableaux ci-dessous.

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

Types d'infections et origine géographique

ORIGINE	Nombre de patients (nombre de départements)		
	Infections non CD	Infections CD	Tous types d'infections
France métropolitaine	230 (34)	49 (16)	279 (40)
Outre-Mer	11 (4)	11 (2)	22 (5)
Monaco		1	1
TOTAL	241	58	302

Caractéristiques des patients selon le type d'infection (CD, non CD)

	Infections non CD			Infections CD		
	Hommes	Femmes	Total	Hommes	Femmes	Total
N	157 (5 nr)	84 (1 nr)	241 (6 nr)	25	36	61
Sex ratio H/F			1,87			0,69
âge						
moyenne	53	51	53	61	62	61
médiane	51	54	51	69	67	68
intervalle	5-100	2-96	2-100	4-95	1-101	1-101

nr : âge non renseigné

La distribution selon les sites d'infections des souches de bactéries anaérobies (hors *Clostridium difficile*) est présentée au Tableau 1 (chapitre 8).

Respect des conditions pré-analytiques : envoi de la feuille de renseignements 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 grande majorité des souches. En 2014, seules 5 souches sur les 302 reçues (1,7%) ne disposaient pas de cette donnée vs. 2,5% en 2013, 1,3% en 2012, 2,5% en 2011, 10% en 2010 et 68% en 2009.

La majorité des souches (hors infections à CD) pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement d'urologie/néphrologie (19,7%), infections cutanées et musculaires (19,3%), infections osseuse (14,3%) suivies par les hémocultures (13,4%), et de coprocultures (8%). Le reste des souches provenait de différentes localisations : infections intra-abdominales, infections hépatiques/pancréatiques, infections post-opératoires, stomatologie...

Le pourcentage de souches n'ayant pu être étudiées est également en diminution nette avec **1,7%** des isolats en 2014 vs. 7% en 2013, 10% en 2012, 12,3% en 2011, 22% en 2010 et 19% en 2009. Ces chiffres en amélioration nette reflètent bien sûr les efforts effectués par les laboratoires mais également par le CNR qui met tout en oeuvre pour essayer de purifier la souche d'intérêt à partir du prélèvement contaminé. Malgré tout, l'étude de souches anaérobies présente toujours pour bon nombre de laboratoires une difficulté certaine (contaminations, problème de viabilité au cours du transport etc...).

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté (91/395 souches soit 31,0%) parmi lesquelles 61 souches de *C. difficile* envoyées pour étude (identification, recherche des gènes de toxines, PCR-ribotypage) (Tableau 2 – chapitre 8). Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* / *Parabacteroides* / *Prevotella* / *Butyrivimonas* / *Dialister* (65 souches), les coques à Gram + (*Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Peptococcus*, *Peptoniphilus*...) (37 souches), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*...) (30 souches), les coques à Gram négatif (*Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Negativicoccus*) (18 souches), *Fusobacterium* (4 souches) et divers.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 3 – chapitre 8). Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage, caractérisation de la pathogénicité et/ou identification.

Quelques cas cliniques remarquables en 2014 :

- Gangrène de Fournier à *Bacteroides coagulans*.
- Choc toxinique post-partum à *Clostridium sordellii* suite à une ulcération d'épisiotomie chez une jeune femme de 32 ans. La souche isolée possédait le gène de la toxine létale TcsL. La patiente est décédée.
- Discite lombaire due à *Clostridium perfringens*. Ce cas clinique a fait l'objet d'une publication [Lotte R, Popoff MR, Degand N, Lotte L, Bouvet P, Baudin G, Cua E, Roger PM, Ruimy R. 2014. Lumbar discitis caused by *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol **52**:3813-3815. [PubMed 25056327]
- Adénite cervicale suppurée sans fièvre due à *Clostridium bartlettii* (abcès froid évoquant une mycobactérie).

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 beta-lactamines incluant les carbapénèmes.

Le CNR participe également aux côtés de son laboratoire associé *Clostridium difficile* et de son réseau de laboratoires experts à la caractérisation des souches de *Clostridium difficile* isolées de cas sévères ou groupés (61 souches étudiées).

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 plateformes 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 dépend 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.

L'augmentation relativement importante du nombre de souches d'origine humaine étudiées en 2014 (hors *C. difficile*) par rapport à l'année précédente (234 vs. 109) et l'augmentation du nombre d'espèces rares ou nouvelles (souches « sp. ») est vraisemblablement due à ces « échecs MALDI ».

Deux-cent-quatre séquences d'ARNr 16S (sur un total de 234 souches hors *C. difficile*) ont été effectuées cette année soit 87,2% (contre 70% l'année dernière). Les 172 souches appartenant à 88 espèces nommées (vs. 88 souches et 48 espèces en 2013) et 58 souches appartenant à de nouvelles espèces probables (vs. 21 souches en 2013) identifiées en 2014 illustrent à l'évidence l'impact de la technique MALDI-TOF sur l'identification d'espèces rares ou nouvelles.

Apport du séquençage NGS (next-generation sequencing)

Le séquençage NGS de génome bactérien devient une aide incontournable dans l'étude des souches. Le CNR a utilisé cette technologie lors de deux études ponctuelles : typage épidémiologique de type MLST de 3 souches de *Propionibacterium acnes* isolées d'infections sur prothèse du genou chez 3 patients opérés dans le même bloc et étude poussée d'une souche de *Clostridium perfringens* responsable d'une TIAC.

2-2-2 Activité d'expertise sur la toxine botulique et *C. botulinum*

Evaluation de la détection de la toxine botulique A par un test endoprotéase dans le sérum de patients naturellement atteints de botulisme (Biosens Bioelectron 2014, 57C:207-212).

Nous avons au préalable développé un test de détection de la toxine botulique de type A (BoNT/A) basé sur son activité endoprotéasique vis à vis de son substrat SNAP25. Une fois clivé par BoNT/A (libération des 9 acides aminés C-terminaux), SNAP25 dévoile des épitopes spécifiques. Ainsi, SNAP25 clivé par BoNT/A peut être reconnu par des anticorps spécifiques. L'équipe de C. Lévêque (INSERM, Marseille) a généré un anticorps monoclonal spécifique de la forme clivée de SNAP25 par BoNT/A. Ainsi, un test de l'activité enzymatique de BoNT/A a été développé à l'aide de SNAP25 recombinant et de cet anticorps monoclonal avec révélation en ELISA ou par "surface plasmon resonance" (SPR). Nous avons également développé une technique de détection de SNAP25 clivé par BoNT/A à l'aide de la spectrométrie de masse (J. Clin. Microbiol. 2012, 50/ 4091-4094).

En collaboration avec C. Lévêque nous avons évalué la méthode endoprotéasique avec révélation par SPR pour l'identification de BoNT/A dans le sérum de malades naturellement contaminés (Biosens Bioelectron 2014, 57C:207-212). Onze patients avaient fait l'objet d'un diagnostic de botulisme par identification de la toxine botulique dans le sérum par le test sur souris et caractérisation génétique de la souche de *C. botulinum* isolée des selles. Parmi ces 11 patients, 7 avaient un botulisme de type A1, 3 de type A2 et un de type indéterminé. La toxine botulique a été détectée par le test endoprotéasique dans les 11 échantillons de sérum. L'avantage de cette méthode est qu'un petit volume de sérum (0.5 ml) était suffisant. Une étape d'immunoprécipitation a été réalisée avec les 0.5 ml d'échantillon de sérum à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre le domaine Hc de BoNT/A et immunopurifiés. De plus, les résultats étaient obtenus en une demi-journée. La sensibilité de cette méthode a été estimée à 0.1 DL/ml. L'inconvénient est que cette méthode ne détecte que la toxine de type A.

Les échantillons de sérum contrôle de 21 personnes saines et de 22 personnes atteintes d'un syndrome de myasthénie de Lambert-Eaton ont tous donné une réponse négative dans le test endoprotéase BoNT/A. Dans certains cas de neuropathie auto-immune, le sérum présente une toxicité dans le test souris qui peut gêner l'interprétation de la recherche de toxine botulique. Le test endoprotéase se montre spécifique de BoNT/A.

Développement d'un test de détection des toxines botuliques A, B, et E par test endoprotéase et révélation par ELISA

Nous avons au préalable montré en collaboration avec l'équipe de C Lévêque qu'un test endoprotéase pour la détection de la toxine botulique de type B (BoNT/B) avec révélation par SPR était suffisamment sensible pour l'appliquer à la détection de la toxine botulique dans le sérum des patients (Anal Biochem 2011, 410: 281-288).

De façon à disposer de tests endoprotéase réalisables dans nos conditions de laboratoire où nous ne disposons pas d'appareil pour SPR (Biacore), nous avons adapté les tests de détection et titrage des neurotoxines BoNT/A, BoNT/B et BoNT/E en utilisant une révélation des produits de clivage du substrat (VAMP ou SNAP25) par ELISA.

Pour la détection de BoNT/A, nous utilisons un anticorps monoclonal spécifique de la forme SNAP25 clivée par BoNT/A qui a été développé par l'équipe de Marseille. La sensibilité de ce test qui permet de détecter environ 0.1 à 0.5 Dose Létale souris par ml est satisfaisante.

BoNT/E est également détecté avec un anticorps monoclonal reconnaissant SNAP25 clivé par BoNT/E produit par l'équipe de Marseille. La validation de ce test est encore en cours.

Le test endoprotéase de BoNT/B est encore en cours. Nous utilisons la protéine VAMP2 sous forme de protéine recombinante produite dans notre laboratoire comme substrat. Un peptide correspondant à la partie C-terminale de VAMP2 clivé par BoNT/B a été synthétisé et a été utilisé pour immuniser des lapins. Les anticorps spécifiques ont été purifiés par affinité sur le peptide qui a servi d'antigène et sont utilisés pour la détection de la forme de VAMP2 clivée par BoNT/B. La spécificité de ce test est correcte mais la sensibilité est encore trop faible pour que ce test puisse remplacer le test sur souris. De façon à avoir des anticorps de meilleure affinité reconnaissant le forme VAMP clivé, nous avons produit VAMP clivé en tant que protéine recombinante chez *E. coli* et nous l'avons utilisé comme antigène pour immuniser des lapins. Les anticorps obtenus de cette façon permette de détecter BoNT/B avec une meilleure sensibilité qu'avec les anticorps générés avec le peptide synthétique. Le développement et l'amélioration de ce test pour BoNT/B sont en cours.

Analyse d'anticorps monoclonaux neutralisants de la toxine botulique E (collaboration avec le CEA Saclay, programme NRBC)

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. Cependant, 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 est en cours.

Anticorps monoclonaux humanisés neutralisants des toxines botuliques A, B et E (programme européen ANTIBOTABE).

Dans le cadre du programme européen ANTIBOTABE qui regroupe 7 participants, notre rôle a été de préparer, purifier, et fournir les antigènes recombinants (partie C-terminale, Hc, de la chaîne lourde et chaîne légère, Lc) des neurotoxines botuliques A, B et E pour l'immunisation de macaques, la sélection de clones producteurs de scFv spécifiques des toxines botulique A, B et E, et ensuite la construction de vecteurs producteurs d'immunoglobulines entières et humanisées. Cette dernière étape a été réalisée par le partenaire LFB qui nous a fourni des préparations d'anticorps recombinants testées dans un modèle *in vivo*. Au final, 5 anticorps recombinants ont été générés (anti-Hc type A, anti-Lc type A, anti-Hc type B, anti-Lc type B, anti-Lc type E). Ces anticorps ont été testés pour leur activité neutralisante avec différents lots de toxines botuliques type A, B, E, et sous types dans un test de protection chez la souris. Brièvement :

Les anticorps anti-LcA associés aux anti-HcA neutralisent les toxines botuliques A1, A5 et A6, mais pas les sous-types A2, A3 et A7.

Les anticorps anti-LcB associés aux anti-HcB neutralisent les toxines botuliques B1, B2, B3 et Bnp.

Les anticorps anti-LcE neutralisent la toxine botulique E3.

Caractérisation des souches de *C. botulinum* par génotypage, séquençage du gène de la neurotoxine botulique et étude MLST.

Les souches de *C. botulinum* sont divisées en 7 types (A à G) selon les propriétés antigéniques des toxines botuliques produites et en sous-types selon les variations de séquence du gène de la neurotoxine. D'autre part, les souches de *C. botulinum* se caractérisent par les gènes des protéines non toxiques qui composent le locus botulique. Le génotypage du locus botulique réalisé par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques de chaque gène des locus botuliques, ainsi que le séquençage du gène de la neurotoxine botulique permet d'obtenir une caractérisation précise du type et sous type de chaque souche. Les souches de *C. botulinum* isolées au CNR sont systématiquement analysées par génotypage portant sur les gènes du locus botulique, séquençage complet du gène de la neurotoxine botulique et analyse de 7 gènes de ménage par MLST.

En collaboration avec la plateforme de séquençage de l'Institut Pasteur, nous avons mis en place le séquençage de génome complet de souches de *Clostridium* et leur analyse bioinformatique. La méthode actuelle de pyroséquençage permet d'obtenir une séquence quasi-complète de génome en 100 à 200 contigs. Ceci nous permet d'accéder en une seule opération aux informations de la séquence du gène de la neurotoxine et ainsi de préciser le type et sous type de *C. botulinum*, d'avoir les séquences des gènes des protéines associées aux complexes botuliques ainsi que des gènes de ménage permettant d'établir le profil MLST de la souche et d'analyser sa variabilité génétique. Une cinquantaine de souches de *C. botulinum* ont été actuellement séquencées de cette façon et sont en cours d'analyse ce qui permettra d'apprécier la diversité et la variabilité génétique des souches de *C. botulinum* isolées en France.

Détection de *C. botulinum* A, B, E, F, C, C/D, D/C et D en PCR temps réel

Les couples de primers correspondant aux gènes des neurotoxines A, B, E, C et D ont été synthétisés et validés par la méthode de Sybr-green en PCR temps réel avec des gammes d'ADN purifiés. Cette méthode est utilisée en routine depuis plus de 3 ans au CNR pour la détection des souches de *C. botulinum* dans les échantillons et la caractérisation des souches.

Cette méthodologie a été complétée avec des primers permettant de détecter et de différencier les souches de *C. botulinum* F, ainsi que les souches mosaïques C/D et D/C. Des souches de *C. botulinum* Af et Bf ont été identifiées dans des cas récents de botulisme humain. Egalement ce système de détection a été étendu à l'identification des souches neurotoxigènes de *Clostridium baratii* à propos d'un foyer récent survenu en France.

De même, la méthode a été étendue aux souches de *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques de type B. Des amorces basées sur des gènes spécifiques de chaque sous type ont été développées et validées pour différencier ces sous types de souches par PCR temps réel.

Développement d'une méthode précise de dosage de la neurotoxine botulique A par PSAQ (Protein standard for absolute quantification) (Travail de thèse de V. Morineau-Hilaire)

Afin de déterminer avec précision la quantité de neurotoxine botulique A dans des préparations de toxine libre ou de complexes et ainsi de pouvoir définir les doses biologiquement actives de chaque sous type de neurotoxine A, une méthode de dosage par spectrométrie de masse à l'aide d'une protéine standard (PSAQ) est en cours de développement. La méthode consiste à faire un dosage des peptides après digestion trypsique par rapport à une protéine standard marquée à ^{13}C . La chaîne légère de la toxine botulique A a été choisie comme protéine standard. Elle est produite en tant que protéine recombinante et est marquée

isotopiquement et purifiée. Une analyse des peptides majoritaires des différents sous types de toxine botulique A a été réalisée de façon à définir les peptides qui serviront pour le dosage.

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

Au cours de l'année 2014, **565 prélèvements** ont été reçus par les différents laboratoires experts, contre 592 en 2013 (-4,6%) (Tableau I). On observe une stabilité du nombre de prélèvements envoyés pour expertise par les laboratoires, par rapport à l'année précédente.

Parmi ces prélèvements, **518** ont été confirmés comme étant des souches de *C. difficile* et analysés ; 20 souches (3,9%) étaient des souches de *C. difficile* non toxigènes et **498** (96,1%) correspondaient effectivement à des **souches toxigènes**.

Tableau I : Evolution du nombre de prélèvements reçus pour caractérisation et nombre de souches de *C. difficile* depuis 2007.

	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007
Nb de prélèvements reçus	565	592	464	596	551	561	617	780
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	518	540	435	550	520	499	578	748
Nb de souches toxigènes	498	530	420	543	503	486	561	731

Parmi les souches toxigènes (Tableau II) :

- la recherche des fragments A3 et B1 a été effectuée pour 488 et 481 souches respectivement.

- la recherche de la toxine binaire a été effectuée pour 445 souches. Parmi les 283 souches qui ne possèdent pas la forme entière de la toxine binaire, la recherche de pseudogènes a été effectuée pour 263 souches.

- la recherche d'une délétion dans le gène *tcdC* a été réalisée pour 446 souches.

- un antibiogramme a été rendu dans 497 cas

- la PCR-ribotypage a été effectuée sur toutes les souches toxigènes.

Tableau II: Activité d'expertise sur *C. difficile* et analyses effectuées sur les souches toxigènes (en %)

	2014
Nb de prélèvements reçus	565
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	518
Nb de souches toxigènes	498
Recherche du fragment A3 (%)	98
Recherche du fragment B1 (%)	96,6
Recherche de la toxine binaire (%)	89,4
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	89,6
Antibiogramme (%)	99,8
PCR-ribotypage (%)	100

3- ACTIVITES DE SURVEILLANCE

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

3-1-1 Surveillance du botulisme (CNR)

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2014 est le suivant:

Botulisme humain		
	- sérums (recherche de toxine botulique)	129
	- selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>)	53
	- sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	15
Echantillons agro-alimentaires		
	- en relation avec une suspicion de botulisme humain	33
	- autres	23
Botulisme animal		
	- échantillons	88
Echantillons d'aliment pour animaux et échantillons environnementaux		
	- échantillons	124
TOTAL		

3-1-1-1 Botulisme humain

Réseau de partenaires

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

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

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

Analyse des cas de botulisme humain

Un total de 129 sérums et de 53 selles de patients suspects de botulisme ont fait l'objet d'identification de botulisme en 2014.

La présence de toxine botulique est recherchée dans le sérum ainsi que dans les échantillons d'aliment par le test de létalité sur souris et de sero-protection à l'aide d'anticorps neutralisants spécifiques. Des tests *in vitro* alternatifs au test de létalité chez la souris sont en cours de développement et d'évaluation. Notamment, nous adaptons les tests d'endopeptidase avec détection par ELISA à la mise en évidence et l'identification des toxines botuliques A, B et E. Des essais ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de M Seagar à Marseille pour la détection dans des sérums artificiellement et naturellement contaminés avec de la toxine botulique A et B en utilisant le test d'endoprotéase avec détection par SPR (Biacore), et en collaboration avec N. Becher au CEA Saclay pour la détection dans des sérums artificiellement et naturellement contaminés avec de la toxine botulique A par un test d'endoprotéase et détection par spectrométrie de masse. Ces essais réalisés en parallèle du test de référence, c'est à dire le test souris, sont prometteurs. Pour des raisons de commodité dans notre laboratoire nous avons adapté ces tests à une détection par ELISA. Dans la mesure où les échantillons de sérum sont en volume suffisant, nous mettons en route les deux types de tests, *in vivo* et *in vitro*, pour évaluer ces nouvelles méthodologies dans les conditions d'analyses de routine.

C. botulinum est recherché dans les selles et les aliments suspects par culture d'enrichissement et amplification génique, ainsi que par caractérisation des toxines produites selon un protocole développé au laboratoire. La détection de *C. botulinum* directement dans l'échantillon par extraction d'ADN et PCR en temps réel a été développée. Etant donné que la sensibilité de cette approche n'est pas toujours suffisante elle est dans tous les cas accompagnée de la recherche de *C. botulinum* après culture d'enrichissement. L'isolement des souches de *C. botulinum* est entrepris pour chaque échantillon positif de façon à obtenir une caractérisation détaillée des souches et du type de botulisme en cause. Notamment nous développons le séquençage du génome complet des souches isolées de façon à caractériser les types et sous-types de *C. botulinum* par analyse des séquences des gènes des toxines botuliques, ainsi que des gènes des protéines non toxiques associées aux complexes botuliques, et à évaluer la variabilités des souches par analyse des gènes de maison (MLST).

Au cours de l'année 2014, 11 cas de botulisme plus un suspect (4 foyers plus un suspect) ont été identifiés (Tableau ci-dessous Le nombre de foyers est relativement faible cette année mais le nombre de cas reste sensiblement le même que les autres années.

Année	Foyers (cas) déclarés
2014	4 (11)
2013	11 (19)
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)
2009	25 (10)
2008	6 (9)
2007	6 (11)
2006	7 (8)

Selon le type de toxine botulique, les foyers et cas de botulisme se répartissent en 1 foyer (4 cas) de botulisme de type B, 1 foyer (2 cas) de botulisme de type F, un foyer (1 cas) de botulisme de type incertain (B ou E) et une suspicion clinique de botulisme non confirmée biologiquement au CNR

En 2014, le botulisme humain est survenu sous forme de cas sporadiques ou de petits foyers familiaux (maximum 4 cas par foyer). Aucun foyer étendu n'a été signalé.

Il faut noter cette année l'absence de cas de botulisme infantile (contre 4 cas en 2013) et l'absence de foyer de type A.

L'origine alimentaire a été identifiée dans 2 foyers parmi les 4 foyers de botulisme alimentaire et la source de contamination des cas de botulisme de type F n'a malheureusement pas pu être identifiée. Dans deux foyers, l'aliment en cause était un jambon de préparation familiale et dans un autre foyer il s'agissait d'une sauce pesto aux truffes fabriquée en Hongrie.

Foyers de botulisme alimentaire de type B en 2014

Un premier foyer concernait une personne hospitalisée dans un établissement à Lyon et qui était originaire de Géorgie. Elle avait consommé ainsi que 2 autres personnes des préparations industrielles fabriquées en Hongrie et elle avait été rapatriée en France pour être traitée.

L'analyse d'un échantillon de sérum de la patiente hospitalisée à Lyon a permis de confirmer le diagnostic clinique de botulisme. Cependant, le titre en toxine dans le sérum était relativement faible (environ 1 Dose Létale souris/ml) et le résultat du typage était ambiguë, B ou E. En effet, l'activité létale du sérum était neutralisée par les anti sérums B et E, mais pas A. Aux faibles doses de toxine, on observe parfois une réaction croisée entre les types B et E. Le trop faible volume d'échantillon de sérum et l'absence de prélèvements de selles ne nous ont pas permis de préciser d'avantage le typage de ce foyer de botulisme.

Les deux autres personnes ont manifesté des signes cliniques. Une d'entre elles a fait l'objet d'une déclaration de botulisme en Hongrie suite à l'alerte européenne lancée par l'InVS sur ces conserves industrielles d'origine hongroise et qui a également conduit à la fermeture de 4 sites de production.

Aucun échantillon d'aliment ne nous a été adressé pour analyse.

Un deuxième foyer de botulisme est intervenu en juillet 2014 dans le département 74 et a concerné 4 personnes.

La toxine botulique B a été détectée dans le sérum de 3 personnes et pas chez le 4^e patient. Les selles d'une des personnes nous ont été adressées. La toxine botulique B a été retrouvée à un titre de 2000 DL souris/g, mais la détection de *C. botulinum* par PCR est restée négative.

Les aliments à risque étaient des charcuteries de préparation familiale (jambon, pâté, saucisse). L'analyse de ces aliments a mis en évidence la toxine botulique B (40 DL souris/g) dans le jambon et une souche de *C. botulinum* B non-protéolytique a été isolée. Les autres échantillons d'aliments sont restés négatifs pour la recherche de toxine botulique et de *C. botulinum*.

Un autre foyer a concerné deux personnes en juillet 2014. Elles ont développé des signes cliniques évocateurs de botulisme mais modérés à savoir troubles de l'accommodation, dysphagie, dysphonie, sécheresse de la bouche. Les recherches de toxine botulique dans les échantillons de sérum et de selles de ces deux patients étaient négatives, ainsi que la recherche de *C. botulinum* dans les selles. Ces personnes avaient consommé des aliments à risque dans les jours précédents l'apparition des signes cliniques notamment un jambon de préparation industrielle. L'analyse de trois échantillons de conserves familiales (haricots verts) et du jambon industriel n'ont pas révélé la présence de toxine botulique ni de *C. botulinum*. Ce foyer est considéré comme étant du botulisme sur la base des données cliniques.

Une suspicion de botulisme a été évoquée chez une personne ayant présenté un ptosis bilatéral, dysphonie, dysphagie, dyspnée. Les analyses d'un échantillon de sérum et de selles

16 jours après le début des symptômes ont été négatives. Cette personne consommait des conserves et des charcuteries. L'analyse d'un pâté de préparation industrielle a été négative. Cette suspicion clinique n'a pas été confirmée biologiquement, probablement du fait d'échantillons de sérum et selles trop tardifs.

Un foyer de botulisme de type F, premier foyer de ce type de botulisme signalé en France

En novembre 2014, une femme de 60 ans a été admise à l'hôpital de Périgueux dans un état comateux et de paralysie très avancée. Une autre femme de 20 ans présentait un tableau de paralysie flasque moins sévère. La première personne a été en service de réanimation avec ventilation mécanique pendant 46 jours, et la deuxième patiente a eu recours à une assistance respiratoire pendant 11 jours.

Un taux inhabituellement très élevé de toxine botulique F a été détecté dans le sérum de la première patiente. Le titre en toxine était de 400 DL souris/ml, alors que les taux les plus élevés enregistrés jusqu'au préalable atteignaient 32 ou plus rarement 64 DL souris/ml. De plus le type identifié, à savoir F, était inhabituel, car c'est le premier foyer de ce type qui a été rapporté en France. Le botulisme de type F est rare et a été essentiellement décrit aux US.

La deuxième patiente avait un titre sérique en toxine nettement plus faible (1 à 2 DL souris/ml).

La toxine botulique F a été détectée dans un échantillon de selles de la première patiente (160 DL souris/g) mais pas dans celles de la deuxième personne.

Une souche de *Clostridium baratii* productrice de neurotoxine botulique F a été isolée des selles des deux patientes. Les souches atypiques de *C. baratii* neurotoxigènes ont été impliquées dans de rares cas de botulisme, botulisme infantile et botulisme alimentaire, principalement aux US. Un seul foyer de botulisme de type F dû à *C. baratii* a été signalé en dehors des US, il s'agissait d'un foyer en Espagne. L'analyse des souches isolées en France par séquençage complet du génome a révélé l'existence d'un seul locus botulique (gène neurotoxine F associé à des gènes OrfX) très similaire au niveau séquence en nucléotides et acides aminés à ceux décrits pour les souches de *C. baratii* F. Cependant, le site d'insertion dans le génome du locus botulique de la souche isolée en France diffère de celui qui a été analysé dans une souche des US, ce qui suppose une évolution différente de cette souche par rapport aux isolats américains.

L'origine de ce foyer de botulisme n'a pas été identifiée. Les investigations des aliments supposés à risque (reste de pâté de préparation familiale, rôti de bœuf, mayonnaise, tarte aux pommes, boisson alcoolisée) sont restées infructueuses.

La description de ce premier foyer de type F à *Clostridium baratii* a fait l'objet de deux publications :

Une description clinique des cas et de l'investigation menée conjointement avec l'ARS et l'InVs :

Cluster of two cases of botulism due to *Clostridium baratii* type F in France, November 2014.

Castor C, Mazuet C, Saint-Leger M, Vygen S, Coutureau J, Durand M, Popoff M, Jourdan Da Silva N.

Euro Surveill. 2015 Feb 12;20(6)

Une description microbiologique et séquençage complet du génome (NGS) des souches isolées de ces deux patients

Characterization of the first *Clostridium baratii* strain responsible for an outbreak of botulism type F in France

Christelle Mazuet, Jean Sautereau, Christine Legeay, Christiane Bouchier, Philippe Bouvet, Nathalie Jourdan da Silva, Christine Castor and Michel R Popoff
Journal of Clinical Microbiology & Case Reports 2015 Mar 12 Volume 1 • Issue 1 • 008

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 autoimmunes 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 2014, 17 demandes d'analyse de botulisme (soit le double de l'année précédente) ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Miller Fisher), de polyradiculonévrites chroniques ou de myasthénies. A la suite de nos résultats négatifs en identification de botulisme et évoquant une autre origine des paralysies et diminution des sécrétions (origine autoimmune ou autre), les analyses complémentaires menées par les laboratoires demandeurs ont permis de confirmer le 2^o diagnostic.

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 .

Un total de 15 échantillons de sérum a été analysé, 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.

3-1-2 Surveillance des infections à *C. difficile* (Laboratoire associé)

3-1-2-1 Réseau de partenaires

Le CNR des bactéries Anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur, Paris), son laboratoire associé « *Clostridium difficile* » (Université Pierre et Marie Curie, site Saint-Antoine, microbiologie) et un réseau de 4 laboratoires experts (Rouen, Nancy, Montpellier, Toulouse) couvrant chacun une région, assurent une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

3-1-2-2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Le laboratoire associé et les laboratoires experts assurent le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un **signalement** aux autorités sanitaires. Les cas signalés correspondent soit à des formes sévères d'infections (*cf* définitions de la sévérité dans le guide « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridium difficile* » InVS 2006) soit à des cas groupés (épidémies). Cependant il est fréquent que les souches reçues n'aient pas fait

l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires. Le motif d'envoi des souches qui doit être précisé sur la feuille d'accompagnement (infection communautaire motivant l'hospitalisation, transfert en réanimation pour infection à *C. difficile*, décès lié à l'infection à *C. difficile* dans les 30 jours, hyperleucocytose >20 000/mm³, traitement chirurgical de l'infection à *C. difficile* épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours noté. Le tableau III montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (ces critères ne sont pas exclusifs).

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2014 (565 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	63	294	208
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	19	346	200
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	11	349	205
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	64	283	218
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	8	334	223
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	206	210	149

NR : non renseignés

Le nombre de prélèvements reçus par chaque laboratoire est détaillé dans le tableau IV et l'évolution du nombre de prélèvements reçus est représentée sur la figure 1.

Tableau IV : Répartition par laboratoire et par an des prélèvements reçus depuis 2007

Laboratoire	Nombre de prélèvements reçus en							
	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007
CNR (Institut Pasteur)	14	9	22	10	4	6	4	25
Laboratoire associé Paris	427	350*	260	345	298	291	348	475
Laboratoire expert Nancy	21	36	22	61	23	10	21	35
Laboratoire expert Montpellier	42	31	29	30	38	27	28	35
Laboratoire expert Toulouse	27	32	36	46	61	63	59	18
Laboratoire expert Rouen	34	44	31	47	47	96	77	75
Laboratoire expert Nice	0	90*	64	57	80	68	80	117
Total	565	592	464	596	551	561	617	780

*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.

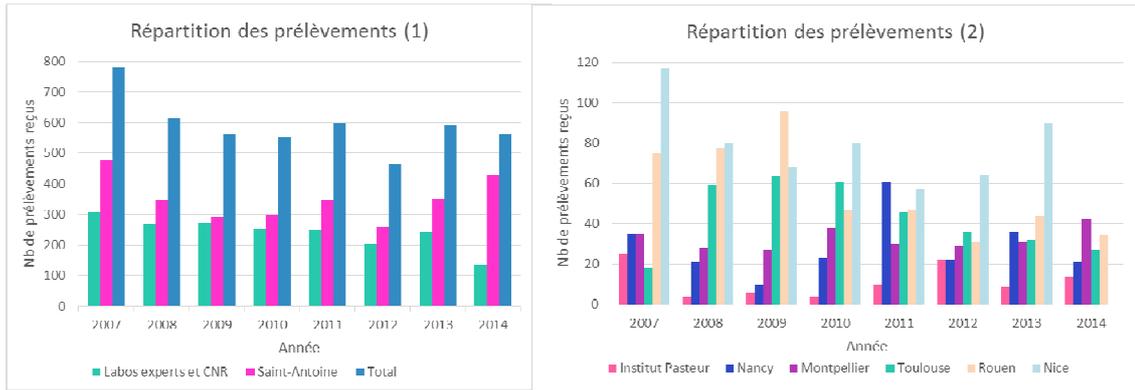


Figure 1: Répartition par laboratoire des prélèvements reçus depuis 2007, pour le laboratoire associé Saint-Antoine (1) et pour les laboratoires experts et le CNR Institut Pasteur (2)

La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la figure 2.

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 aussi avec l'intérêt particulier porté par certains microbiologistes aux bactéries anaérobies.

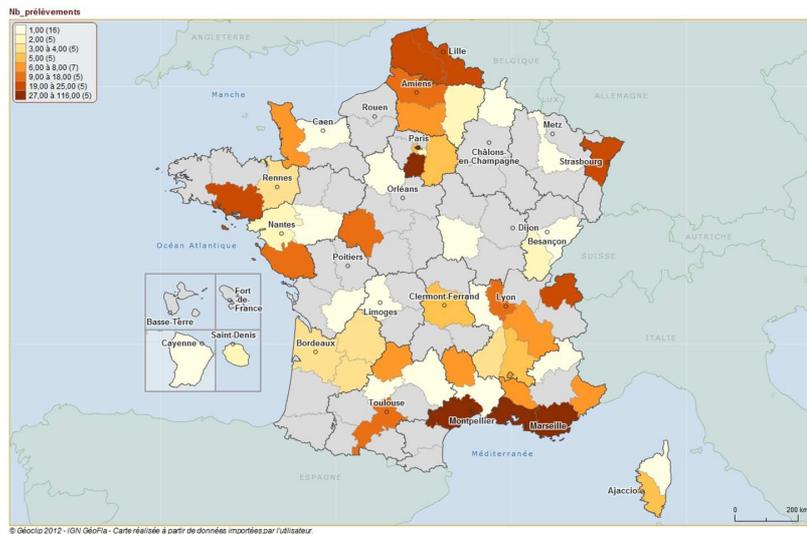


Figure 2 : Répartition des prélèvements (n=565) envoyés par département, en 2014
A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement

3-1-2-3 Analyse de la distribution des souches de *C. difficile* en fonction des critères pertinents et analyse des tendances

En 2014, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient de selles (474 souches) à l'exception de 3 souches qui provenaient d'une biopsie (n=1) et de prélèvement digestif (n=2). Dans 21 cas l'origine du prélèvement de la souche toxigène n'était pas renseignée.

Deux cent quatre-vingt-dix-sept souches (61,2%) de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes, 188 (38,8%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 13 cas.

L'âge des patients, renseigné dans 485 cas, chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représenté sur la figure 3. **Au total, en 2014, 76,7% des patients ont plus de 65 ans** (versus 77% en 2013).

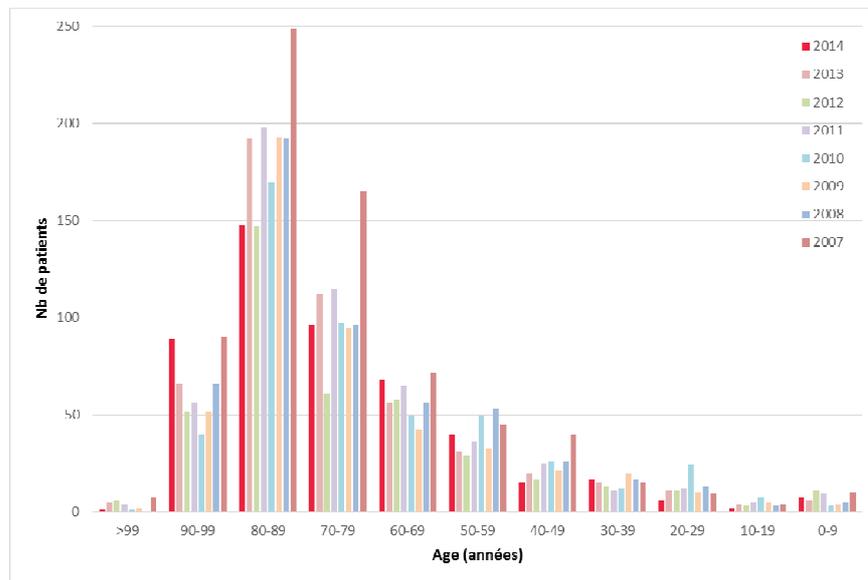


Figure 3 : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxinogène a été isolée en fonction de l'âge et en fonction de l'année (2007 à 2014)

Les 10 PCR-ribotypes recherchés par les laboratoires représentent 63,9% des souches toxinogènes. Les souches 027, 014/020/077 et 078/126 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 41,4% des souches toxinogènes (Tableau V, figure 4). Pour 48 souches (9,6%) l'identification exacte du PCR-ribotype n'a pas été faite (souches non 027) ou le PCR-ribotype n'a pas été comparé à la totalité du panel des 10 PCR-ribotypes disponibles dans tous les laboratoires.

Tableau V: Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2014

PCR-ribotype*	Nombre de souches 2014	Nombre de souches 2013	Nombre de souches 2012	Nombre de souches 2011	Nombre de souches 2010
027	67 (13,5%)	126 (23,8%)	91 (21,7%)	139 (25,6%)	96 (19,1%)
014/020/077	80 (16,1%)	92 (17,3%)	55 (13,1%)	84 (15,5%)	77 (15,3%)
078/126	59 (11,9%)	46 (8,7%)	54 (12,9%)	76 (14%)	72 (14,3%)
002	33 (6,6%)	22 (4,1%)	16 (3,8%)	36 (6,6%)	30 (6%)
001	26 (5,2%)	11 (2,1%)	10 (2,4%)	12 (2,2%)	14 (2,8%)
005	11 (2,2%)	10 (1,9%)	9 (2,1%)	11 (2%)	ND
015	19 (3,8%)	10 (1,9%)	3 (<1%)	10 (1,8%)	ND
017	4 (<1%)	8 (1,5%)	5 (1,2%)	3 (<1%)	0 (<1%)
106	15 (3%)	10 (1,9%)	2 (<1%)	3 (<1%)	5 (1%)
053	4 (<1%)	2 (0,4%)	0 (<1%)	0 (<1%)	1 (<1%)
autres	132 (26,5%)	156 (29,4%)	93 (22,1%)	112 (20,6%)	179 (35,6%)
ND (non 027)	48 (9,6%)	37 (7%)	82 (19,5%)	57 (10,5%)	29 (5,8%)
Total	498	530	420	543	503

*PCR-ribotype de la souche ou très proche de celui-ci
 ND : non déterminé (PCR-ribotype non 027, mais identification précise non faite)

Parmi les PCR-ribotypes autres, les PCR-ribotypes 023 (14 souches), 087 (11 souches), 012/048 (10 souches), 056 (8 souches) et 003 (7 souches) sont les plus fréquemment retrouvés en 2014 mais ne sont pas caractérisés par tous les laboratoires. Le PCR-ribotype 023 produit la toxine binaire. Cette souche peu fréquente en 2012 et 2013 a été isolée à 14 reprises en 2014. L'utilisation de la PCR GenXpert (Cepheid) qui détecte la toxine binaire pourrait être à l'origine de l'augmentation du nombre de souches 023 identifiées (envoi de la souche par certains laboratoires pour caractérisation dès lors que la présence de la toxine binaire a été détectée)

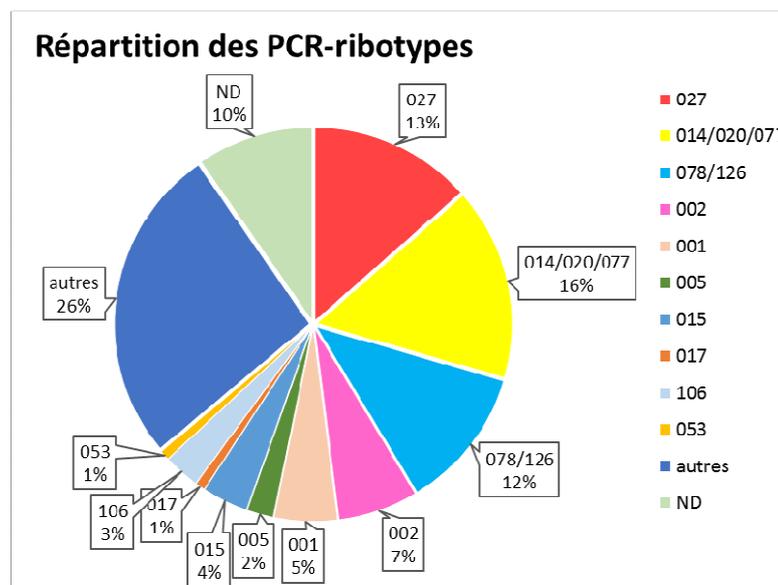


Figure 4 : répartition des PCR-ribotypes en 2014

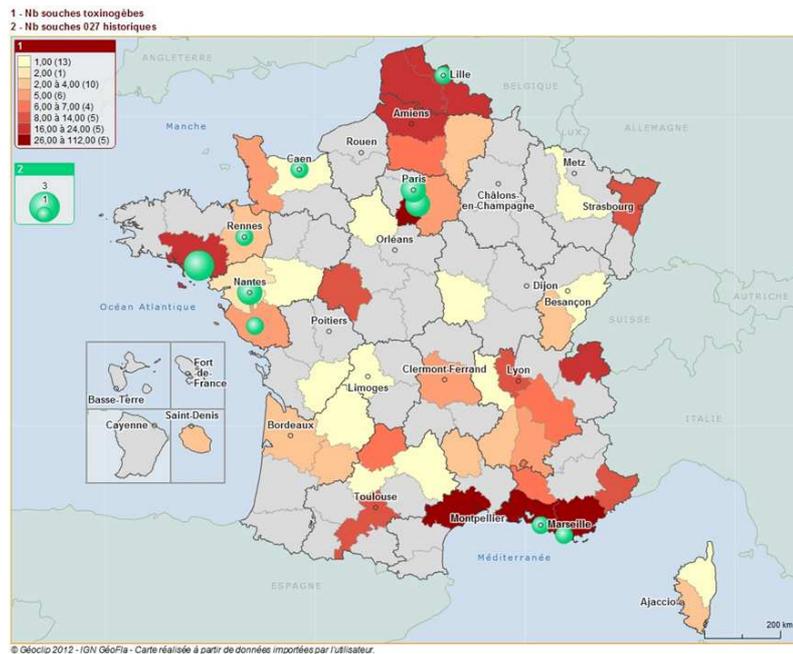


Figure 5b : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques en fonction des départements, en 2014. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

Pour la première fois, le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé en France est le 014/020/077, retrouvé sur tout le territoire (figure 6). Les souches de PCR-ribotype 027 arrivent en 2^{ème} position. Les souches de PCR-ribotype 078/126 arrivent en 3^{ème} position (figure 7).

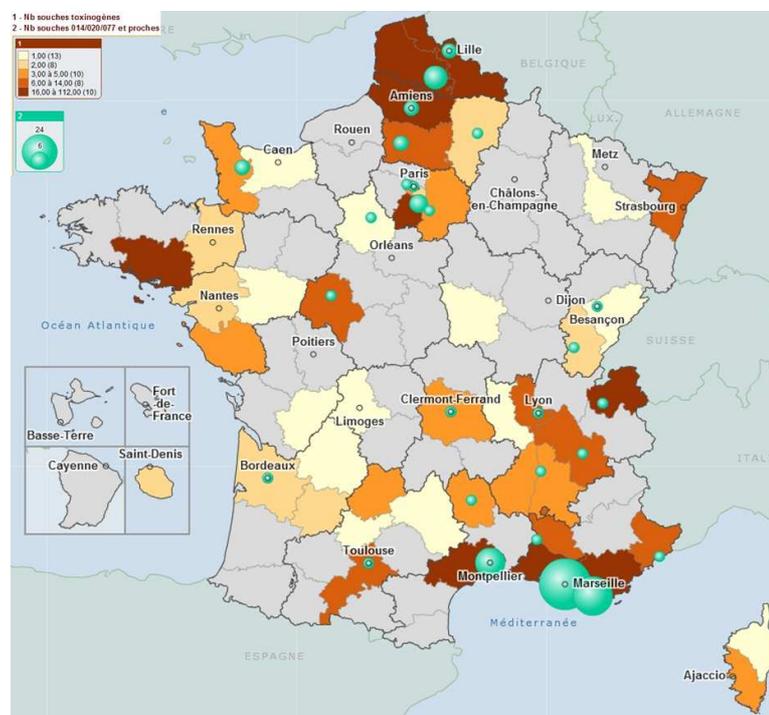


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 ou proches du PCR-ribotype 014/020/077 en fonction des départements en 2014. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

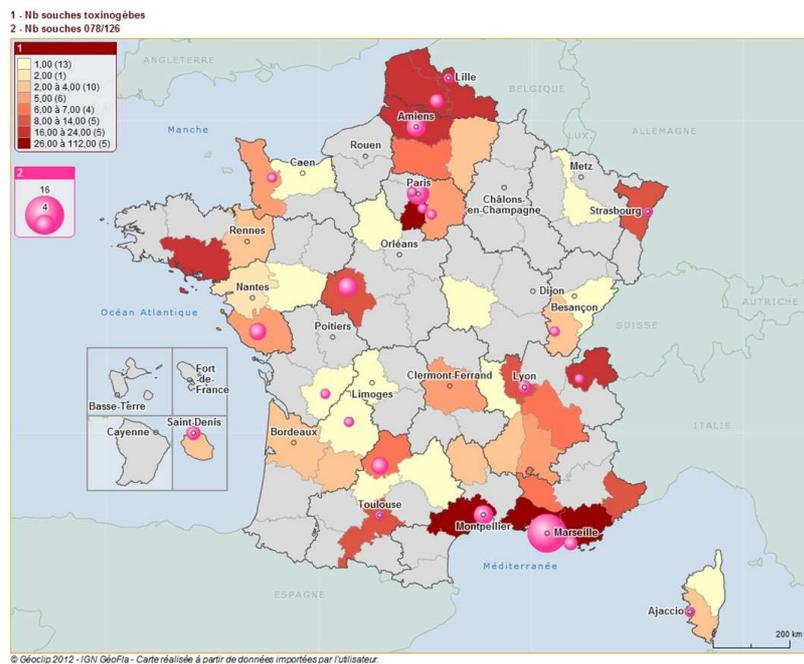


Figure 7 : Répartition des souches PCR-ribotype 078/126 ou proches du PCR-ribotype 078/126 en fonction des départements en 2014. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

Au cours de l'année 2014 une ré-augmentation 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, 2007-2014

	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007
Nb de recherche <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	445	390	343	453	444	421	461	656
Nb de recherche positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	162	159	150	223	207	188	193	264
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	36,4	40,8	43,7	49,2	46,6	44,7	41,9	40,2
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	67	100	87	127	95	116	85	145
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs hors souches 027 (%)	25,1	20,3	24,6	29,4	32,1	23,6	28,7	23,3

3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux

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

Les laboratoires ne nous demandent que très 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.

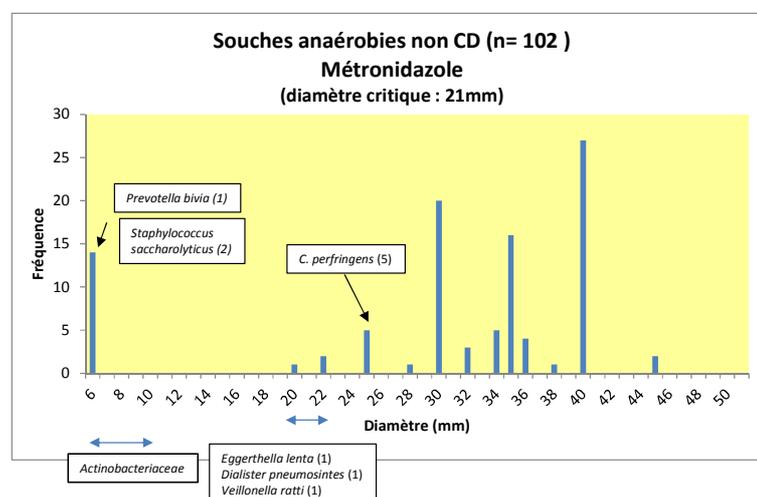
Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des beta-lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

En 2014, parallèlement aux tests phénotypiques le CNR a effectué sur **99 souches** (62 à Gram+ et 37 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 le tableau 4-1 (chapitre 8).

Les données d'antibiorésistance des 61 souches de *Clostridium difficile* sont données tableau 4-2 (chapitre 8) et 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. Une souche de *Prevotella bivia* (transmise par un LBM de la Réunion) présentait une résistance au contact d'un disque de métronidazole (16µg) (CMI 192µg/ml). Par PCR aucun gène *nim* connu n'a pu être identifié. Un séquençage NGS devra être effectué pour tenter de trouver l'origine de cette résistance. Tous les *Clostridium difficile* testés (n=60) étaient très sensibles (diamètre ≥ 28 mm). Trois souches (*Eggerthella lenta*, *Dialister pneumosintes* et *Veillonella ratti*) présentaient une sensibilité diminuée à cet antibiotique. *Staphylococcus saccharolyticus* (2 souches) - seule espèce anaérobie stricte de ce genre - présentent une résistance naturelle au métronidazole.

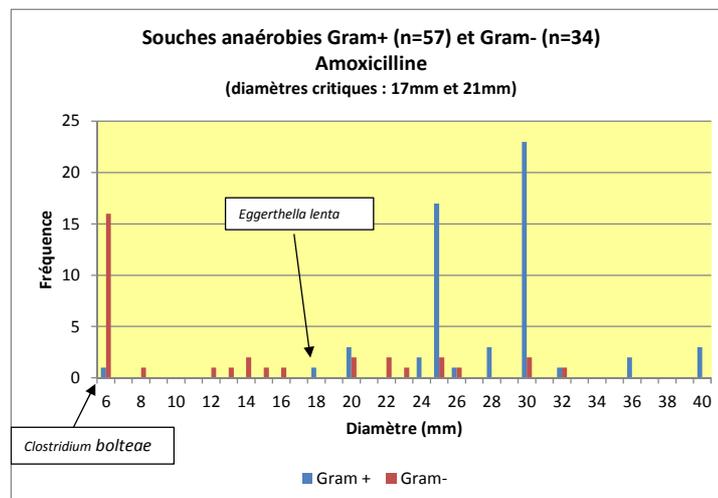


Amoxicilline, association amoxicilline/ac. clavulanique et imipénème

Parmi les bactéries à Gram- (34 souches), les souches du genre *Bacteroides* [*B. fragilis* (12 souches), *B. thetaiotaomicron* (1), *B. salyersiae* (1), *B. xylanisolvens* (2)] ainsi qu'une souche de *Butyrivimonas virosa* présentent une résistance élevée à l'amoxicilline (résistance au contact du disque). Parmi celles-ci la majeure partie ne voyait pas leur activité restaurée par l'acide clavulanique (à l'exception de 5 souches de *B. fragilis* et 1 souche de *B. xylanisolvens*).

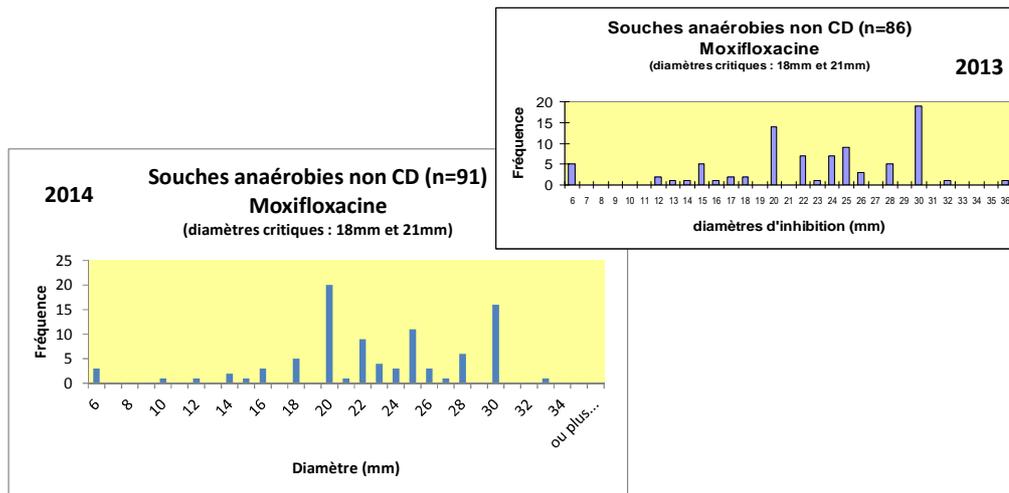
Parmi les bactéries à Gram + (57 souches) seule une souche de *Clostridium bolteae* présentait une résistance au contact d'un disque d'amoxicilline et voyait son activité modérément restaurée par l'acide clavulanique.

Les souches exprimant une beta-lactamase appartenaient toutes au genre *Bacteroides* (tableau 4-1 - chapitre 8) [*B. fragilis* (14 souches), *B. xylanisolvens* (2), *B. heparinolyticus* (1), *B. thetaiotaomicron* (1) et *B. salyersiae* (1)]. Parmi les 21 souches de *Bacteroides* présentant une résistance aux beta-lactamines, 18 (86%) exprimaient une beta-lactamase. La présence des gènes *cepA*, *cfxA* et *cfiA* a été recherchée par PCR chez 16 souches. Le gène *cfiA* codant une carbapénémase était présent chez 4 souches mais exprimé chez 3 souches seulement (diamètre de la zone d'inhibition : 6mm) (tableau 4-1 - chapitre 8).



Moxifloxacine

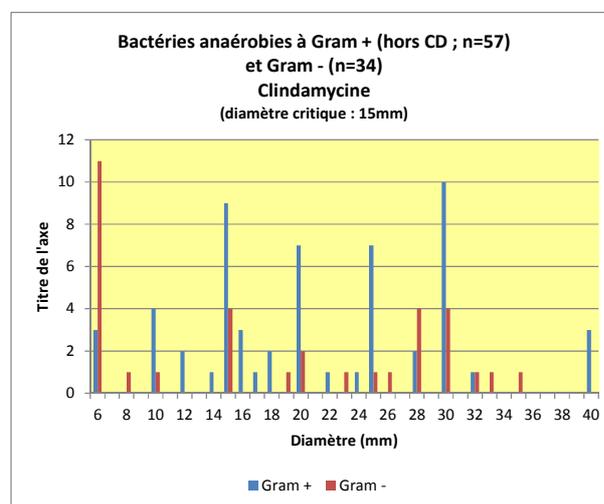
Sur les 91 souches testées, 37 présentaient une résistance ou une sensibilité intermédiaire à la moxifloxacine [3 souches avec une résistance au contact du disque : « *Desulfovibrio fairfieldensis* », *Clostridium bolteae* et *C. sordellii*].



En pourcentage les souches résistantes + intermédiaires semblent en très nette augmentation par rapport à l'année précédente (39.6% vs. 17.7% en 2013 - différence significative).

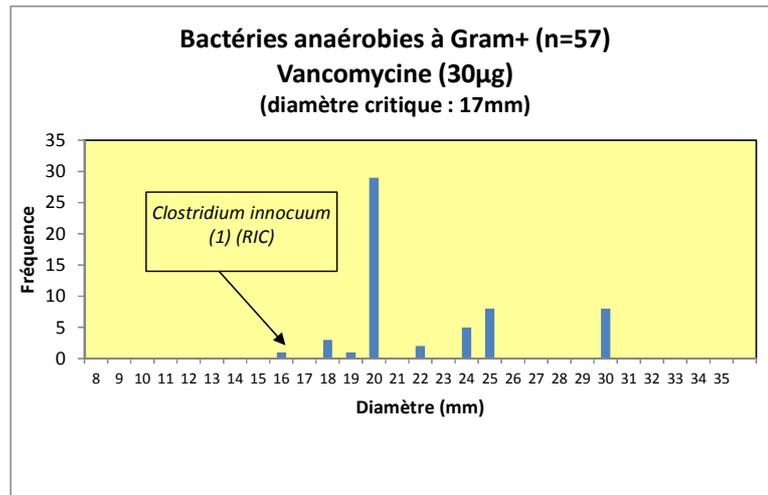
Clindamycine

Parmi les bactéries à Gram+ (hors *Clostridium difficile*) (n=57) des résistances à la clindamycine ont été trouvées pour 18 souches : *Clostridium baratii* (2 souches – diamètre 10mm) ; *C. botulinum* (1 souche – diamètre 15mm) ; *C. perfringens* (8 souches – diamètres de 12 à 15mm) ; *C. sporogenes* (2 souches (diamètres 10mm et 15mm) ; *Robinsoniella peoriensis* (2 souches (diamètres 10mm et 14mm) ; *Varibaculum cambriense* (1 souche – diamètre 6mm) et *Peptoniphilus tyrelliae* (1 souche – diamètre 6mm).



Vancomycine (bactéries à Gram+)

Les bactéries à Gram+ (hors *Clostridium difficile*) restent bien sensibles *in vitro* à la vancomycine. Une souche de *Clostridium innocuum* présentait une sensibilité diminuée (diamètre 16mm) (phénomène connu chez les *Clostridium* du « groupe RIC » i.e. *C. ramosum*, *C. innocuum* et *C. clostridioforme*)



Sensibilité aux antibiotiques chez *Clostridium difficile*

Chez les 60 souches de *Clostridium difficile* étudiées au CNR, les proportions des souches intermédiaires + résistantes et leurs PCR-ribotypes sont données dans le tableau 4-2 , chapitre 8). Les distributions de fréquence des diamètres pour les antibiotiques testés sont illustrées page suivante.

Le **métronidazole** reste très actif *in vitro* avec des diamètres supérieurs ou égaux à 28mm de même que la **vancomycine** (diamètres 20-28mm).

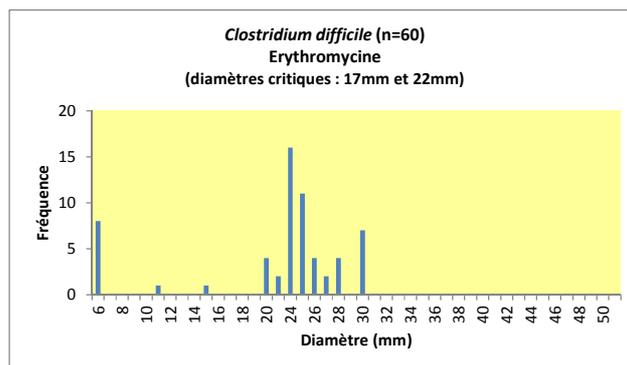
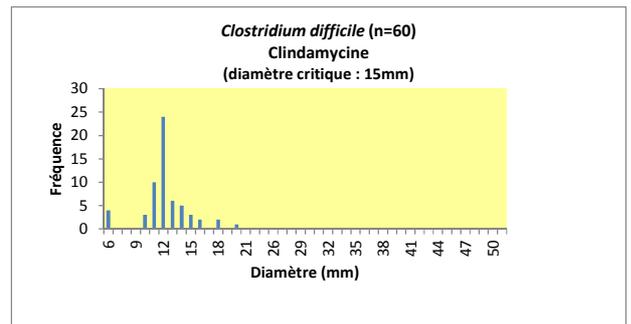
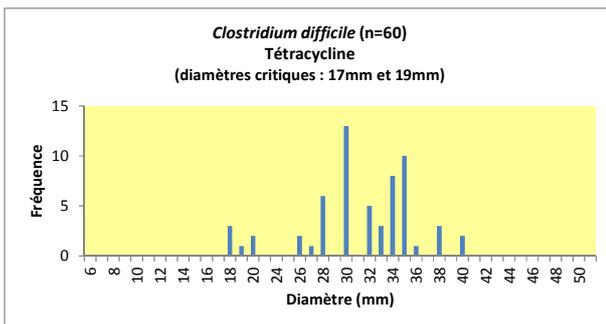
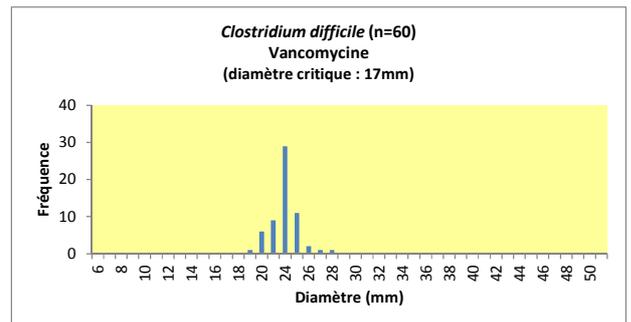
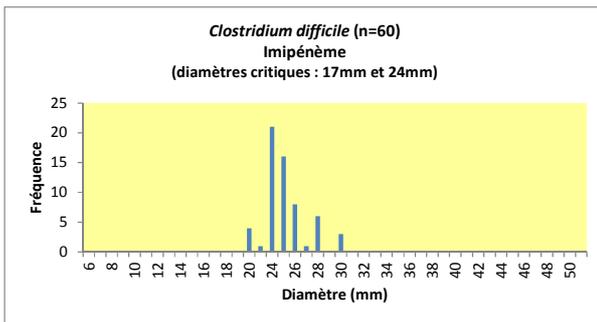
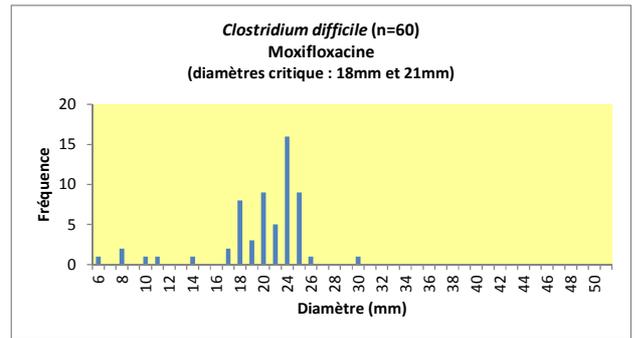
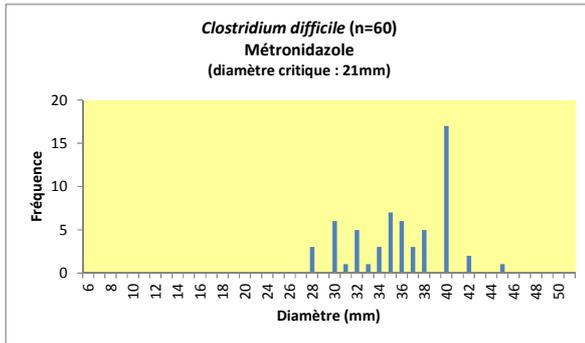
L'activité de la **clindamycine** est faible : seule 8 souches présentaient une sensibilité moyenne (diamètres 15-20mm).

Trois souches (1 souche 078/126 et deux souches « non 027-non 078/126 ») présentaient une sensibilité intermédiaire (diamètres 18mm) à la **tétracycline**.

Huit souches (4 souches 027 ; 2 souches « 078/126 » et 2 souches « non027-non 078/126 ») présentaient une résistance au contact pour l'**érythromycine**.

La sensibilité des souches de *Clostridium difficile* à la **moxifloxacine** reste moyenne : près de la moitié des souches présentaient une résistance ou une sensibilité intermédiaire (8 souches R (diamètres 6-17mm) ; 20 souches intermédiaires (diamètres 18-20])

Dix-neuf souches présentaient une sensibilité intermédiaire à l'**imipénème** (diamètres compris entre 20 et 23mm) (4 souches de PCR-ribotype 027 ; une souche avec une délétion de 54bp dans le gène *tcdC* ; une souche non toxigène (non pathogène) et 13 souches « non078/126 – non 027 »).



**Distributions de fréquence des diamètres d'inhibition des souches de *Clostridium difficile* (n=60) pour quelques antibiotiques
 Année 2014**

3-2-2 Surveillance de la résistance de *C. difficile* aux anti-infectieux (Laboratoire associé)

La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, au métronidazole, à la tétracycline et à la vancomycine (méthode des disques) a été testée pour 497, 497, 496, 452, 496 et 459 souches de *C. difficile* toxigènes respectivement, en 2014. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 36 et 40 souches respectivement.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre <22mm) de 34,4%, pour la clindamycine (diamètre <15mm) de 88,9%, pour la moxifloxacine (diamètre <21mm) de 28,6%, pour la tétracycline (diamètre <19) de 3% (Tableau VII). Les taux de résistance à l'érythromycine et à la moxifloxacine ont diminué comparés aux années précédentes. Cette augmentation de la sensibilité est probablement liée à la diminution des souches 027 épidémiques isolées.

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

La majorité des souches toxigènes étaient sensibles au métronidazole (diamètre \geq 21mm pour les disques chargés à 5 μ g et $>$ 35mm pour les disques chargés à 16 μ g, ou CMI \leq 2 mg/l selon l'Eucast) ; 2 souches avaient une CMI à 3 mg/l (souches de PCR-ribotype 106 : diamètre 14 mm (disque chargé à 5 μ g) et diamètre 32 mm (disque chargé à 16 μ g) et 002) par la méthode du E-test. Neuf souches ont montré un diamètre entre 28 et 35 mm avec l'utilisation d'un disque de métronidazole chargé à 16 μ g (sensible $>$ 35mm).

Il n'est cependant pas rare de voir des colonies dans le diamètre du métronidazole ; ce phénomène est à surveiller.

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 2007.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline
% de souches avec un diamètre	<22mm	<15mm	<21mm	<19mm
2007	41,1	81,2	41,7	ND
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

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 Participation aux réseaux de surveillance

3-3-1 Botulisme

La situation épidémiologique du botulisme fait l'objet d'une mise au point régulière avec l'InVS (principal interlocuteur L. King puis N. Jourdan da Silva). Des échanges sont établis à propos de chaque foyer ou suspicion avec l'InVS, les cliniciens concernés, l'ARS, et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé.

Contribution au réseau international

Notre laboratoire est régulièrement sollicité pour le diagnostic et la surveillance du botulisme dans les DOM comme La Réunion et Mayotte.

3-3-2 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Les résultats de typage bactérien de *Clostridium difficile* sont enregistrés sur un site web sécurisé

(https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf). Ce site permet à chaque laboratoire expert ou associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats. Depuis août 2009, l'identification de 10 PCR-ribotypes régulièrement retrouvés en France a été mise en place. Les souches de référence correspondant aux PCR-ribotypes 001, 002, 014/020/077, 017, 027, 053, 078/126 et 106 ont été envoyées aux différents laboratoires experts et le serveur de résultat de l'Institut Pasteur a été modifié afin d'intégrer dans les résultats l'identification de ces différents PCR-ribotypes. En 2011, les PCR-ribotypes 005 et 015 ont été ajoutés et adressés aux laboratoires experts.

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

Ce site est consultable dans sa totalité par l'Institut de Veille Sanitaire, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les CCLIN, les ARS et les laboratoires experts ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site est régulièrement mis à jour.

De plus, F. Barbut et C. Eckert sont régulièrement en contact avec B. Coignard, K. Chamli, et S. Vaux (InVS) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

Comme l'année précédente, le CNR et son laboratoire associé ont réuni le **23 mai 2014** à Paris les représentants des laboratoires experts et de l'InVS.

3-3-3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

- **F. Barbut** et **C. Eckert** sont membre de l'ESGCD (European Study Group on *C. difficile*). **F.**

Barbut est membre du comité exécutif et occupe les fonctions de trésorier depuis 2009.

- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent activement aux études réalisées sous l'égide de l'**ECDC** sur la surveillance des infections à *C. difficile* (Bauer *et al.* Lancet Inf. Dis. 2011).
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent au projet **ECDIS-net** (supporting capacity building of *C. difficile* infections at European level) (van Dorp *et al* Lancet Inf. Dis. 2015 soumis)
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent à l'étude **EUCLID** (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea) (Davies *et al* Lancet Inf. Dis. 2014, Barbut *et al* Presse med 2015)
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent au projet **CloSER** (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes)
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent au projet **LuCID** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study)

3 - 4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

1. Projet ECDIS-net (supporting capacity building of *C. difficile* infections at European level).

Ce projet est coordonné par Dr. Ed J. Kuijper, Mark. H. Wilcox, Daan W. Notermans, Val Hall, Petra Gastmeier, Carl Suetens et Klaus Weist, et a obtenu un financement de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden

L'objectif de ce réseau européen est d'améliorer la capacité des laboratoires des Etats Membres européens, de la Norvège, de l'Islande et du Liechtenstein à détecter et surveiller les infections à *Clostridium difficile*, de construire et maintenir une base de données pour une nomenclature de référence des PCR-ribotypes et de développer et améliorer les protocoles de surveillance des infections à *C. difficile*.

F. Barbut et **C. Eckert** ont collaboré au WP4 (diagnostic) et au WP2 (épidémiologie).

Standardised *Clostridium difficile* infection surveillance in European acute care hospitals: a feasibility study. van Dorp S, P Kinross, P Gastmeier, M Behnke, A Kola, M Delmée, A Pavelkovich, S Mentula, **F Barbut**, A Hajdu, A Ingebretsen, H Pituch, D Lemeni, M Jovanović, C Wiuff, D Schmid, K Olsen, M Wilcox, C Suetens, and E Kuijper, for the European *Clostridium difficile* infection surveillance network (ECDIS-Net) **on behalf all participants.**

Lancet Inf. Dis. 2015 soumis

2. Etude EUCLID (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea).

Cette étude est coordonnée par M. Wilcox, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, UK avec le support de coordinateurs nationaux (F. Barbut pour la France) et le soutien financier des laboratoires Astellas.

Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au Centre National de Référence des anaérobies a été chargé de mettre en place et de coordonner l'étude EUCLID en France en 2012-2013 (étude non interventionnelle, bi-annuelle de prévalence des infections à *C. difficile*).

Les résultats français ont permis:

- de déterminer l'incidence moyenne des ICD rapportée en 2012 par les établissements de santé participants. Cette incidence était de 3,6 ($\pm 2,9$) pour 10000 patients-jours, en augmentation par rapport à 2009 (étude ICD-RAISIN)
- de mettre en évidence un sous-diagnostic des infections à *C. difficile* de 55,6%, lié soit à un manque de sensibilité des méthodes utilisées (25,4%) soit à un manque de suspicion clinique (30,2%).

Prévalence des infections à *Clostridium difficile* (CD) chez les patients hospitalisés avec une diarrhée: résultats d'une étude française prospective multicentrique. Barbut F., Ramé L., Petit A., Suzon L., de Chevigny A., Eckert C., pour le réseau français EUCLID.
Presse med 2015 sous presse

3. Etude ClosER (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes) (2012-2014)

Cette étude est coordonnée par M. Wilcox, Leeds, UK et E. Kuijper, Leiden, Pays Bas sous l'égide de l'ESGCD (European Study Group on *Clostridium difficile*).

Il s'agit d'une étude européenne multi centrique, prévue sur 3 ans dont l'objectif est de surveiller la résistance aux antibiotiques des différents PCR-ribotypes. Cette enquête fait suite au lancement de la fidaxomicine et est financée par les laboratoires Astellas. Le laboratoire de l'hôpital Saint Antoine a envoyé 25 souches de *C. difficile* à Leeds afin de déterminer la sensibilité des souches de *C. difficile* vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques dont la fidaxomicine.

Closer: pan European surveillance of antimicrobial resistance in *C. difficile* Pre- and Post-fidaxomicin introduction. Freeman J., Vernon J., Longshaw C., Wilcox M.
ICAAC 2014, Washington DC, 5-9 septembre, C-168.

4. Etude LuCID (Longitudinal European *Clostridium difficile* Infection Diagnosis Surveillance Study) (2014-2015)

Cette étude est coordonnée par M. Wilcox, G. Davis et K. Davies, University of Leeds, et a reçu le soutien financier de Sanofi-Pasteur.

Cette étude est une étude pilote européenne de surveillance des infections à *Clostridium difficile* (étude LuCID). Il s'agit d'une étude non interventionnelle qui durera d'avril 2014 à mars 2015. Les objectifs sont de connaître l'incidence des infections à *C. difficile*, les caractéristiques sommaires des patients infectés (âge, sexe, délai de survenue de l'infection, premier épisode ou récurrence), la densité de prescription de coprocultures pour recherche de *C. difficile*, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées.

Le laboratoire associé est chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Cette étude est réalisée auprès de 20 laboratoires d'établissements hospitaliers.

Abstract for Longitudinal European *Clostridium difficile* Infection Diagnosis Surveillance Study (LuCID). K Davies, G Davis, F Barbut, C Eckert, N Petrosillo, M Wilcox

(ECCMID 2015 accepté)

Dans le cadre de cette étude, il a été demandé aux laboratoires, sur la base du volontariat, d'adresser toutes les souches de *C. difficile* toxigènes, correspondant à une infection à *C. difficile*, isolées dans leur laboratoire au cours du mois d'octobre 2014. Dix-neuf des 20 laboratoires ont accepté de participer. Les souches sont actuellement en cours de caractérisation au laboratoire associé. Cette étude permettra de mieux appréhender les clones qui circulent actuellement en France.

5. Caractérisation d'isolats cliniques de *Clostridium difficile*, isolés à Saint Philibert

Collaboration avec Bertille Mullie, dans le cadre de sa thèse d'exercice pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie (2013-2014)

L'objectif de l'étude était de caractériser toutes les souches de *C. difficile* isolées au cours de l'année 2013 à l'hôpital Saint Philibert. Les données cliniques des patients ont été analysées et confrontées aux résultats de typage, réalisés au laboratoire associé. Les résultats de ce travail ont permis à Bertille Mullie de soutenir sa thèse d'exercice en pharmacie en mai 2014 à l'université de Lille (Analyse comparative des infections à *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 versus non-027 sur les aspects microbiologique, épidémiologique et médico-économique).

6. Les infections à *Clostridium difficile* chez des patients hospitalisés dans un centre hospitalo-universitaire (Hôpital Edouard Heriot, Lyon) - Thèse d'université de N. Khanafer.

Etude réalisée en partenariat avec les HCL (2011-2014)

L'objectif principal de cette thèse était de décrire le pronostic des patients infectés par *C. difficile* (rémission, complications, décès) grâce à :

- une revue extensive de la littérature en utilisant les critères ORION (*Outbreak Reports and Intervention Studies of Nosocomial Infection*)
- la description de l'histoire naturelle d'ICD chez des patients hospitalisés à HEH
- la modélisation la transmission de l'ICD

Le rôle du laboratoire associé était d'assurer la caractérisation moléculaire des souches de *C. difficile* isolées.

***Clostridium difficile* infection in a French university hospital: molecular characteristics of isolates and factors associated with severity.** Khanafer N., F. Barbut, M. Perraud, C. Eckert, P. Vanhems

(Résumé accepté sous format poster à l'ECCMID 2014)

Factors associated with severe *Clostridium difficile* infection according to 4 different severity definitions. N Khanafer, F Barbut, C Eckert, M Perraud, P Vanhems

(ICDS 2015 accepté communication orale)

7. Etude de prévalence européenne sur les infections gastro-intestinales communautaires : European, multi-centre, prospective quarterly point prevalence study of community-acquired diarrhoea (EUCODI)

Etude européenne coordonnée par F. Allerberger, Autriche et financée par l'ESCMID Food- and Water-borne Infections Study Group (EFWISG) et BioFire Diagnostics, Salt Lake City, Utah

Il s'agit d'une étude de prévalence pour identifier les microorganismes responsables de gastro-entérites communautaires en Europe et estimer le sous diagnostic de ces infections.

Community acquired gastroenteritis and the spectrum of pathogens EUCODI study 2014. Spina A., Kerr K., Cormican M., **Barbut F.**, Eigentler A., Zerva L, Tassios P., Popescu G., Eerola E., Batista J., Maass M., Aschbacher R., Olsen K., Allerberger F.
J. Clin Microbiol., 2015 soumis

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

4-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (ARS et CCLIN) des épidémies et des cas sévères d'infections (*cf* guide Raisin, http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/). Il s'agit d'une surveillance ciblée. Les établissements réalisant un signalement doivent envoyer au laboratoire expert de leur région les souches isolées de l'épisode signalé afin 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 l'InVS. De plus chaque responsable des CCLIN a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

L'année 2014 a été marquée par la suite de l'épidémie qui avait touché Marseille et sa région en 2013 ainsi que par une diminution très nette des souches 027 reçues. Les souches 027 reçues provenaient majoritairement de 3 départements : la Ville de Paris, le Nord et les Bouches du Rhône. Deux nouveaux départements français ont été touchés par cette souche (Maine et Loire et Var). Cette diminution (en nombre et en proportion) pourrait en partie être expliquée par l'utilisation de plus en plus importante par les laboratoires du test GenXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive des souches 027. Les laboratoires du Nord et des Bouches du Rhône envoient probablement de façon moins systématique leur souche pour typage.

En 2014, comme ce fut le cas en 2013 et en 2012, deux nouvelles souches très particulières ont été isolées chez des patients atteints d'infection à *C. difficile* hospitalisés respectivement à Paris et à Ecully (Rhône). Ces souches, rares, ont la particularité de ne produire que la toxine binaire, mais pas les toxines A et B. Elles ont été identifiées comme appartenant au PCR-ribotype 033. Ces souches sont à surveiller mais n'ont pour l'instant pas fait l'objet d'une alerte.

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

5 - 1 Enseignements réalisés en 2014

5-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Cours (MP) "Mécanismes moléculaires de l'action des exotoxines bactériennes" Master M2 "Ecologie microbienne, Pathologie des microorganismes et Anti-infectieux" Faculté de Pharmacie Paris XI, Chatenay Malabry, (30 septembre 2014).
- Cours (MP) "Botulisme" dans le cadre du DU Master 2 Pro "Risques sanitaires NRBC", organisé par le Prof. CN Thiolet, Hôpital du Val de Grâce, Paris 8 octobre 2014.
- Cours (MP) Institut de Formation Alpa, Institut Pasteur de Lille, dans le cadre de la formation, Microorganismes pathogènes et aliments:
 - Bactériologie, épidémiologie, écologie, survie et multiplication dans les aliments des *Clostridium botulinum*.
 - Bactériologie, épidémiologie, écologie, survie et multiplication dans les aliments des *Clostridium perfringens*.
 Lille 22 octobre 2014.

Direction et soutenance de thèse

- Chloé Connan 2010-2013 (Université Paris Sud, Microbiologie, Innovation thérapeutique)
 - Soutenance Institut Pasteur 18 octobre 2013 "Neurotoxinogénèse et passage des neurotoxines botuliques à travers la barrière intestinale"
 - Jury de thèse: Anne COLLIGNON, Daniel GILLET (rapporteur), Alain VANDEWALLE (rapporteur), Didier HILAIRE, Jorfdi MOLGO, Michel R. POPOFF.

5-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

F. Barbut

Master 2, semestres P5, P6, P7, Spécialité Microbiologie (Paris VI)

DIU de pathologie infectieuse (Paris V, VI)

DIU « hygiène hospitalière et prévention des infections nosocomiales » (Paris V, VI, VII)

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

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

Cours assurés à l'**IFTAB**

DU Réanimation en Pathologie Infectieuse (DURPI) Bichat Claude Bernard

DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologies infectieuses, (Paris VI)

C. Eckert

Master 1 Santé, UE de microbiologie, Université Paris VI

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

DESC Pathologie Infectieuse et tropicale

DHU Fast, Infectiologie en Gériatrie, Paris VI

5-2 Formations aux professionnels de santé

5-2-1 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

F. Barbut et C. Eckert : Actualités sur les infections à *C. difficile*
Journées de biologie clinique. CIS Pasteur (21/01/2014)

F. Barbut et C. Eckert : Infections à *C. difficile* : nouveaux enjeux
Journées de biologie praticienne, Paris (05/12/2014)

➤ **Formation DPC**

F. Barbut et C. Eckert : Infections à *C. difficile* :
Staff de service, Hôpital Cochin, Microbiologie (11/03/2014)

F. Barbut et C. Eckert : Infections à *C. difficile* :
Staff de service, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, (25/03/2014)

F. Barbut et C. Eckert : Epidémiologie des infections à *C. difficile* :
Réseau RAISIN, Institut de veille sanitaire (10/04/2014)

F. Barbut et C. Eckert : Epidémiologie des infections à *C. difficile* :
CCLIN Ouest, Rennes (03/10/2014)

Eckert, C., Infections émergentes en transplantation *Clostridium difficile*.
13^{ème} journée du Groupe Transplantation et Infection (GTI), Paris 2014

Eckert, C., Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales : infections à *Clostridium difficile*
Journées Internationales de Biologie (JIB), Paris 2014

➤ **Formation DPC**

Eckert, C., *Clostridium difficile* : épidémiologie, le diagnostic et la prévention de la transmission croisée
2^{ème} Journée Hygiène et prévention des infections en EMS, Besançon 2014

Eckert, C., La transplantation de microbiote fécal dans les infections à *Clostridium difficile*
6^{ème} édition
Journée Infections nosocomiales Résistance et Innovation, Lyon 2014

Barbut F. Prise en charge des infections à *Clostridium difficile* : le new deal. Où en sommes-nous de l'épidémiologie des ICD en 2014 ? Résultats de l'étude EUCLID. Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Bordeaux, 2014

Barbut F., Enseignement sur les bactéries anaérobies. Montpellier, 20-22 mars 2014

5-3 Stagiaires accueillis

5-3-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Varela-Chavez Carolina, 06/04/2010 au 05/08/2014 : post-doc "Caractérisation de la toxine de *Clostridium sordellii*"
- Connan Chloé, Stage postdoctoral 1/11/2013 au 28/02/2015 « Caractérisation de la voie d'entrée intestinale des toxines botuliques".
- Aline Cruzols 1/10/2014 au 28/02/2015 Caractérisation des anticorps monoclonaux neutralisants des toxines botuliques, essais sur animaux.
- Diana Chapeton, stage post-doctoral, 2014-2015 "Etude de la régulation de la toxinogénèse chez *Clostridium tetani*";
- Morineaux Valérie (CEB) : thèse en cours.

5-3-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Jessica Calme, BTS Bioanalyse et contrôle, Ecole Technique Supérieure du Laboratoire (ESTL)

Arek Sulukdjian, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine

Sophie Quach, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine

5-4 Liste des guides élaborés

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Otter J. A., Yezli, S., Perl T. M., **Barbut F.**, French G. L. A guide to no-touch automated room disinfection (NTD) systems. In "Decontamination in hospitals and healthcare J. T. Walker eds—Woodhead Publishing Limited, 2014 (chapitre de livre)

5- 5 Diffusion aux professionnels de santé

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>

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 2014.

- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à l'InVS et aux CCLIN. Ce site permet à chaque laboratoire expert ou associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats qui est envoyé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- Site web RAISIN et de l'InVS: <http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/index.htm>
- Collaboration à la plaquette d'information destinée au patient (<http://www.cclinparisnord.org/Usagers/PlaquettePATIENT.pdf>) [2006]
- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » (http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/) [2006]
- Un courrier rappelant les missions du CNR et les critères de signalement et d'envoi des souches de *C. difficile* pour expertise, ainsi qu'un rappel concernant les recommandations pour le diagnostic et l'expertise des souches, les coordonnées des différents laboratoires expert et la fiche qui accompagnent les souches ont été diffusés auprès de l'InVS pour diffusion aux CCLIN et laboratoires. Par ailleurs ces mêmes documents ont été envoyés fin octobre 2013 de façon ciblée à près de 200 biologistes de la région PACA, permettant une resensibilisation aux infections à *C. difficile*, suite aux épidémies en région PACA liées à la souche 027.

5 - 6 Activités d'information, de formation et de conseil

Le CNR Bactéries anaérobies et Botulisme est régulièrement consulté (téléphone, email) pour des renseignements cliniques concernant des suspicions de botulisme ou le diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, les prélèvements à effectuer, l'interprétation des résultats, des conseils sur les mesures à prendre et la prise en charge thérapeutique.

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition des numéros de téléphone (01 40 01 13 88 / 01 40 01 14 63) et des adresses email (frederic.barbut@sat.aphp.fr, catherine.eckert@sat.aphp.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostiques, hygiène). Bien que le nombre d'appels ne soit pas formellement enregistré, on peut estimer leur fréquence à un minimum de 1 appel par jour ouvrable.

5 - 7 Activités d'expertises

5-7-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Réunions

Participation à la réunion du programme NRBC, CEA Saclay.

Participation au 9^o séminaire du réseau national des laboratoires Biotox-Piratox, Ecole du Val de Grâce, 19-20 mai 2014.

Participation (CM, MP) aux réunions sur l'état d'avancement du programme européen ANTIBOTABE (anticorps humanisés neutralisants des toxines botuliques)

- NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) London, UK, 27-28 mars 2014.
- Grenoble, Faculté de Médecine, 4-5 septembre 2014
- Braunschweig (Germany), Institute for Biochemistry, Biotechnology and Bioinformatics, 21-23 janvier 2015

Expertises

Des activités d'expertise sont menées en collaboration avec le Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, iBiTecs, CEA Saclay, sur la caractérisation d'anticorps monoclonaux neutralisants de la neurotoxine botulique.

Des activités d'expertises sont menées avec l'Unité Inserm UMR1072 Marseille, pour la mise au point et la validation de tests endoprotéases visant à remplacer les tests souris pour la détection des neurotoxines botuliques dans des échantillons de sérum.

5-7-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

F. Barbut ou C. Eckert ont été régulièrement en contact avec K. Chamli, et S. Vaux (InVS) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

F. Barbut participe à des panels d'experts (Cepheid, Astellas, Sanofi Pasteur, Merck)

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.

6- ACTIVITES DE RECHERCHE

6-1 Principales activités de recherche du CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Etude taxonomique de nouveaux genres et espèces de bactéries anaérobies

- Identification et caractérisation du nouveau genre et nouvelle espèce *Eisenbergiella tayi* (Int J Syst Evol Microbiol 2014 Mar;64(Pt 3):907-14) à propos d'une souche isolée d'une hémoculture d'un patient âgé de 84 ans. Le réservoir de ce type de souche serait le microbiote intestinal. Ces souches pourraient passer la barrière intestinale et être des pathogènes opportunistes. Ce nouveau genre et nouvelle espèce sont proches du groupe de *Clostridium clostridioforme*.
- Identification et caractérisation d'une espèce nouvelle de *Veillonella* (*Veillonella seminalis*) (Int J Syst Evol Microbiol 2014, Oct;64(Pt 10):3526-31), à propos de 10 souches isolées de prélèvements humains, principalement de sperme ou vaginaux.

Caractérisation de souches atypiques de *Clostridium*

- Caractérisation d'une souche de *C. perfringens* à l'origine d'infection de disques intervertébraux (discite). (J Clin Microbiol 2014, Oct;52(10):3813-5).

C. perfringens est rarement impliqué dans cette pathologie. A propos d'un cas chez une femme de 83 ans souffrant de discite, un prélèvement au niveau vertébral a permis d'isoler une souche de *C. perfringens*. Cette souche a été caractérisée, y compris par séquençage du génome complet, pour la présence de toxines et facteurs de virulence. Cette souche avait un profil particulier de gènes de toxines à savoir qu'elle ne contenait que le gène de la toxine alpha et était productrice de toxine alpha, en l'absence des autres gènes de toxine habituellement rencontrés chez *C. perfringens* comme la perfringolysine ou l'entérotoxine. Cette souche ne présentait pas de profil particulier de résistance aux antibiotiques.

- Identification d'une souche atypique de *C. botulinum* group III (J Clin Microbiol 2014, 52 (1) 339)

Une souche a été isolée d'une hémoculture chez une femme de 83 ans souffrant d'un état de choc septique et qui est décédée 3 jours plus tard. Cette souche a été identifiée comme étant un *Clostridium botulinum* du groupe III sur la base du séquençage du gène ARN 16s et des caractères phénotypiques. Le séquençage complet de son génome a montré qu'elle appartenait au groupe des souches qui produisent la toxine botulique mosaïque D/C. Mais cette souche n'avait pas de gène pour des neurotoxines botuliques ni pour la toxine C2 et la clostridiolysine. Elle possède comme facteur de virulence un gène de phospholipase, et ceux de la botulinolysine (hémolysine de la famille de la perfringolysine) et de l'enzyme C3. L'origine de cette souche tout à fait inhabituelle est inconnue.

Toxine epsilon de *C. perfringens* (PlosOne 2014, 9 : e102417 ; Cell. Microbiol. 2015, 17 :369-388) (et travail en cours de S Pauillac, financement IP)

La toxine epsilon de *C. perfringens* (ETX) est une toxine très active qui agit en formant des pores dans les membranes de cellules cibles. ETX est une des toxines qui a la plus puissante activité létale après les neurotoxines botuliques. De ce fait, elle est considérée comme une arme biologique redoutable, et elle est l'agent d'entérotoxémie foudroyante chez les animaux, principalement chez les ovins. Nous avons montré que ETX agit en formant des pores dans les membranes des cellules cibles induisant leur perméabilisation aux anions et cations monovalents suivie d'une entrée retardée de calcium (J Biol Chem 2001, 276: 15736-15740).

Des mutants dans le domaine d'interaction de ETX avec les membranes ont été générés et produits en tant que protéines recombinantes en fusion avec la protéine verte GFP en collaboration avec l'équipe de J Blasi. Les mutations qui affectent l'interaction de ETX avec les membranes perdent leur cytotoxicité vis à vis des cellules MDCK. Dans un modèle *in vivo* chez la souris, l'injection de ETX-GFP induit un passage de la toxine fluorescente dans le cerveau, un œdème cérébral, ainsi qu'une accumulation dans le rein ou ETX avec nécrose des cellules épithéliales de la partie distale des tubules, et mort de l'animal. Les mutants d'interaction avec la membrane ne sont plus létaux et n'affectent plus le cerveau et les reins. Ces données soulignent une corrélation directe entre l'effet létal de ETX et sa capacité à passer la barrière hémato-encéphalique et à induire une cytotoxicité au niveau des tubules distaux.

En collaboration avec l'équipe de B. Poulain à Strasbourg, nous avons montré que ETX induit la démyélinisation des axones des cellules de Purkinje en utilisant des tranches de cerveau de rat en culture. Cet effet est inhibé à l'aide d'inhibiteurs des récepteurs au glutamate (mGluR1, NMDA-R), signifiant que la libération de glutamate induite par ETX serait à l'origine de ce processus. En utilisant des cultures primaires de cellules de cerveau de rat, ETX se lie aux oligodendrocytes mais pas aux astrocytes. ETX cause une libération de glutamate et des oscillations calciques au niveau des oligodendrocytes. L'effet de ETX sur les oligodendrocytes qui sont responsables de la myélinisation des axones, serait à l'origine du processus de démyélinisation. Cet effet semble indépendant de l'activité de pore-formation de ETX. Des travaux sont en cours pour déterminer les effets cellulaires dépendants et indépendants de la formation de pore de ETX.

Caractérisation du domaine formant le pore de la toxine iota de *Clostridium perfringens* (Cell. Microbiol. 2015, 17 :288-302)

La toxine iota de *C. perfringens* est une toxine binaire constituée d'un composant enzymatique Ia qui est une ADP-ribosyltransferase induisant une dépolymérisation des filaments d'actine, et d'un composant binding, Ib, qui sert de transport et de système d'internalisation de Ia dans les cellules cibles. La toxine iota est le prototype de la famille des toxines binaires iota qui comprend aussi la toxine binaire de *C. difficile* (CDT) et la toxine de *C. spiroforme* (CST).

Nous avons montré que le domaine compris entre les acides aminés 334-359 qui forment une boucle amphipathique avec une alternance de résidus hydrophiles et hydrophobes est un domaine qui s'insère dans la membrane cellulaire et forme un pore. De façon intéressante ce domaine montre un taux élevé d'identité avec celui de la toxine epsilon de *C. perfringens* qui est une toxine formant des pores de structure heptamérique. Les mutations S339E-S341E, Q345H, N346E affectent la conductivité et la sélectivité ionique confirment l'implication de ce domaine dans la formation du pore. La phenylalanine en position 454 qui a été montré comme contrôlant le diamètre du pore du composant PA de la toxine anthracis est aussi impliqué dans l'activité du pore de la toxine iota. Par contre les mutants Q367D, N430D, et L443E n'affectent pas ou de façon mineure l'activité du pore, alors que les mutants T360I, T360A, et T360W causent une réduction drastique de la conductivité et une altération de la sélectivité ionique. Ainsi T360 est important dans l'organisation de la structure du pore du composant Ib. L'introduction de résidus chargés dans la région du vestibule du pore (Q367D, N430D, L443E)

n'affecte pas la liaison au composant Ia ou à la chloroquine qui est un inhibiteur de certaines toxines formant des pores, alors que les mutations F454A, T360I, T360A, et T360W réduisent fortement la liaison de Ib à la chloroquine et à Ia. Une meilleure connaissance de la structure et de la fonctionnalité du pore de ces toxines devrait permettre de développer des inhibiteurs efficaces utilisables dans la thérapeutique des affections causées par ces toxines.

6-2 Activités de recherche du laboratoire associé

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**.

1. Participation au comité de pilotage de SERODIFF

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 multicentrique (15 centres) a démarré en 2013 et est financé par Sanofi Pasteur. Il prévoit d'inclure 300 patients et 600 témoins. Le CNR sera chargé de typer les souches de *C. difficile*. L'hôpital Saint Antoine participe à ce projet et est également en charge de constituer une coprothèque.

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

Laboratoire associé *C. difficile*

(Soutien financier : laboratoire Astellas)

L'objectif principal de cette étude est de comparer la présentation clinique et l'évolution (sévérité, mortalité, récurrences) de l'infection à *C. difficile* (ICD) diagnostiquée chez des patients qui présentaient ou non des toxines libres dans les selles.

L'objectif secondaire est d'évaluer les taux fécaux de lactoferrine et de calprotectine, marqueurs de l'inflammation intestinale, chez les patients atteints d'ICD avec ou sans toxines libres dans les selles. L'hypothèse de travail est que le dosage de ces 2 marqueurs chez les patients sans toxines libres mais avec une souche toxigène pourrait être utile pour différencier les patients infectés des patients colonisés.

3. Etude de l'évolution du clone épidémique « hypervirulent » 027 de *Clostridium difficile* en France, par MLVA

Laboratoire associé *C. difficile*

(Projet de recherche de Jeanne Couturier, étudiante en master 2)

En France, les premières épidémies d'ICD liées à la souche 027 ont été rapportées début 2006 dans le Nord. Depuis, des cas sporadiques ont été détectés dans la plupart des régions françaises et en 2013-2014 une épidémie importante (centaine de cas) liée à cette souche a touché la région de Marseille.

Depuis quelques années, d'autres souches (PCR-ribotypes 176, 198, 244), très proches du PCR-ribotype 027 et appartenant au même clade, ont émergé et ont été impliquées dans des épidémies de formes sévères d'infection. Toutes ces souches présentent des profils en PCR-ribotypage difficiles à séparer. Elles requièrent d'autres approches moléculaires pour les différencier.

Par ailleurs le pouvoir discriminant de la PCR ribotypage peut s'avérer insuffisant pour prouver la transmission nosocomiale d'une souche de patient à patient, lorsqu'un clone spécifique est prédominant dans un pays ou un hôpital comme c'est le cas pour la souche 027 dans le Nord de la France. Nous avons montré, au cours d'une étude préliminaire, que le MLVA (Multi Locus Variable number tandem repeats Analysis) est une méthode suffisamment discriminante pour distinguer des sous-types au sein d'un même PCR-ribotype et que cette technique permettait de grouper les souches 027 isolées dans un même hôpital au sein d'un même cluster. Les objectifs de cette étude sont (i) d'étudier la micro-évolution de la souche 027 en France, à la fois dans le temps et dans l'espace, par MLVA, (ii) d'identifier des souches classées à tort comme PCR-ribotype 027 par la technique de PCR-ribotypage, (iii) d'étudier des souches appartenant au même clade que les souches de PCR-ribotype 027, également responsables d'épidémies et récemment décrites dans la littérature (PCR-ribotype 244, 176, 198) (iv) d'évaluer l'apport d'autres loci de motifs répétés dans le schéma de typage MLVA.

4. Mise au point d'une PCR multiplex

Laboratoire associé *C. difficile*

(Projet de recherche de Sophie Quach, externe en pharmacie, en vue de l'obtention du diplôme d'état de Docteur en pharmacie)

Pour caractériser les souches de *Clostridium difficile* reçues au laboratoire, plusieurs PCR sont mises en œuvre (PCR détectant les gènes des toxines A et B et des gènes de la toxine binaire, PCR détectant la taille de la délétion dans le gène *tcdC*). Afin de gagner en rapidité et de s'affranchir du Bromure d'Ethidium (BET), une PCR multiplex avec détection des fragments amplifiés sur séquenceur est actuellement mise au point. Cette PCR multiplex permet de détecter à la fois les gènes codant les toxines A, B et la toxine binaire CDT et de déterminer la taille de la délétion dans le gène *tcdC*. Elle inclut également la détection d'un fragment du gène *tpi* spécifique de *C. difficile* et d'un fragment spécifique des souches non toxigènes (PCR lok).

5. Mise au point de la technique de « capillary based PCR-ribotypage »

Laboratoire associé *C. difficile*

(Projet réalisé par Amandine Petit et Laina Suzon)

La technique de PCR-ribotypage actuellement utilisée au laboratoire est une méthode longue et délicate qui nécessite une interprétation visuelle des profils obtenus après migration sur gel résophor. L'identification des PCR-ribotypes peut parfois s'avérer complexe et nécessite de déposer les souches à identifier à côté de souches de référence sur un même gel. Pour standardiser cette technique, le laboratoire associé a fait l'acquisition d'un séquenceur (ABI 3500) afin de mettre au point la détection des fragments amplifiés par PCR sur séquenceur

(capillary PCR-ribotyping). Cette méthode est maintenant adoptée par la plupart des pays européens.

6- Etude de l'activité sporicide de l'Anioxyfloor

Laboratoire associé *C. difficile*

(Soutien financier : laboratoire Anios)

(Projet de recherche de Claire Fouquet, étudiante en master 2)

Nous avons précédemment évalué l'activité sporicide de l'Anioxyfloor par la méthode des porte-germes en conditions de propreté et en présence de substances interférentes. Les résultats ont montré que l'Anioxyfloor avait une activité sporicide au moins équivalente à celle de l'eau de Javel. Nous avons pour objectifs de poursuivre cette étude en évaluant l'activité de l'Anioxyfloor en conditions de saleté et de réaliser une évaluation *in situ* en conditions réelles d'utilisation (étude EVADE).

6-2-1 Publications et communications du CNR

6-2-1-1 Publications dans des revues nationales

- Mazuet C., King L. A., Bouvet, P., Legeay C., Sautereau J., Popoff M. R. Le botulisme humain en France 2010-2012. **Bull. Epidemiol. Hebdo.** 2014, 6: 106-114.
- Popoff M. R. A propos d'un type nouveau de toxine botulique. **Bull Acad Vet Fance** 2014, 167 (2): 171-174.

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

- Aujoulat F, Bouvet P, Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H, Marchandin H. *Veillonella seminalis* sp. nov., a novel anaerobic Gram-stain-negative coccus from human clinical samples, and emended description of the genus *Veillonella*. **Int J Syst Evol Microbiol** 2014, Oct;64(Pt 10):3526-31. doi: 10.1099/ijms.0.064451-0. Epub 2014 Jul 22
- Amir I, Bouvet P, Legeay C, Gophna U, Weinberger A. *Eisenbergiella tayi* gen. nov., sp. nov., isolated from human blood. **Int J Syst Evol Microbiol** 2014, Mar;64(Pt 3):907-14. doi: 10.1099/ijms.0.057331-0. Epub 2013 Nov 26
- Popoff MR. Botulinum neurotoxins: more and more diverse and fascinating toxic proteins. **J Infect Dis** 2014, 209: 168-169.
- Bouvet P, Ruimy R, Bouchier C, Faucher N, Mazuet C, Popoff MR. An atypical *Clostridium* strain related to the *Clostridium botulinum* group III isolated from a human blood culture. **J Clin Microbiol** 2014, 52: 339-343.
- Lévêque C., Ferracci G., Maulet Y., Mazuet C., Popoff M., Seagar M. El Far O. Direct biosensor detection of botulinum neurotoxin endopeptidase activity in sera from patients with type A botulism. **Biosensors Bioelectronics** 2014, 57: 207-212.

- Genth H., Pauillac S., Schelle H., Bouvet P., Bouchier C., Varela-Chavez C., Just I., Popoff MR. Haemorrhagic toxin and lethal toxin from *Clostridium sordellii* strain VPI9048: molecular characterization and comparative analysis of substrate specificity of the large clostridial glucosylating toxins. **Cell Microbiol** 2014
- Popoff MR. Clostridial pore-forming toxins: powerful virulence factors. **Anaerobe** 2014 10.1016/j.anaerobe.2014.05.014
- Popoff MR. Bacterial factors exploit eukaryotic RhoGTPase signaling cascades to promote invasion and proliferation within their host. **Small GTPase J** 2014 e28209.
- Stiles BG, Pradhan K, Fleming JM, Samy RP, Barth H, Popoff MR. *Clostridium* and *Bacillus* binary enterotoxins: bad to the bowels and eukaryotic being. **Toxins** 2014, 6: 2626-2056.
- Bouvet P, Ferraris L, Dauphin B, Popoff MR, Butel MJ, Aires J. 16s RNA gene sequencing , multilocus sequence analysis, and mass spectrometry identification of the proposed new species "*Clostridium neonatale*". **J. Clin. Microbiol.** 2014 epub ahead of print.
- Knapp O, Maier E, Waltenberger E, Mazuet C, Benz R, Popoff MR. Residues involved in the pore-forming activity of the *Clostridium perfringens* Iota toxin. **Cell. Microbiol.** 2015, 17 : 288-302.
- Wioland L, Dupont JL, Doussau F, Gaillard S, Heid F, Isope P, Pauillac S, Popoff MR, Bossu JL, Poulain B. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* acts on oligodendrocytes without forming pores and causes demyelination. **Cell. Microbiol.** 2015, 17 : 369-388.
- Dorca-Arévalo J, Pauillac S, Díaz-Hidalgo L, Martín-Satué M, Popoff MR, Blasi J. Correlation between *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* lethal activity of Epsilon toxin mutants from *Clostridium perfringens*. **PlosOne** 2014, 9(7):e102417. doi: 10.1371
- Lotte R, Popoff MR, Degand N, Lotte L, Bouvet P, Baudin G, Cua E, Roger PM, Ruimy R. Lumbar discitis caused by *Clostridium perfringens*. **J. Clin. Microbiol.** 2014, 52(10):3813-3815.
- Fagan-Solis KD, Reaves DK, Rangel MC, Popoff MR, Stiles BG, Fleming JM. Challenging the roles of CD44 and lipolysis stimulated lipoprotein receptor in conveying *Clostridium perfringens* iota toxin cytotoxicity in breast cancer. **Mol. Cancer** 2014, 13:163. doi: 10.1186/1476-4598-13-163.
- Yelland TS, Naylor CE, Bagoban T, Savva CG, Moss DS, McClane BA, Blasig IE, Popoff M, Basak AK. Structure of a *C. perfringens* enterotoxin mutant in complex with a modified Claudin-2 extracellular loop 2. **J. Mol. Biol.** 2014, 426 (18): 3134-3147.
- Ernst K, Langer S, Kaiser E, Osseforth C, Michaelis J, Popoff MR, Schwan C, Aktories K, Kahlert V, Malesevic M, Schiene-Fischer C, Barth H. Cyclophilin-Facilitated Membrane Translocation as Pharmacological Target to Prevent Intoxication of Mammalian Cells by Binary Clostridial Actin ADP-Ribosylated Toxins. **J. Mol. Biol.** 2014, S0022-2836(14)00360-X. doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.013.
- Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An Atypical Outbreak

of Food-Borne Botulism Due to *Clostridium botulinum* Types B and E from Ham. **J Clin Microbiol** 2015, 53(2):722-726.

- Connan C, Popoff MR. Two-component systems and toxinogenesis regulation in *Clostridium botulinum*. **Res Microbiol** 2015, doi: 10.1016/j.resmic.2014.12.012.
- Bouvet P, Sautereau J, Le Coustumier A, Mory F, Bouchier C, Popoff MR. A case of foot infection by *Clostridium sordellii* and report of 15 cases in France. **J Clin Microbiol** 2015, pii: JCM.03414-14. [Epub ahead of print]
- Brüggemann H, Brzuszkiewicz E, Chapeton-Montes D, Plourde L, Speck D, Popoff MR. Genomics of *Clostridium tetani*. **Res Microbiol** 2015, doi: 10.1016/j.resmic.2015.01.002. [Epub ahead of print]
- Castor C, Mazuet C, Saint-Leger M, Vygen S, Coutureau J, Durand M, Popoff M, Jourdan Da Silva N. Cluster of two cases of botulism due to *Clostridium baratii* type F in France, November 2014. **Euro Surveill** 2015, Feb 12;20(6). pii: 21031
- Mazuet C, Sautereau, Legeay C., Bouchier C, Bouvet P., Popoff MR
Characterization of the first *Clostridium baratii* strain responsible for an outbreak of botulism type F in France, **Clinical Microbiology & Case Reports** 2015 Mar 12 Volume 1 • Issue 1 • 008
- Berthet N, Perichon B, Mazuet C., Bouchier C, Bouvet P., Legeay C., Popoff M-R., Courvalin P. A cryptic vanG-type locus in *Clostridium argentinense*. **J. Antimicrob. Chemother.** 2015 Mar 22. pii: dkv073. [Epub ahead of print]

6-2-1-3 Chapitres de livre

- Popoff M. R., Connan C. Absorption and Transport of Botulinum Neurotoxins. In Molecular Aspects of *Botulinum* Neurotoxin. Keith A. Foster (ed). Current Topics in Neurotoxicity, vol 4 Springer, New York 2014:35-68.
- Popoff M. R. Detection of Enterotoxin of *Clostridium perfringens*. In Batt CA, Torotorello MI (Eds), Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier-Academic Press, 2014, 2° edition, vol 1, 474-480.

6-2-1-4 Congrès, workshops

- Pore-forming Toxins 2014 (PFT2014), Trento, Italy, 28-30 out 2014 organisé par Mauro Dalla Serra
présentation (MP) : "Pore-forming activity of clostridial binary toxins".
- Membre du scientific international committee de Clospath2015, Freiburg Germany 7-11 septembre 2015 organisé par K Aktories.

- Participation (MP and CM) au 51^o congrès of IBRCC (Interagency Botulism Research Coordinating Committee) Philadelphia, USA 26-29 octobre 2014
Présentation: Recent outbreaks of botulism in France and *botulinum* toxin new subtypes".
- 9^o Colloque Centre Médico Chirurgical de Réadaptation des Massues "Toxine botulique douleurs en neuro-orthopédie" Lyon 28 novembre 2014-11-28
conférence (MP) sur invitation "Pain and botulinum toxin, exploring the mode of action".
- Co-organisateur (MP) des Rencontres en Toxinologie RT22 avec la Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET), Institut Pasteur, Paris 10-11 décembre 2014-12-19
Poster: " Identification of *botulinum* toxins type A subtypes by magnetic immunocapture enrichment and liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry" Morineaux V., Hilaire D., Enche J., Mazuet C., Popoff M. R.
- Participation (MP, CC) au congrès INA2015 (Toxine botulique), Lisbonne, 14-17 janvier 2015:
 - o Poster P1.34 Neutralizing antibodies directed against *botulinum* neurotoxin types A and B heavy chains. T. Sesardic, C. Rasetti-Escargueil, Y. Liu, R. Tierney, A. Avril, S. Miethe, S. Chahboun, C. Mazuet, M. Popoff, A. Fontaine, P. Thumliet, T. Pelat, M. Hust.
 - o Poster P7.7 BoNT/A immunogenicity: a systematic review of the literature. S. Lacroix-Desmazes, C. Colosimo,, L. Bahroo, M. R. Popoff, S. Mouly.
 Communication: The long duration of action of *Clostridium botulinum* A5 toxin at the mammalian neuromuscular junction. C. Mazuet, A. Couesnon, E. Benoit, N. Gautrot, M. Hesselmann, C. Kummerlen, M. R. Popoff, J. Molgo.

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

6-2-2-1 Publications dans des revues de langue française

Goret J, Blanchi J, Eckert C, Petit A, Barbut F, Bébéar C, Mégraud F. E-01: Diagnostic bactériologique des infections à *Clostridium difficile*: comparaison de 3 techniques en 2 temps. Med Maladies Infect. Jun;44(6 Suppl):3

Barbut F, Collignon A, Butel MJ, Bourlioux P. Fecal microbiota transplantation: Review. Ann Pharm Fr. 2015 Jan;73(1):13-21.

Barbut F., Ramé L., Petit A., Suzon L., de Chevigny A., Eckert C., pour le réseau français EUCLID (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *Clostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea). Prévalence des infections à *Clostridium difficile* chez les patients hospitalisés avec une diarrhée : résultats d'une étude bi-annuelle prospective multicentrique. Presse Med. » - sous presse

Eckert C., Lalande V., Barbut F. Colites à *Clostridium difficile*. Revue du Praticien Médecine Générale, 2015, 65 (1), 21-25

Barbut F., Guery B. et **Eckert C.** (2014) Comment traiter une infection digestive à *Clostridium difficile* en 2014 ? Réanimation 23:284-297.

Eckert C., Marchandin H., Barbut F. (2014) *Clostridium difficile*. Traité EMC «Biologie médicale» - sous presse.

Barbut F., Beaugerie L. et **Eckert C.** (2014) *Clostridium difficile* et pathologie digestive. Traité EMC «Maladies infectieuses» - sous presse.

Barbut F., Jean Pierre H., Dubreuil L., Marchandin H. *Bactéries anaérobies à Gram positif*. Traité EMC «Biologie médicale» - 2015, sous presse.

6-2-2-2 Publications dans des revues internationales

Le Monnier A, Zahar JR, **Barbut F.** Update on *Clostridium difficile* infections. Med Mal Infect. 2014 Aug;44(8):354-65.

Barbut F, Surgers L, **Eckert C**, Visseaux B, Cuingnet M, Mesquita C, Pradier N, Thiriez A, Ait-Ammar N, Aifaoui A, Grandsire E, **Lalande V**. Does a rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection impact on quality of patient management? Clin Microbiol Infect. 2014 Feb;20(2):136-44.

Landelle C, Verachten M, Legrand P, Girou E, **Barbut F**, Buisson CB. Contamination of Healthcare Workers' Hands with *Clostridium difficile* Spores after Caring for Patients with *C. difficile* Infection. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014 Jan;35(1):10-5.

Janoir C, Denève C, Bouttier S, **Barbut F**, Hoys S, Caleechum L, Chapetón-Montes D, Pereira FC, Henriques AO, Collignon A, Monot M, Dupuy B. Adaptive Strategies and Pathogenesis of *Clostridium difficile* from In Vivo Transcriptomics. Infect Immun. 2014 Feb;82(2):914.

Eckert C, Holscher E, Petit A, Lalande V, Barbut F. Molecular test based on isothermal helicase-dependent amplification for detection of the *Clostridium difficile* toxin A gene. J Clin Microbiol. Jul;52(7):2386-9.

Kurka H, Ehrenreich A, Ludwig W, Monot M, Rupnik M, **Barbut F**, Indra A, Dupuy B, Liebl W. Sequence similarity of *Clostridium difficile* strains by analysis of conserved genes and genome content is reflected by their ribotype affiliation. PLoS One. 2014 Jan 23;9(1)

Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, **Barbut F**, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis. Dec;14(12):1208-19.

Regnault H, Bourrier A, **Lalande V**, Nion-Larmurier I, Sokol H, Seksik P, **Barbut F**, Cosnes J, Beaugerie L. Prevalence and risk factors of *Clostridium difficile* infection in patients

hospitalized for flare of inflammatory bowel disease: a retrospective assessment. *Dig Liver Dis.* Dec;46(12):1086-92.

Eckert C., Emirian A., Le Monnier A., Cathala L., De Montclos H., Goret J., Berger P., **Petit A.**, **De Chevigny A.**, **Jean-Pierre H.**, Nebbad B., Camiade S., Meckenstock R., **Lalande V.**, **Marchandin H.**, **Barbut F.** Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbe and New Infect.* 2015, 3 :12-17

Standardised *Clostridium difficile* infection surveillance in European acute care hospitals: a feasibility study. van Dorp S, P Kinross, P Gastmeier, M Behnke, A Kola, M Delmée, A Pavelkovich, S Mentula, **F Barbut**, A Hajdu, A Ingebretsen, H Pituch, D Lemeni, M Jovanović, C Wiuff, D Schmid, K Olsen, M Wilcox, C Suetens, and E Kuijper, for the European *Clostridium difficile* infection surveillance network (ECDIS-Net) **on behalf all participants**. *Lancet Inf. Dis.* 2015 soumis

Survey of diagnostic and typing capacity for *Clostridium difficile* infection across Europe in 2011 and 2014. van Dorp S, Notermans DW, Albias J., P Gastmeier, Virolainen-Julkunen A., Nagy E., Mastrantonio P., Ivanova K., Fitzpatrick F., **Barbut F.**, Wilcox M., Kinross P., Suetens C., Kuijper E. for the European *Clostridium difficile* infection surveillance network (ECDIS-Net) **on behalf all participants**. *Eurosurveillance*, 2015 soumis

Community acquired gastroenteritis and the spectrum of pathogens EUCODI study 2014 Spina A., Kerr K., Cormican M., **Barbut F.**, Eigentler A., Zerva L, Tassios P., Popescu G., Eerola E., Batista J., Maass M., Aschbacher R., Olsen K., Allerberger F. J. *Clin Microbiol.*, 2015 soumis

Clostridium difficile infection kills: time for a care quality bundle to improve patient safety **Barbut F**, Cobo J, Cornely O, Kuijper E, Petrosillo N. *BMJ* 2015, soumis

6-2-2-3 Autres publications

Otter J. A., Yezli, S., Perl T. M., **Barbut F.**, French G. L. A guide to no-touch automated room disinfection (NTD) systems. In "Decontamination in hospitals and healthcare J. T. Walker eds—Woodhead Publishing Limited, 2014 (chapitre de livre)

Barbut F., Meynard J.L., Maury E., Surgers L., et Eckert C. (2014) Infections digestives à *Clostridium difficile*. *Traité de réanimation* – soumis.

Barbut F., Lalande V. et Eckert C. (2014) *Clostridium difficile*. *REMIC* – soumis.

6-2-2-4 Communications nationales

J. Goret, J. Blanchi, **C. Eckert**, **A. Petit**, **F. Barbut**, C. Bébéar, F. Mégraud Diagnostic bactériologique des infections à *Clostridium difficile* : comparaison de 3 techniques en 2 temps. JNI 2014 Bordeaux Communication affichée E01

F. Barbut. Evaluation comparée de l'activité d'un détergent/désinfectant et de l'hypochlorite de sodium vis-à-vis des spores de *Clostridium difficile*. SFHH, Marseille, 2014 communication

orale

6-2-2-5 Communications internationales

Goret J, J. Blanchi, **C. Eckert**, S. Lacome, **A. Petit**, **F. Barbut**, C. Bébéar and F. Mégraud. Comparison of two two-step algorithms for the diagnosis of *Clostridium difficile* infections: Diasorin Liaison® algorithm compared to Meridian Immunocard® GDH and Illumigene® assay 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0736

Valentin O., **C. Eckert**, L. Chesnel, **F. Barbut**. *In vitro* activity of surotomycin (formerly CB-183,315) against 126 clinical isolates of *Clostridium difficile*. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0805

Ramé L., N. Kanafer, **C. Eckert**, **V. Lalande**, **F. Barbut** Clinical outcome and biological features of patients according to *Clostridium difficile* testing methods. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0740

Khanafer N., **F. Barbut**, **C. Eckert**, M. Perraud, F. Vandenesch, C. El Guerche Seblain, P. Vanhems *Clostridium difficile* infection in a French university hospital: molecular characteristics of isolates and factors associated with severity 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0760

Eckert C. , **N. Poccardi**, **G. Sika**, **A. Petit**, **F. Barbut**. Evaluation of a rapid molecular test to genotype *C. difficile* strains 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0777

Eckert C., **A. Petit**, **E. Holscher**, **V. Lalande** et **F. Barbut** Evaluation of a molecular test based on isothermal helicase-dependent amplification to detect *Clostridium difficile* toxin A gene 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P0822

Eckert C., Cathala L, **Marchandin H**, **Jean Pierre H**, French network on *C. difficile*, **Barbut F**. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelone, Espagne 2014, P 0744

6-2-2-6 Conférences sur invitations

Eckert, C., Infections émergentes en transplantation *Clostridium difficile* 13^{ème} journée du Groupe Transplantation et Infection (GTI), Paris 2014

Eckert, C., Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales : infections à *Clostridium difficile* Journées Internationales de Biologie (JIB), Paris 2014

Eckert, C., *Clostridium difficile* : épidémiologie, le diagnostic et la prévention de la transmission croisée 2^{ème} Journée Hygiène et prévention des infections en EMS, Besançon 2014

Eckert, C., La transplantation de microbiote fécal dans les infections à *Clostridium difficile* 6^{ème} édition Journée Infections nosocomiales Résistance et Innovation, Lyon 2014

Barbut F. Prise en charge des infections à *Clostridium difficile* : le new deal. Où en sommes-nous de l'épidémiologie des ICD en 2014 ? Résultats de l'étude EUCLID. Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Bordeaux, 2014

Barbut F. How to eradicate *Clostridium difficile* spores from the environment? The 9th Healthcare Infection Society International Conference 2014, Lyon, 16 – 18 November 2014

Barbut F. How to eradicate *Clostridium difficile* spores from the environment? 24th ECCMID, 10-13 May 2014, Barcelone (Espagne)

6-2-2-7 Autres

F. Barbut a participé au groupe de travail sur la transplantation de microbiote fécal sous l'égide de l'Académie nationale de Pharmacie. Les réunions ont abouti à des recommandations officielles de l'Académie.

F. Barbut participe au groupe français de la transplantation fécale piloté par le Dr Sokol (Hôpital Saint-Antoine). Ce groupe rédige actuellement des recommandations pour la pratique de la transplantation de microbiote fécal dans le cadre des infections récidivantes à *C. difficile*.

7- TABLEAUX (CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME)

TABLEAU 1

Répartition des souches d'origine humaine par site d'infection (hors *Clostridium difficile*)

Période du 01/01/2014 au 31/12/2014

LOCALISATION	FREQUENCE
Urologie/néphrologie	47
Infections cutanées et musculaires (abcès, suppurations, gangrènes)	46
Infections osseuses	34
Hémoculture	32
Coproculture	19
Infections intra-abdominales (pus, redon, etc...)	14
infections pleuro-pulmonaires	10
Infection ORL (amygdale, sinus, etc...)	9
Non précisé	6
Gynécologie	5
Infections post-opératoires	5
Stomatologie	5
Appareil digestif	2
Infections péri-rectales et périnéales	2
Cardiologie	1
Système nerveux central	1
TOTAL	238

TABLEAU 2

Répartition des souches d'origine humaine par genre

Période du 01/01/2014 au 31/12/2014

291 souches anaérobies strictes appartenant à 47 genres + 4 souches non anaérobies strictes (surlignées en jaune)

GENRE	NOMBRE
ACIDAMINOCOCCUS	1
ACTINOBACULUM	7
ACTINOMYCES	3
ALLOPREVOTELLA	3
ANAEROCOCCUS	16
ATOPOBIUM	5
BACTEROIDES	35
BIFIDOBACTERIUM	2
BILOPHILA	1
BUTYRICIMONAS	2
CLOSTRIDIALES	8
CLOSTRIDIUM (dont 61 souches de Clostridium difficile)	91
COPROBACTER	1
CORYNEBACTERIUM	1
DESULFOVIBRIO	4
DIALISTER	1
EGGERTHELLA	2
ENTEROCOCCUS	1
FASTIDIOSIPILA	1
FILIFACTOR	2
FINEGOLDIA	2
FIRMICUTES	3
FUSOBACTERIUM	4
JONQUETELLA	2
LACTOBACILLUS	1 + 1
MEGASPHAERA	2
MOBILUNCUS	1
MOGIBACTERIUM	3
NEGATIVICOCCUS	2
OLSENELLA	1
PAENIBACILLUS	1
PARABACTEROIDES	1
PARAEGGERTHELLA	1

GENRE	NOMBRE
PEPTOCOCCUS	2
PEPTONIPHILUS	19
PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	6
PEPTOSTREPTOCOCCUS	3
PORPHYROMONAS	6
PREVOTELLA	15
PREVOTELLACEAE	1
PROPIONIMICROBIUM	6
PYRAMIDOBACTER	1
ROBINSONIELLA	3
SLACKIA	1
SOLOBACTERIUM	1
STAPHYLOCOCCUS	2
TANNERELLA	1
VARIBACULUM	2
VEILLONELLA	13
VICTIVALLIS	1
SOUS-TOTAL	295
RECHERCHE DE BACTERIES SPECIFIQUES NEGATIVE	4
ANALYSE NON EFFECTUEE	1
SOUCHE RETRANSMISE AU CNR CONCERNE	1
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	1
TOTAL	302

TABLEAU 3

Répartition des souches d'origine humaine par espèce

Période du 01/01/2014 au 31/12/2014

233 souches anaérobies strictes appartenant à 89 espèces + **4** souches non anaérobies strictes (**surlignées en jaune**) ;
58 souches anaérobies strictes appartenant à des espèces non nommées (nouvelles espèces probables).

ESPECE	NOMBRE
ACIDAMINOCOCCUS FERMENTANS	1
ACTINOBACULUM MASSILIENSE	3
ACTINOBACULUM SCHAALII	2
ACTINOBACULUM URINALE	2
ACTINOMYCES EUROPAEUS	1
ACTINOMYCES GRAEVENITZII	1
ACTINOMYCES NAESLUNDII	1
ALLOPREVOTELLA RAVA	1
ALLOPREVOTELLA SP.	2
ANAEROCCUS HYDROGENALIS(ancien Peptostreptococcus)	2
ANAEROCCUS OCTAVIUS (ancien Peptostreptococcus)	1
ANAEROCCUS PREVOTII	1
ANAEROCCUS SP.	5
ANAEROCCUS TETRADIUS	1
ANAEROCCUS VAGINALIS (ancien Peptostreptococcus vaginalis)	6
ATOPOBIUM (LACTOBACILLUS) RIMAE	2
ATOPOBIUM SP.	2
ATOPOBIUM VAGINAE	1
BACTEROIDES CELLULOSILYTICUS	2
BACTEROIDES COAGULANS	6
BACTEROIDES FAECIS	1
BACTEROIDES FRAGILIS	16
BACTEROIDES HEPARINOLYTICUS (PREVOTELLA HEPARINOLYTICA)	6
BACTEROIDES SALYERSIAE	1
BACTEROIDES THETAOTAOMICRON	1
BACTEROIDES XYLANSOLVENS	2
BIFIDOBACTERIUM DENTIUM	1
BIFIDOBACTERIUM LONGUM	1
BILOPHILA WADSWORTHIA	1
BUTYRICIMONAS SP.	2
CLOSTRIDIALES BACTERIUM (nouveau genre) Eubacteriaceae	8
CLOSTRIDIUM BARATII	1
CLOSTRIDIUM BARATII type F	2
CLOSTRIDIUM BARTLETTII	1
CLOSTRIDIUM BOLTEAE	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type B	1
CLOSTRIDIUM CLOSTRIDIOFORME	1
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	
CLONE 027 EPIDEMIQUE	4
PCR RIBOTYPE NON 027	52
CLONE 027 "HISTORIQUE"	1
NON TOXINOGENE	4
CLOSTRIDIUM GLYCOLICUM	1
CLOSTRIDIUM HATHEWAYI	2

CLOSTRIDIUM INNOCUUM	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	13
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	2
CLOSTRIDIUM SORDELLII	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
CLOSTRIDIUM SUBTERMINALE	1
COPROBACTER FASTIDIOSUS	1
CORYNEBACTERIUM	1
DESULFOVIBRIO FAIRFIELDENSIS	3
DESULFOVIBRIO SP.	1
DIALISTER PNEUMOSINTES	1
EGGERTHELLA LENTA (ancien EUBACTERIUM LENTUM)	2
ENTEROCOCCUS FAECIUM	1
FASTIDIOSIPILA SANGUINIS	1
FILIFACTOR ALOCIS	1
FILIFACTOR SP.	1
FINEGOLDIA MAGNA (ancien Peptostreptococcus magnus)	2
FIRMICUTES FAMILLE XI (NOUVEAU TAXON)	3
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM subspecies FUNDULIFORME	2
FUSOBACTERIUM SP.	1
FUSOBACTERIUM VARIUM	1
JONQUETELLA ANTHROPI	2
LACTOBACILLUS CRISPATUS	1
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS	1
MEGASPHAERA MICRONUCIFORMIS	1
MEGASPHAERA SP.	1
MOBILUNCUS CURTISII	1
MOGIBACTERIUM SP.	1
MOGIBACTERIUM TIMIDUM	2
NEGATIVICOCCUS SUCCINICIVORANS	2
OLSENELLA SP.	1
PAENIBACILLUS	1
PARABACTEROIDES MERDAE (ancien Bacteroides merdae)	1
PARAEGGERTHELLA HONGKONGENSIS (ancien Eggerthella hongkongensis)	1
PEPTOCOCCUS NIGER	2
PEPTONIPHILUS DUERDENII	3
PEPTONIPHILUS HAREI	2
PEPTONIPHILUS LACRIMALIS (Ancien Peptostreptococcus)	2
PEPTONIPHILUS OLSENII	1
PEPTONIPHILUS SP. ("Peptoniphilus massiliensis" candidatus)	9
PEPTONIPHILUS TYRRELLIAE	2
PEPTOSTREPTOCOCCACEAE BACTERIUM (NOUVEAU TAXON)	6
PEPTOSTREPTOCOCCUS CANIS	2
PEPTOSTREPTOCOCCUS STOMATIS	1
PORPHYROMONAS ASACCHAROLYTICA	1
PORPHYROMONAS SOMERAE	2
PORPHYROMONAS SP.	1
PORPHYROMONAS UENONIS	2
PREVOTELLA BIVIA	1
PREVOTELLA LOESCHEII	2
PREVOTELLA MELANINOGENICA	1
PREVOTELLA NIGRESCENS	2
PREVOTELLA SALIVAE	1
PREVOTELLA SP.	3
PREVOTELLA TIMONENSIS	5
PREVOTELLACEAE (NOUVEAU TAXON)	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	4
PROPIONIMICROBIUM LYMPHOPHILUM (ancien PROPIONIBACTERIUM)	2
PYRAMIDOBACTER PISCOLENS	1
ROBINSONIELLA PEORIENSIS	3

SLACKIA EXIGUA (anciennement Eubacterium exiguum)	1
SOLOBACTERIUM MOOREI	1
STAPHYLOCOCCUS SACCHAROLYTICUS	2
TANNERELLA FORSYTHIA	1
VARIBACULUM CAMBRIENSE	2
VEILLONELLA RATTI	3
VEILLONELLA SEMINALIS	1
VEILLONELLA SP. (nouvelle espèce)	9
VICTIVALLIS SP.	1
SOUS-TOTAL	295

RECHERCHE DE BACTERIES SPECIFIQUES NEGATIVE	4
ANALYSE NON EFFECTUEE	1
SOUCHE RE6TRANSMISE AU CNR CONCERNE	1
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	1
TOTAL	302

Tableau 4-1 : Résistance (R+I) aux antibiotiques des souches isolées en 2014
 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* (62 souches) – nombre de souches résistantes (R) ou intermédiaires (I)

CATEGORIES	ESPECES	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox- ac. Clav.	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
ACTINOBACTERIACEAE	<i>Actinobaculum</i> spp.	1	1 (R) (*)	0	0	0	0	0	1 (R)
	<i>Actinomyces</i> spp.	2	2 (R) (*)	0	0	1 (I)	0	0	1R
	<i>Atopobium</i> spp.	1	1 (R) (*)	0	0	0	0	0	0
	<i>Propionibacterium</i> spp.	4	4R (*)	0	0	1 (R)	0	0	1R
	<i>Propionimicrobium</i> spp.	2	2R (*)	1 (I)	1 (I)	1 (R)	0	0	1 (R)
	<i>Varibaculum</i> spp.	1	1R (*)	0	0	0	1R	0	0
COQUES A GRAM + (**)		8	0	2(R) /8	0/8	2 (I) /7	1 (R)/8	0/8	2 (R - <i>S.saccharolyticus</i>) /8
BACILLES A GRAM+ NON CLOSTRIDIUM	<i>Eggerthella</i> spp. – <i>Paraeggerthella</i> spp.	3	0	1 (I)	1 (I)	0	0	1 (R)	3(2R1I)
CLOSTRIDIUM SPP.	(***)	40	0	2 (R+I)	1 (I)	0	14 (R)	2(R)	16 (12R+4I)

(*) Espèces naturellement résistantes.

(**) *Peptoniphilus harei* (1 souche); *Peptoniphilus tyrrelliae* (2); *Peptostreptococcus canis* (1); *Peptostreptococcus stomatis* (1); *Staphylococcus saccharolyticus* (2).

(***) *C. baratii* (3 souches), *C. bartlettii* (1), *C. bolteae* (1), *C. botulinum* (2), *C. clostridioforme* (1), *C. glycolicum* (1), *C. hathewayii* (2), *C. innocuum* (1), *C. limosum* (1), *C. perfringens* (17), *C. septicum* (3), *C. sordellii* (1), *C. sporogenes* (5), *C. subterminale* (1)

Bactéries à Gram – (37 souches) – nombre de souches résistantes (R) ou intermédiaires (I)

Espèce	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Tétracycline	Erythromycine	Imipeneme	Céfalotine	Céfoxitine	Céfotaxime	Clindamycine	Rifampicine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxifloxacine
<i>Bacteroides</i> spp. (*)	21	0	21 (20R;1I)	13 (11R+2I)	14 (13R+1I)/19	15 (9R+6I)/19	7 (4R+3I)	18 (17R+1I)/19	13 (7R+6I)/19	19 (18R+1I)/19	10 (R)	0 /19	21 (R)	0/19	10 (6R+4I)
<i>Butyricimonas virosa</i>	2	0	2	2 (R+I)	0	2 (R)	0	2 (R+I)	1 (I)	2 (R)	2 (R)	0	1 (R)	0	2 (R+I)
« <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> »	3	0	1 (R)	2 (R+I)	1 (R)	3 (R)	2 (R)	3 (R)	2 (R)	3 (R)	1 (R)	2 (R+I)	3 (R)	2 R+I)	1 (R)
<i>Desulfovibrio</i> sp.	1	0	0	0	0	0	R	R	R	0	0	I	R	0	0
<i>Dialister pneumosintes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	I	0	0	0	R	0	I
<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	2	0	0	0	0	2 (I)	0	0	0	1 (I)	0	0	2 (R)	0	1 (R)
<i>Porphyromonas uenonis</i>	1	S	I	S			S				S		S		I
<i>Prevotella bivia</i>	1	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	I	R
<i>Prevotella nanceiensis</i>	1	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>Prevotella timonensis</i>	1	S	R	I			S				S		S		S
<i>Veillonella ratti</i>	1	S	S	S			S				S		R		R
<i>Veillonella</i> sp.	1	S	I	I	S	R		S	S	I	S	S	R	S	R
<i>Victivallis</i> sp.	1	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

(*) détails des espèces et leurs génotypes

Phénotypes et génotypes des 21 souches du genre *Bacteroides* identifiées en 2014

Espèces	CNR#	β-lactamase	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>	groupe ADNr 16S de <i>Bacteroides fragilis</i> (*)	Diamètre d'inhibition pour l'imipénème (diamètre critique : 17mm/24mm)	Commentaires
<i>Bacteroides fragilis</i>	201400353	-					38 mm	
	201400037	+	-	-	+	II	6 mm (CMI >32µg/ml)	
	201400628	+	+	+	-	I	32 mm	cepA surexprimé + altérations porines
	201400721	+	+	+(NE)	-	I	35 mm	altérations porines
	201400048	+	+	+	-	I	25 mm	
	201400673	+	+	+(NE)	-	I	26 mm	cepA surexprimé + altérations porines
	201400038	+	-	-	+	II	22 mm	
	201400708	+	-	-	+(NE)	II	22 mm	
	201400015	+	+	+	-	I	35 mm	
	201400735	+	-	+	+	II	6 mm	
	201400641	+					10 mm	
	201400443	+					35 mm	
	201400769	+	-	+	+	II	6 mm	
	201400676	+	+	-	-	I	34 mm	
	201400665	+	+	-	-	I	30 mm	
201400544	-					32 mm		
<i>Bacteroides heparinolyticus (prevotella heparinolytica)</i>	201400146	-					30 mm	
<i>Bacteroides salyersiae</i>	201400032	+	-	-	-		20 mm (CMI 4µg/ml)	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	201400386	+	+	+	-		25 mm	
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	201400167	+					30 mm	
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	201400770	+					30 mm	

NE : gène présent mais non exprimé

(*) La séquence de l'ARNr 16S qui a été déterminée permet d'affecter une souche au groupe d'hybridation I ou II de *Bacteroides fragilis* tels que Ruimy et coll. Les ont définis (J. Bacteriol. 1996, 178 :1914-1918). Les souches du groupe I peuvent porter des gènes codant pour des beta-lactamases (*cepA*, *cfxA*). Le gène *cfiA* (carbapénémase) est exclusivement porté par des souches du groupe II d'hybridation.

Tableau 4-2 : Antibiogramme spécifique à *Clostridium difficile* (61 souches) – nombre de souches résistantes(R) ou intermédiaires (I)

Caractéristiques	N	Métronidazole 16µg	Tétracycline	Erythromycine	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
027 "HISTORIQUE"	2	0	0	0	0	1R	0	0
027 EPIDEMIQUE	5	0	0	4R	4I	4R	0	4R
078/126	3	0	1I	2R	0	3R	0	3 (2R;1I)
non toxigène	4	0	0	0	1I	4 (3R;1I)	0	2 (1R;1I)
A+B+CDT- ;tcdC non délété	44	0	2I	10 (6I;4R)	13 (I)	40 (39R;1I)	0	32 (22R;10I)
A+B+CDT+ ;tcdC délétion de 54bp	1	0	0	0	I	R	0	I
A+B+CDT+ ; tcdC non délété	1	0	0	0	0	R	0	I
A-B+CDT+ ; tcdC non délété	1	0	0	0	I	R	0	I

8- 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 et 2011. Il faut souligner que le renouvellement du CNR s'est accompagné de la suppression d'un poste de technicien et de la réduction de la participation d'un scientifique.

8-1 Missions et objectifs majeurs

8-1-1 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 l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à l'InVS des affections graves à anaérobies notamment à *C. difficile*) et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec l'InVS.

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

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

L'Unité d'Expertises et de Recherche des Bactéries anaérobies et Toxines (BAT), à laquelle est rattaché le CNRAB, a été évaluée et reconduite en 2006 ainsi qu'en 2010 (évaluation AERES niveau A). Cette unité est constituée de deux chefs de laboratoire, d'une technicienne et de stagiaires de thèse et postdoc, et elle englobe le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme. Elle a pour principaux thèmes de recherche : *Clostridium botulinum* (régulation de la toxinogénèse et passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale) et les toxines de *Clostridium* modifiant le cytosquelette d'actine ou formant des pores à travers la membrane. Elle bénéficie de crédits du ministère de la Défense (DGA), du ministère de la Recherche, d'un contrat européen et de contrats industriels.

L'Unité BAT et le CNRAB ont fait l'objet d'une inspection de l'ANSM à propos de la détention, cession, acquisition, et manipulation de microorganismes pathogènes et toxines (MOT) en juin 2008 et mars 2013.

8-1-2 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 à cette bactérie. Il travaille en collaboration avec un réseau national de 4 laboratoires experts (laboratoires experts de Rouen, Toulouse, Montpellier et Nancy) pour la caractérisation des souches. Le

laboratoire associé participe à la rédaction de recommandations concernant les techniques de prélèvements et de diagnostic ainsi que la rédaction des aspects cliniques des infections dues à *C. difficile* en collaboration avec la D.G.S. et l'InVS qui en assure la diffusion.

8-2 Equipes

8-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

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

Techniciens : 2 (ETP : 2)

Autres : 2 (ETP global : 1,7)

8-2-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Nord - Pas de Calais, Picardie, Ile de France, Centre Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes

Dr Frédéric Barbut +33 1 49 28 30 11 ou frederic.barbut@sat.ap-hop-paris.fr
Dr Catherine Eckert +33 1 40 01 14 63 (/13 88) ou catherine.eckert@sat.aphp.fr

Laboratoire de Bactériologie
Faculté de médecine Saint Antoine
27, rue de Chaligny,
75012 Paris

Adresse d'envoi des souches : Laboratoire de Bactériologie
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 Paris, France

Personnel médical : 3 (ETP global : 1,7)

Personnel non médical : 2 (ETP global : 1,4)

Laboratoires experts

Haute-Normandie, Basse-Normandie, Bretagne, Pays de Loire

Dr Ludovic Lemée +33 2 32 88 80 52 ou ludovic.lemee@chu-rouen.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 2 32 88 80 52)
Rez de Chaussée Pavillon Derocque
CHU Ch. Nicolle
76031 Rouen Cedex

Alsace, Lorraine, Champagne-Ardenne, Bourgogne, Franche Comté

Dr Hubert Tronel +33 3 83 85 14 34 ou h.tronel@chu-nancy.fr
Pr Alain Lozniewski +33 3 83 85 18 14 ou a.lozniewski@chu-nancy.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 3 83 85 12 03)
Hôpital Central
29 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny CO 60034

54035 Nancy Cedex

Languedoc-Roussillon, Auvergne, Corse, Réunion

Pr Hélène Marchandin + 33 4 67 33 59 00 ou h-marchandin@chu-montpellier.fr
Dr Hélène Jean-Pierre + 33 4 67 33 65 94 ou h-jean_pierre@chu-montpellier.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 4 67 33 58 84)
Hôpital Arnaud de Villeneuve
371, Avenue du Doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier Cedex 5

Aquitaine, Limousin, Midi-Pyrénées, Poitou-Charente, Guadeloupe, Martinique

Dr Laurent Cavalie +33 5 67 69 03 93 ou cavalie.l@chu-toulouse.fr

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
CHU de Toulouse
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
31059 Toulouse Cédex 9 TSA 40031

PARIS CNR Bactéries anaérobies et botulisme Coordination

Dr Michel R Popoff +33 1 45 68 83 07 ou michel-robert.popoff@pasteur.fr
Dr Philippe Bouvet +33 1 40 61 35 09 ou philippe.bouvet@pasteur.fr

CNR Bactéries anaérobies et botulisme Institut Pasteur Unité Bactéries Anaérobies et Toxines
25/28 rue du Docteur Roux
75724 paris cedex 15
(+33 1 44 38 91 22 ou +33 1 45 68 83 10)

8-4 Démarche qualité

8-4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Démarche qualité du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2014

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

Bilan des actions réalisées en 2014 :

Paris/Lyon :

Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie)

Mise à jour du manuel qualité (V2)

Formations : WebCampus et Kalilab

Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189

Revue de direction LREMS

Inclusion de la vague 3 (CNR Anaérobies, CNR Yersinia, CNR FHV, CNR Listeria, CNR Mycose et antifongique) dans la démarche d'accréditation ISO 15189

Création d'une vague 4 (CNR E. Coli, CNR Vibrio Cholera et CNR HPV)

Guyane :

Dépôt de la demande d'accréditation au COFRAC

Organisation en multi-site (4 LRE et LABM)

Missions d'accompagnement sur site (service QEDD et prestataire)

Audits qualité internes ISO 15189 (technique et organisation)

Définition des besoins pour la gestion des équipements et des paramètres environnementaux critiques

Evènements d'importance 2014 :

Audit COFRAC reporté en 2015

Perspectives 2015 :

Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars à mai 2015

Revue de direction LREMS : 22 mai 2015

Finalisation dossiers de validation de méthode : Mars 2015

Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Janvier et juin 2015

- Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme (P. Bouvet) a participé à la réunion « Journée d'échanges sur l'accréditation » organisée par l'InVS en novembre 2014.

8-4-2 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 de qualité** a été réalisé au cours de l'année 2014 (envoi de 2 souches de PCR-ribotypes définis aux 5 laboratoires experts). Les résultats ont montré que :

⇒ Pour la souche 078/126, 100% des laboratoires experts ont répondu souche 078/126

⇒ Pour la souche 106, 80% des laboratoires experts ont répondu souche 106. Un laboratoire après vérification a constaté qu'il s'agissait d'une erreur de lecture du gel et a bien retrouvé le ribotype 106

- Un **contrôle de qualité** a été réalisé en 2014, pour la troisième année consécutive, en **collaboration avec le Centre National de référence en Belgique** (Pr. Michel Delmée). Le panel était constitué de 2 souches A et B 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 inclus dans le contrôle de qualité.

↳ Ce contrôle de qualité 2014 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.

↳ Les PCR-ribotypes des 10 souches envoyées ont été **correctement identifiés** par notre laboratoire. A noter toutefois que la différence entre les souches 014, 020 et 077 n'est pas possible dans notre laboratoire (souches très proches). La distinction entre les souches 078 et 126 est maintenant réalisable sur séquenceur.

- Le laboratoire associé (C. Eckert) a participé à la réunion « Journée d'échanges sur l'accréditation » organisée par l'InVS en novembre 2014.

9- Annexe 2 : Capacités techniques du CNR et du laboratoire associé

9-1 Techniques et marqueurs disponibles

9-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturaux et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques), analyse des produits du métabolisme et des acides gras cellulaires par chromatographie phase gazeuse.
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique. Ces techniques ont été développées au CNR sur la base de gènes de toxines caractérisées dans notre Unité ou sur des gènes publiés.
 - Identification des gènes de 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.
 - Mise en évidence de cytotoxine à l'aide de culture cellulaire de différents types.
 - Amplification des gènes codant les ADN ribosomiaux 16S et séquençage.
 - Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).
 - Dosage de certaines toxines par ELISA (comme toxine epsilon de *C. perfringens*, toxine LT de *C. sordellii*, toxines botuliques)

Techniques des marqueurs épidémiologiques de *C. difficile*

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

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

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

Techniques en développement

- Techniques de titrage de la toxine botulique, voir chapitre "activités d'expertises".
- Développement d'une puce ADN pour le génotypage des souches de *C. botulinum* (voir activités d'expertises, génotypage de *C. botulinum*).
- Séquençage des génomes complets des souches isolées au CNR, notamment des souches de *Clostridium botulinum*, par la technique NGS (Illumina).
- Développement de tests *in vitro* de dosage d'activités enzymatiques des toxines botuliques de type A, B et E.(format ELISA).

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 »

9-1-2 Laboratoire associé *Clostridium 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
- 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
- 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*)

9-2 Collection de souches, sérums de référence

9-2-1 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. 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*

9-2-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Toute souche de *C. difficile* reçue au laboratoire associé « *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). Chaque souche est caractérisée par son toxinotype, 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).

9-3 Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts

Un recueil de protocoles standardisés pour la caractérisation des souches de *C. difficile* a été rédigé par le CNR en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Saint-Antoine (UHLIN, Frédéric Barbut) et adressé à tous les laboratoires experts.

Un nombre minimum de techniques utilisées par tous les laboratoires experts a été défini pour caractériser les souches de *C. difficile* :

- la détection des fragments A3 et B1 des toxines TcdA et TcdB
- la PCR ribotypage pour identifier la souche 027 (Oui/Non) ainsi que des PCR-ribotypes fréquents en France (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 053, 078/126 et 106); le caractère clonal ou non peut également être précisé
- l'antibiogramme (érythromycine, clindamycine, moxifloxacine, métronidazole, vancomycine, tétracycline)