

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 2013

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 2014

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 2013.....	6
2-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	6
2-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	7
2-2 Activités d'expertise	10
2-2-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (CNR).....	10
2-2-2 Activité d'expertise sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i>	14
2-2-3 Activité d'expertise sur <i>Clostridium difficile</i> (Laboratoire associé)	17
3- Activités de surveillance	19
3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	19
3-1-1 Surveillance du botulisme (CNR)	19
3-1-2 Surveillance des infections à <i>C. difficile</i> (Laboratoire associé)	24
3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux	31
3-2-1 Surveillance de la résistances des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR).....	31
3-2-2 Surveillance de la résistance de <i>C. difficile</i> aux anti-infectieux (Laboratoire associé).....	35
3-3 Participation aux réseaux de surveillance	36
3-3-1 Botulisme.....	36
3-3-2 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS	37
3-3-3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens	37
3 - 4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	38
4- Alerte	41
4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	41
4-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	41
5- Activités d'information, de formation et de conseil	42
5 - 1 Enseignements réalisés en 2013	42
5-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	42
5-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	42
5-2 Formations aux professionnels de santé	43
5-2-1 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	43
5-3 Stagiaires accueillis.....	43
5-3-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	43
5-3-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	44
5-4 Liste des guides élaborés	44
5- 5 Diffusion aux professionnels de santé	44
5 - 6 Activités d'information, de formation et de conseil.....	45
5 - 7 Activités d'expertises.....	45
5-7-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	45
5-7-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	45
6- Activités de recherche.....	46
6-1 Activités de recherche du CNR Bactéries anaérobies et botulisme.....	46
6-2 Activités de recherche du laboratoire associé.....	49
6-2-1 Publications et communications du CNR.....	52

6-2-2 Publications et communications du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	54
7- Programme d'activité pour 2014-2015	58
7-1 Programme du CNR Bactéries anaérobies et botulisme	58
7-1-1 Identification des souches de bactéries anaérobies	58
7-1-2 Diagnostic du botulisme	58
7-1-3 Activités de recherche en relation avec le CNR	58
7-2 Programme du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	59
8- Tableaux (CNR Bactéries anaérobies et botulisme)	62
9- Annexe 1 : Missions et organisation du CNR	79
9-1 Missions et objectifs majeurs	79
9-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	79
9-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	79
9-2 Equipes	80
9-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	80
9-2-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	81
9-3 Locaux et équipements	84
9-3-1 Locaux	84
9-3-2 Equipements	87
9-4 Démarche qualité	88
9-4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	88
9-4-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	90
10- Annexe 2 : Capacités techniques du CNR et du laboratoire associé	91
10-1 Techniques et marqueurs disponibles	91
10-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	91
Techniques des marqueurs épidémiologiques de <i>C. difficile</i>	91
Technique ELISA de détection de la toxine LT de <i>C. sordellii</i>	92
Techniques en développement	92
Liste des marqueurs épidémiologiques	92
10-1-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	93
10-2 Collection de souches	93
10-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme	93
10-2-2 Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	94
10-3 Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts	94

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 2013, Le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 130 échantillons de sérum, 55 selles, 59 échantillons alimentaires dont 11 en lien avec un foyer de botulisme et 2 d'environnement. Un total de 10 (plus un foyer suspect) foyers de botulisme regroupant 18 (plus un cas suspect) cas ont été identifiés. L'ensemble des patients a été hospitalisé dont la plupart en service de réanimation. Le botulisme alimentaire était la forme la plus fréquente (6 foyers sur 10), **4 cas de botulisme infantile** (2 de type A et 2 de type Bf) ont été identifiés. **Il faut noter que, bien que rare, le botulisme infantile est plus régulièrement signalé au cours de ces dernières années. Un fait nouveau est qu'une des souches de *C. botulinum* A isolée d'un nourrisson était résistante aux beta-lactamines et céphalosporines.** Le botulisme de type B a été le plus fréquemment identifié (6 foyers, 9 cas), alors que le type A représentait 4 foyers (6 cas). L'origine du botulisme a été retrouvée dans 3 foyers: aliment du commerce (charcuteries d'origine portugaise) dans un foyer, jambon et/ou saucisson de préparation familiale dans 2 foyers. Des conserves maison (haricots verts pour un foyer et asperge pour un autre foyer) ont été fortement suspectées mais non confirmées par le CNR faute d'aliments restants disponibles.

Le CNR a également pratiqué la recherche d'anticorps neutralisants chez 16 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 2013, 177 échantillons d'origine vétérinaire et 176 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 2013 grâce à l'appui du Laboratoire associé et de son réseau de 5 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 5 laboratoires experts (laboratoires experts de Rouen, Nice, Toulouse, Montpellier et Nancy) pour la caractérisation des souches. Il faut toutefois signaler que le laboratoire expert de Nice a cessé son activité d'expertise sur *Clostridium difficile* le 20 octobre 2013. L'activité a été récupérée dans son intégralité par le laboratoire associé.

Au cours de l'année 2013, 592 prélèvements ont été reçus par les différents laboratoires experts. Parmi ces 592 prélèvements, 530 correspondaient à des souches de *C. difficile* toxigènes ; 126 souches (23,8%) ont été identifiés comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 3 principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 027 (23,8%), le 014/020/077 (17,3%) et le 078/126 (8,7%).

L'année 2013 a été marquée par l'émergence de la souche 027 épidémique en région Provence-Alpes-Côte-d'Azur, à l'origine d'une épidémie qui a touché les établissements de santé de la ville de Marseille et de ses environs.

Plusieurs projets concourant à la surveillance ont été achevés ou sont en cours (projet ECDIS-net, étude EUCLID, étude ClosER). L'étude EUCLID (Prix RICAI 2013) a notamment permis de mettre en évidence un sous diagnostic des infections à *C. difficile* (ICD) en France: 55,6% des ICD ne sont pas diagnostiquées par les établissements de santé.

En 2013, 238 souches de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR [dont les origines sont : humaine (185 souches), alimentaire (13), vétérinaire (24), et autres (collections... : 16). Les 156 souches d'origine humaine identifiées se répartissaient en 33 genres différents, 49 espèces nommées (135 souches) et 21 espèces non nommées représentant de nouvelles espèces potentielles (21 souches). Le séquençage du gène ARNr16S (77 séquences effectuées en 2013 soit 70% des souches reçues hors *Clostridium difficile*) a permis d'identifier plusieurs espèces rares (appartenant aux espèces *Anaerotruncus colihominis*, *Brachyspira pilosicoli*, "*Catabacter hongkongensis*", *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium spiroforme*, *Eubacterium cylindroides*, *Filifactor alocis*, *Peptococcus niger*, *Pyramidobacter piscolens*, *Selenomonas artemidis*...). Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté (81/156 souches soit 51,9%) parmi lesquels les 47 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* / *Butyricimonas* / *Alistipes* / *Dialister* (18 souches), *Fusobacterium* (5 souches), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*...) (25 souches), et divers. Quatre décès consécutifs à des infections sévères à *Clostridium*, souvent à point de départ intestinal, ont été enregistrés (dont 3 survenus quelques heures après admission aux urgences à la suite d'une hémolyse intra-vasculaire massive par *Clostridium perfringens* et une colite gravissime à *Clostridium septicum*). 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, et caractérisation des souches de *C. difficile* portant une délétion dans le gène *tcdC*.

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**.

Il est à noter que le laboratoire expert de Nice a cessé son activité d'expertise sur *Clostridium difficile* le 20 octobre 2013. L'activité a été récupérée dans son intégralité par le laboratoire associé à Saint Antoine, Paris.

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/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-reference-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-bacteries-anaerobies-et-du-botulisme/activites-de-service>).

2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2013

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).

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 coté de souches de référence sur un même gel. Pour standardiser cette technique, l'évaluation et la mise en place d'une technique d'**électrophorèse capillaire** (EXPERION V3.1, BioRad) permettant la séparation des amplicons obtenus par PCR-ribotypage est en cours d'évaluation pour améliorer à terme l'identification des PCR-ribotypes. Cette méthode permettra également de s'affranchir du BET.

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

En 2013, plusieurs trousse diagnostiques ont été évaluées :

- Le test moléculaire **AmpliVue (QUIDEL Molecular)**, test permettant la détection du gène de la toxine A dans les selles avec une détection immunochromatographique.

- L'algorithme en 2 temps basé sur la détection de la **GDH (QuikChek, Alère)** suivi en cas de résultat positif du test **illumigène (Mérieux)**.

- Les tests **GDH QuikChek Assay (Techlab)**, **GDH (Certest)** et **GDH ELISA (Savyon)**.

- Le test moléculaire développé par **Roche Molecular** (en cours d'évaluation).

- Le laboratoire associé a contribué à évaluer 3 algorithmes diagnostiques en 2 temps: i) par technique immuno-enzymatique GDH et toxines (Alere), ii) par chimioluminescence GDH et toxines (Diasorin) et iii) par technique immuno-enzymatique GDH puis amplification isotherme du gène de la toxine A (Meridian) ont été évalués.

1. Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*: évaluation du test AmpliVue et de l'algorithme GDH-illumigène par rapport à la culture toxigénique

C. Eckert, A. Petit, E. Holscher, V. Lalande et F. Barbut.

(RICAI 2013, poster 539)

Objectifs: Les méthodes de référence pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD) sont le test de cytotoxicité des selles (TCA) et la culture toxigénique (CT). Ces méthodes sont longues et les résultats ne sont pas disponibles avant 24 à 96 heures. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les performances du test AmpliVue® *C. difficile* (Quidel®), une méthode moléculaire basée sur l'amplification hélicase-dépendante avec une lecture type bandelette et celles de l'algorithme basé sur la détection de la GDH (Quik Chek® Alere) suivie du test moléculaire *illumigène*® (Meridian) sur les selles positives à la GDH, comparativement au TCA et à la CT.

Méthodes: L'étude a porté sur 308 selles diarrhéiques consécutives, prélevées entre novembre 2012 et avril 2013 chez des patients suspects d'ICD hospitalisés dans 4 hôpitaux parisiens. Le TCA était réalisé sur des cellules MRC-5. La culture était réalisée sur le milieu sélectif TCCA (Taurocholate, Cycloserine, Cefoxitin Agar). La détermination *in vitro* de la toxigénicité des isolats de *C. difficile* était réalisée en inoculant de 2 à 5 colonies dans un

bouillon BHI incubé 5 jours en atmosphère anaérobie. Le surnageant de cette culture était filtré et inoculé sur cellules MRC-5 (CT). Les tests AmpliVue, GDH et *illumigene* étaient réalisés selon les recommandations des fabricants. Lorsque les résultats étaient discordants entre les différentes méthodes, les échantillons de selles conservés à -80°C étaient retestés par les différents tests et/ou par culture enrichie.

Résultats: Les prévalences de TCA, culture et CT positifs étaient respectivement de 7,5%, 15,6% et 11,7%. Quatre résultats (1,3%) étaient invalides avec le test AmpliVue en raison de l'absence de bande au niveau des lignes contrôle et test. Après avoir refait le test, seul un résultat (0,3%) restait invalide. Comparé à la CT, les sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative étaient de 91,7% [CI 95% 76,4-97,8], 100% [CI 95% 98,3-100], 100% [CI 95% 87-100] et 98,9% [CI 95% 96,6-99,7] pour le test AmpliVue et l'algorithme GDH-*illumigene*.

Conclusion: Le test AmpliVue C. difficile et l'algorithme GDH-*illumigene* sont des méthodes sensibles pour détecter une ICD. Les résultats sont directement visualisés sous forme de bandelette pour le test AmpliVue. Il s'agit d'une nouvelle méthode moléculaire simple et rapide qui ne nécessite pas d'équipement spécifique.

2. Evaluation de 3 tests détectant la GDH par rapport à la culture de *Clostridium difficile* sur milieu sélectif.

C. Eckert, A. Petit, M. Sardaby, A. De Chevigny, V. Lalande et F. Barbut.

(RICAI 2013, poster 538)

Objectif: La glutamate deshydrogénase (GDH) est une enzyme spécifique de *Clostridium difficile*. Son utilisation comme test de screening pour le diagnostic d'infection à *C. difficile* (ICD) est maintenant largement recommandée. L'objectif de cette étude était d'évaluer les tests immunochromatographiques CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH (Certest®) et *C. diff* Quik Chek Assay (Techlab®) ainsi que le test ELISA CoproELISA™ *C. difficile* GDH (Savyon®) comparativement à la culture de *C. difficile* sur le milieu sélectif TCCA (taurocholate, cyclosérine, céfoxitine agar).

Méthodes: 301 selles diarrhéiques consécutives de patients suspects d'ICD et hospitalisés dans 4 hôpitaux parisiens ont été analysées entre le 3 avril et le 1^{er} juillet 2013. Les 3 tests GDH étaient réalisés en aveugle sur toutes les selles selon les recommandations des fabricants. Les selles étaient également ensemencées sur le milieu TCCA. La présence de *C. difficile* était recherchée après 48 heures d'incubation en anaérobiose. En cas de résultats discordants entre la culture et un des tests GDH, le test GDH était refait ou une culture enrichie était réalisée à partir d'un aliquot de selle conservé à -80°C.

Résultats: La prévalence de cultures positives était de 11% (dont 63,6% de souches toxigènes). Deux résultats (0,7%) étaient invalides (absence de bande contrôle) avec le test Certest. Après réanalyse les 2 résultats se sont avérés négatifs. Aucun invalide n'a été observé avec les tests ELISA Savyon et Techlab. Après résolution des résultats discordants et comparativement à la culture, les sensibilités, spécificités et les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) étaient respectivement de 88,6%, 94%, 66% et 98,4% pour le test GDH Certest, de 94,3%, 90,6%, 56,9% et 99,2% pour le test ELISA Savyon et de 97%, 100%, 100% et 99,6% pour le test C. diff Quik Chek.

Conclusion: Les 3 tests GDH présentent une excellente VPN, permettant d'écarter le diagnostic d'ICD en cas de résultat négatif. L'utilisation d'un test unitaire

immunochromatographique (Certest, Techlab) ou d'un test ELISA (Savyon) dépendra des contraintes de chaque laboratoire.

3. Diagnostic bactériologique des infections à *Clostridium difficile* : comparaison de 3 techniques en 2 temps.

Goret J., Blanchi J., Eckert C., Petit A., Barbut F., Bébéar C. and Mégraud F.

En collaboration avec le CHU de Bordeaux

Résumé accepté sous format poster pour le congrès ECCMID 2014

Introduction. Un diagnostic en deux temps comprenant le dépistage de *Clostridium difficile* (CD) basé sur la détection de la glutamate déshydrogénase (GDH), une enzyme spécifique de CD, suivi en cas de positivité, de la recherche des toxines A/B pour confirmer l'infection est actuellement recommandé

Objectifs L'objectif était de comparer les performances de trois algorithmes diagnostiques : 1) par technique immuno-enzymatique (EIA), GDH et toxines (Alere), 2) par chimioluminescence GDH et toxines (Diasorin) et 3) par GDH-EIA puis amplification isotherme du gène de la toxine A (Meridian).

Méthodes Toutes les selles diarrhéiques de patients suspects d'ICD recueillies au laboratoire entre Juin et Septembre 2013 ont été analysées avec les différentes techniques selon les recommandations des fabricants. Les échantillons discordants ont été résolus grâce à la culture toxigénique.

Résultats 468 selles ont été analysées La comparaison des 3 techniques montre une concordance globale de 94,6% (443/468) avec 3,6% (17/468) des selles positives et 91% (426/468) des selles négatives. Après résolution des 25 échantillons discordants, l'algorithme Alere présente une sensibilité faible (45,2%) comparée à ceux de Diasorin (89,7%) et Meridian (93,1%) alors que les spécificités sont comparables : 99,3%, 99,1% et 98,9%, respectivement. Le pourcentage d'infection à CD était de 6,8% (32/468). La différence observée entre les pourcentages de concordance positive (3,6%) et d'infection à CD (6,8%), s'explique par la faible sensibilité du test EIA toxines (Alère).

Conclusion Les tests immuno-enzymatiques pour la recherche de toxines A/B sont moins sensibles que les techniques de biologie moléculaire ou de nouvelles techniques comme la chimioluminescence qui présentent de meilleures performances.

2-2 Activités d'expertise

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

Nature et nombre des souches analysées

La répartition des souches reçues en 2013 était la suivante :

ORIGINES	NOMBRE
humaine	185
vétérinaire	24
Alimentaire	13
Autres (industrielle, collections...)	10
EIL	6
TOTAL	238

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

La répartition des souches d'origine humaine selon l'origine est présentée au Tableau 1 (paragraphe 8). Quarante-deux départements métropolitains ont envoyé 164 souches au CNR : 24 souches (14,6%) par les laboratoires d'Ile-de-France et 140 (85,4%) par les laboratoires des autres régions. Les départements ultra-marins envoient également des souches très régulièrement pour identification (18 souches envoyées par les DOM et 3 souches en provenance de Polynésie française et de Nouvelle-Calédonie).

Le CNR a reçu 47 souches de *Clostridium difficile* soit au titre de laboratoire expert C. difficile soit pour identification et éventuellement toxinotypage.

Les données démographiques des patients souffrant d'infections *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).

Nombre de patients et leur origine

	Nombre de patients	
	Infections non ICD (nombre de départements)	ICD (nombre de départements)
France métropolitaine	89 (32)	40 (14)
DOM	9 (3)	7(3)
TOM	2 (2)	0
TOTAL	100	47

(*) dont 15 souches retransmises au laboratoire associé pour PCR ribotypage

Répartition par sexe selon le type d'infection

SEXE	Nombre de patients	
	infections non ICD	ICD
masculin	61	18
féminin	38	29
inconnu	1	
TOTAL	100	47

Répartition des patients par âge et par sexe

		Infections non ICD		ICD	
		Hommes	Femmes	Hommes	Femmes
N		61 (âge inconnu pour 4)	38	18	29
Age	moyenne	45,1	55,6	65,5	81,1
	médiane	44	58	71	87
	Intervalle	1-93	1-92	1-91	41-111

La distribution selon les sites d'infections des souches de bactéries anaérobies (hors *Clostridium difficile*) est présentée au Tableau 2 (paragraphe 8).

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 2013, seules 4 souches sur les 157 reçues (2,5%) ne disposaient pas de cette donnée vs 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'hémocultures (35%), et de coprocultures (18,2%). Le reste des souches provenait de différentes localisations : infections intra-abdominales, infections hépatiques/pancréatiques, suppurations cutanées, musculaires ou osseuses, urologie....

Les 156 souches de bactéries anaérobies d'origine humaine identifiées se répartissaient en 33 genres différents et 49 espèces nommées (135 souches) et 21 espèces non nommées représentant de nouvelles espèces potentielles (21 souches) (Tableau 3).

Le pourcentage de souches n'ayant pu être étudiées est également en diminution nette avec 7% des isolats en 2013 vs 10% en 2012, 12,3% en 2011, 22% en 2009 et 19% en 2010. 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 (81/156 souches soit 51,9%) parmi lesquels les 47 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* / *Butyricimonas* / *Alistipes* / *Dialister* (18 souches), *Fusobacterium* (5 souches), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*...) (25 souches), et divers.

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

Quatre décès consécutifs à des infections sévères à *Clostridium*, souvent à point de départ intestinal, ont été enregistrés (dont 3 survenus quelques heures après admission aux urgences à la suite d'une hémolyse intra-vasculaire massive par *Clostridium perfringens* et une colite gravissime à *Clostridium septicum*).

Les souches responsables d'hémolyse intra-vasculaire massive caractérisées au CNR ont toujours le même toxinotype (gènes des toxines α et θ détectés par PCR). Une stagiaire en Mastere 2 (CNAM, mastere spécialisé santé publique) a étudié la diversité génétique et phénotypique de 7 souches de *Clostridium perfringens* responsables d'hémolyse intra-vasculaire par Multilocus Sequence Typing (MLST) et dosage de la toxine α (perfringolysine). Les résultats trouvés montrent que ces souches ne sont pas clonales (mise en évidence d'une diversité génétique par MLST) et qu'elles produisent *in vitro* en général mais de manière non absolue, plus de toxine α .

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.

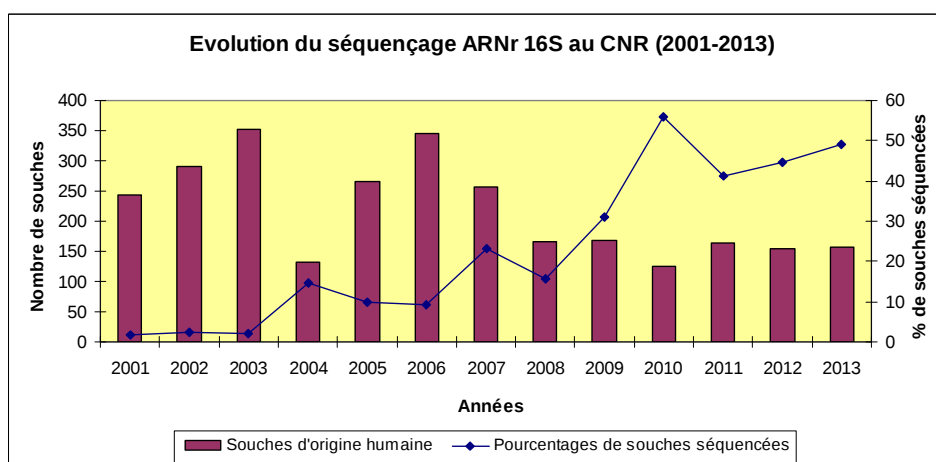
Le CNR participe également aux côtés de son laboratoire associé *Clostridium difficile* et de son réseau de laboratoires experts à la caractérisation des souches de *Clostridium difficile* isolées de cas sévères ou groupés (47 souches étudiées).

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*...).

Ce séquençage du gène ADNr 16S (77 séquences effectuées en 2013 soit 70% des souches reçues hors *Clostridium difficile*) a permis de confirmer sans ambiguïté l'identification de plusieurs bactéries rares trouvées responsables d'infections chez l'homme (appartenant aux espèces *Anaerotruncus colihominis*, *Brachyspira pilosicoli*, "*Catabacter hongkongensis*", *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium spiroforme*, *Eubacterium cylindroides*, *Filifactor alocis*, *Peptococcus niger*, *Pyramidobacter piscicola*, *Selenomonas artemidis*...).

Le graphique suivant montre l'évolution du nombre annuel de séquences ARNr 16S effectuées au CNR.



Grâce aux informations apportées par le séquençage ARNr 16S plusieurs travaux portant sur des souches rares ou appartenant à une nouvelle espèce ont été publiés en 2013.

- Une étude réalisée en collaboration avec le Ma'ayanei Hayeshua Medical Center, Bnei-Brak et l'Université de Tel-Aviv en Israël a permis la description d'une nouvelle espèce *Eisenbergiella tayi* dans la famille des Lachnospiraceae. Les 2 souches de cette étude avaient été isolées d'hémoculture chez l'homme.

Amir, I., P. Bouvet, C. Legeay, U. Gophna, and A. Weinberger. 2013. *Eisenbergiella tayi* gen. nov., sp. nov., isolated from human blood. Int J Syst Evol Microbiol. Published November 26, 2013 as doi:10.1099/ijms.0.057331-0

- L'identification d'une souche isolée d'une infection intra-abdominale à une espèce rare *Clostridium disporicum* a été rendue possible par le séquençage ARNr 16S. Ce cas clinique a été publié dans la revue Anaerobe

Plassart, C., F. Mauvais, J. Heurte, J. Sautereau, C. Legeay, and P. Bouvet. 2013. First case of intra-abdominal infection with *Clostridium disporicum*. Anaerobe **19**:77-8.

- Une souche non toxigène isolée d'un cas fatal chez une personne âgée a été identifiée comme *Clostridium botulinum* du groupe III sur la base des caractères phénotypiques et du séquençage ARNr 16S et apparentée à *C. botulinum* mosaïque D/C par analyse multilocus à l'aide de 5 gènes de ménage. Ce travail réalisé en collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire de Nice (Pr. Raymond Ruimy) et la plate-forme de séquençage de l'Institut Pasteur a été publié dans the Journal of Clinical Microbiology.

Bouvet, P., R. Ruimy, C. Bouchier, N. Faucher, C. Mazuet, and M. R. Popoff. 2014. An atypical *Clostridium* strain related to the *Clostridium botulinum* group III strain isolated from a human blood culture. J Clin Microbiol **52**:339-43.

2-2-1-2 Souches d'origine vétérinaire

Les souches anaérobies strictes d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées sont des *Clostridium* dont 72 % sont des *Clostridium perfringens* (Tableau 5, paragraphe 8). Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par le test sur souris et amplification génique.

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

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

2-2-1-3 Souches d'origine « industrielle »

Un total de 23 souches, classées "industrielles", c'est à dire non médicales et non vétérinaires, nous ont été adressées par divers laboratoires, tels que laboratoires de collections, laboratoires du secteur agroalimentaire, laboratoires pharmaceutiques, laboratoires départementaux,... (Tableau 6). Ces demandes d'analyse concernaient des confirmations d'identification, toxinotypie, identification de souches toxigènes au cours d'enquêtes épidémiologiques pour préciser l'origine d'intoxications alimentaires botuliques ou dues à des *C. perfringens*, identification de contaminants dans des préparations pharmaceutiques, caractérisation de souches à usage vaccinal ou industriel. Egalement, des souches nous sont adressées par des industriels de l'agro-alimentaire pour évaluer leur éventuelle pathogénicité. Ce sont des souches isolées d'aliments traités par la chaleur, le plus souvent des *Clostridium* thermophiles ou apparentés à *C. botulinum* qui peuvent présenter un risque de santé publique.

2-2-2 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 autoimmune, 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 de la toxine botulique A par un test endoprotéase avec révélation par ELISA (collaboration avec C Leveque, CNRS Marseille)

Afin de disposer d'un test plus facilement réalisable dans les conditions de notre laboratoire, un test de détection de la toxine botulique A avec révélation par ELISA est en cours de développement. Il est basé sur le clivage de SNAP25 par la toxine botulique A avec une révélation par ELISA à l'aide d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme clivée de SNAP25 par la toxine A et pas la molécule entière de cette protéine. Un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement cette protéine clivée nous a été fourni par C. Lévêque. L'ADN codant pour SNAP25 a été cloné dans un vecteur pET28 et la protéine recombinante avec un tag 6His a été obtenue chez *E. coli* et purifiée sur colonne cobalt. La protéine recombinante SNAP25 a été fixée sur des plaques 96-puits, puis incubée avec des dilutions en série de préparations de toxine botulique ou des contrôles, et la révélation a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-forme clivée et d'un conjugué marqué à la peroxidase. Cette technique fournit des réponses 4 à 8 fois plus sensibles que le test de létalité chez la souris lorsqu'elle est réalisée avec des toxines purifiées et en tampon aqueux, mais la sensibilité est nettement plus basse lorsque des échantillons de sérum contenant de la toxine botulique sont utilisés. Ce test a été validé pour les toxines de sous type A1, A2, A3, A4 et A5.

Développement d'un test de détection de la toxine botulique B par un test endoprotéase avec 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).

Cette méthode est en cours de développement dans nos conditions de laboratoire avec une révélation par ELISA. Pour cela le substrat spécifique de BoNT/B, à savoir la protéine VAMP2, est produite sous forme de protéine recombinante. 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. Les premiers essais montrent une bonne sensibilité et spécificité de ce test. Ce travail est en cours pour adapter ce test à des fins de diagnostic.

Développement d'un test de détection des toxines botuliques E et F par un test endoprotéase avec révélation par ELISA

Des tests endoprotéase pour la détection des toxines botuliques E et F sur le même principe que ceux pour les toxines botuliques A et B sont en cours de développement. Des peptides correspondant à la partie C-terminale de SNAP25 clivé par BoNT/E et de VAMP2 clivé par BoNT/F ont été synthétisés et ont été utilisés pour immuniser des lapins. Les sérums obtenus reconnaissent spécifiquement les substrats clivés par BoNT/E et BoNT/F, respectivement. Cependant, le taux en anticorps spécifiques de ces sérums est trop faible pour une détection suffisamment sensible de toxine. Des essais sont en cours pour améliorer la production de ces anticorps.

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

Dans le cadre du programme NRBC et en collaboration avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse, CEA, Saclay, des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine Hc de la toxine botulique de type E ont été obtenus. Ces anticorps reconnaissent BoNT/E en ELISA, mais ils ne neutralisent pas ou seulement à un faible niveau BoNT/E dans le test de létalité chez la souris. 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.

Production d'anticorps neutralisants des toxines botuliques A, B et E par vaccination ADN (Human Vaccine Immunother 2013, 9:2147-2156) (Collaboration avec l'équipe de D Sherman et P. Bigey, Faculté de Pharmacie, Paris 5)

La préparation d'ADN recombinant représente une technique plus aisée, notamment en matière d'assurance qualité, et moins coûteuse que celle des protéines recombinantes. La technique de D Sherman d'administration d'ADN par électroporation chez le lapin a été utilisée pour évaluer la possibilité d'obtenir des anticorps neutralisants des toxines botuliques A, B, et E pour un usage thérapeutique. L'ADN codant pour le domaine Hc des toxines botuliques A, B et E a été cloné dans un vecteur d'expression pour cellule eucaryote et a été injecté par électroporation intramusculairement à des lapins. Ainsi, des anticorps ayant un titre neutralisant élevé ont été obtenus vis à vis des toxines botuliques A et E, mais pas vis à vis de la toxine de type B.

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 maison 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.

Caractérisation des souches de *C. botulinum* au moyen d'une puce ADN

Illumina (PlosOne 2013, 8(6): e67510)

Dans le cadre d'un programme en collaboration avec le NIH, une puce comportant des ADN d'intérêt pour de nombreux agents de la menace biologique a été développée. Cette puce comporte les ADN des principaux gènes de neurotoxines botuliques ainsi que les gènes des protéines non toxiques du locus botulique. Elle a été testée avec des souches représentatives des principaux types de *C. botulinum* ainsi qu'avec des échantillons et souches isolés d'un foyer de botulisme. Cette méthode a permis de détecter et typer en une seule opération des souches de référence ainsi que des souches de *C. botulinum* dans des échantillons naturellement contaminés en accord avec la méthode de référence qui a été mise en place en parallèle.

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 identifiés dans des cas récents de botulisme humain.

De même, la méthode a été étendue aux souches de *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques de type B. Des primers basés sur des gènes spécifiques de chaque sous type ont été développés et validés 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 2013, 592 prélèvements ont été reçus par les différents laboratoires experts, contre 464 en 2012 (+27,6%) (Tableau I). Cette augmentation s'explique par (i) l'épidémie qui a touché Marseille et ses environs et (ii) la resensibilisation des laboratoires du Sud Est au **rappel des critères de signalement et d'envoi** des souches de *C. difficile* au CNR au cours de l'année 2013.

Parmi ces prélèvements, **540** ont été confirmés comme étant des souches de *C. difficile* et analysés ; 10 souches (1,9%) étaient des souches de *C. difficile* non toxigènes et **530** (98,1%) correspondaient effectivement à des souches toxigènes.

Parmi les souches toxigènes (Tableau II),

- La recherche des fragments A3 et B1 a été effectuée pour 529 et 528 souches respectivement ; le toxinotype a été rendu pour 2 souches (souches de toxinotype XI, toxinotypage effectué par le laboratoire associé).

- La recherche de la toxine binaire a été effectuée pour 390 souches. Parmi les 231 souches qui ne possèdent pas la forme entière de la toxine binaire, la recherche de la forme tronquée a été effectuée pour 203 souches.

- La recherche d'une délétion dans le gène *tcdC* a été réalisée pour 401 souches.

- Un antibiogramme a été rendu dans 526 cas (souches toxigènes).

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

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

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

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

	2013
Nb de prélèvements reçus	592
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	540
Nb de souches toxigènes	530
Recherche du fragment A3 (%)	99,8
Recherche du fragment B1 (%)	99,6
Recherche de la toxine binaire (%)	73,6
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	75,7
Antibiogramme (%)	99,2
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 2013 est le suivant:

Botulisme humain		
	- sérums (recherche de toxine botulique)	130
	- selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>)	55
	- sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	16
Echantillons agro-alimentaires		
	- en relation avec une suspicion de botulisme humain	30
	- autres	32
Botulisme animal		
	- échantillons	131
Echantillons d'aliment pour animaux et échantillons environnementaux		
	- échantillons	169
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 130 sérums et de 55 selles de patients suspects de botulisme ont fait l'objet d'identification de botulisme en 2013 (Tableau 8-1).

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 2013, 19 cas de botulisme plus un suspect (10 foyers plus un suspect) ont été identifiés (Tableau ci-dessous). Ces données sont sensiblement identiques à celles des années précédentes:

Année	Foyers (cas) déclarés
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 6 foyers (11 cas) de botulisme de type B, 4 foyers (6 cas) de botulisme de type A et un foyer (2 cas) de suspicion de botulisme non confirmé au CNR. Les nombres de foyers et cas sont comparables à ceux des années antérieures. Contrairement à 2012 et 2011 et conformément aux années antérieures, les formes de botulisme de type B étaient prédominantes en 2013.

En 2013, le botulisme humain est survenu sous forme de cas sporadiques ou de petits foyers familiaux (maximum 3 cas par foyer). Aucun foyer étendu n'a été signalé.

Il faut noter l'importance du botulisme infantile au cours de 2013 (4 foyers, 4 cas) soit le tiers des foyers de botulisme humain. Les autres foyers étaient liés à un botulisme d'origine alimentaire.

L'origine alimentaire a été identifiée dans 3 foyers parmi les 7 foyers de botulisme alimentaire et la source de contamination des cas de botulisme infantile n'a pas été précisée. Dans deux foyers, l'aliment en cause était un jambon de préparation familiale et dans un autre foyer il s'agissait de salaisons (saucisson, chorizo) importées (Portugal).

Botulisme infantile en 2013

Les cas de botulisme infantile étaient des formes sévères qui ont nécessité une hospitalisation en service de réanimation avec ventilation assistée.

Le premier cas était un nourrisson (fille) de un mois. La toxine botulique B a été identifiée dans les selles (4 DL/g), mais pas dans le sérum, et une souche de *C. botulinum* type Bf a été isolée des selles. Quatre échantillons de tisane et un échantillon de lait infantile que l'enfant avait consommés n'ont pas révélé la présence de toxine botulique ni de *C. botulinum*. En revanche un échantillon de miel additionné d'amandes que la mère a consommé, mais pas l'enfant, contenait une souche de *C. botulinum* type A2. Cette souche était donc différente de celle retrouvée chez le nourrisson.

Un autre cas de botulisme infantile de type B est survenu chez un enfant de 6 mois. Les selles contenaient de la toxine botulique B (240 DL/g) et une souche de *C. botulinum* type Bf, et le sérum ne contenait pas de toxine détectable. Cet enfant était allaité et recevait aussi des purées de légumes frais et de fruits, ainsi que de la tisane, et de la confiture d'abricots, mais pas de miel. Aucun échantillon d'aliment n'a été réceptionné pour analyse.

Les deux autres cas de botulisme infantile étaient de type A (nourrissons (F) de 3 mois et (M) de 6 mois respectivement) et d'une forme très sévère également. La toxine botulique A a été détectée dans les selles à un titre très élevé dans le premier cas (300 000 DL/g) et plus faible (10 400 DL/g) dans le 2ème cas. Une souche de *C. botulinum* de type A2 a été isolée dans les deux cas. Mais, la toxine botulique A a été identifiée seulement dans le sérum du 2° cas. L'origine de ces deux cas n'a pas été déterminée et aucun aliment à risque n'a été signalé. Une contamination à partir de l'environnement, notamment aérosols et poussières émis par une installation industrielle à proximité du logement du 1° cas, a été suspectée mais n'a pas pu être vérifiée.

Le premier cas de type A s'est caractérisé par un portage de *C. botulinum* A dans le tube digestif sur une longue période. En effet, *C. botulinum* A a été détecté dans les selles jusqu'à 4 mois après le début des symptômes. Le taux en toxine botulique a progressivement diminué au cours de cette période.

Une autre particularité de ce cas est que la souche de *C. botulinum* A2 était résistante aux beta-lactamines et céphalosporines. C'est la première souche de *C. botulinum* identifiée comme présentant un profil d'antibiorésistance particulier. Une étude génétique détaillée de cette souche est en cours.

Foyers de botulisme alimentaire de type A en 2013

Les deux foyers de botulisme alimentaire de type A ont regroupé deux cas dans chaque foyer qui ont développé des symptômes de paralysie et d'insuffisance respiratoire très sévères. Ces personnes ont été hospitalisées en service de réanimation avec ventilation assistée. La toxine botulique A a été retrouvée dans le sérum de ces quatre personnes (1 à 4 DL/ml). Cependant cette toxine, n'a été détectée que dans les selles d'un seul patient à un taux très faible (10 DL/g). Une souche de *C. botulinum* de type A(B) a été isolée dans les selles des deux

patients du 1° foyer, et une souche de type A2 dans les selles d'un des patients du 2° foyer. L'origine alimentaire de ces deux foyers n'a pas été identifiée. Les personnes de ces deux foyers avaient l'habitude de consommer des conserves de préparation familiale. L'analyse de deux conserves de haricots verts dans le premier foyer est restée négative, et aucun échantillon alimentaire du 2° foyer n'a été réceptionné pour analyse.

Foyers de botulisme de type B en 2013

Quatre foyers de botulisme de type B ont été signalés. L'évolution clinique de ces cas a été plus modérée que ceux atteints d'un botulisme de type A.

Le premier foyer a concerné deux personnes parmi 8 qui ont pris en commun un repas comprenant un jambon et saucisson de préparation familiale. La toxine botulique de type B a été retrouvée dans le sérum des deux personnes (1 à 3 DL/ml) et dans les selles d'une des deux personnes (20 DL/g). Le jambon contenait 20 000 DL/g de toxine botulique B. Les souches isolées du jambon et de la selle étaient de type B non protéolytique.

Le 2ème foyer a regroupé 3 personnes dont une a développé des signes sévères et a été hospitalisée en réanimation. L'analyse du sérum des deux personnes a révélé la présence de toxine botulique de type B à un taux de 8 DL/ml chez la personne la plus atteinte et 2-4 DL/ml chez l'autre personne. Les selles n'ont pas fait l'objet de prélèvement pour analyse. Ces personnes avaient consommé des produits de charcuterie d'origine portugaise. La toxine botulique B a été identifiée dans des prélèvements de chorizo et saucisson à un faible taux (16 DL/g) et aucune souche de *C. botulinum* n'a pu être isolée. Il faut noter que les salaisons et charcuteries sont souvent contaminées par *C. botulinum* de type non-protéolytique dont l'isolement est particulièrement laborieux et délicat.

Dans le 3ème foyer, une personne parmi 3 ayant consommé une conserve familiale à base de poulet et de légumes a contracté un botulisme sévère. La toxine botulique B a été détectée dans le sérum de ce patient (1 DL/ml) et pas chez les deux autres personnes. De même, la toxine botulique B a été retrouvée dans les selles (8000 DL/g) de cette personne. *C. botulinum* B a été identifié dans les selles mais n'a pas pu être isolé. L'analyse de deux conserves de la même préparation, mais différentes de celles qui ont été consommées est restée négative. Il faut souligner que la conserve supposée être à l'origine de la contamination avait été stockée à température ambiante.

Dans le 4ème foyer, trois personnes ont eu des signes modérés de botulisme après avoir consommé un jambon de préparation familiale. La recherche de toxine botulique dans le sérum de deux de ces personnes a été négative et il n'y a pas eu de prélèvement de selles pour analyse. Le jambon contenait 20 000 DL/g de toxine botulique de type B et une souche de *C. botulinum* B non-protéolytique a été isolée.

Dans un autre foyer, deux personnes ont développé des signes ophtalmologiques modérés et évocateurs de botulisme. Mais, l'analyse du sérum et des selles de ces patients est restée négative. Ces personnes avaient consommé des conserves de préparation familiale à base de porc et de gibier, mais aucun échantillon n'a fait l'objet d'analyse. Le diagnostic de botulisme a été retenu sur la base du signalement clinique de deux personnes en même temps.

Un cas particulier de suspicion de botulisme

Un cas s'est révélé particulièrement problématique. Une personne (37 ans) ayant des antécédents de thalassémie a manifesté une paralysie et insuffisance respiratoire aiguë, et a été hospitalisée en réanimation. Les cliniciens ont suspecté soit un botulisme, soit une myasthénie. L'analyse d'un prélèvement de sérum au moment des signes cliniques a montré une suspicion de toxine botulique de type B. Cependant, le volume insuffisant d'échantillon de sérum n'a pas permis de réaliser une recherche complète de toxine botulique et n'a pas permis de conclure définitivement à un diagnostic de botulisme. La recherche d'anticorps anti-récepteur de

l'acétylcholine a été négative. L'analyse d'un échantillon de selles prélevé tardivement après l'apparition des signes cliniques est restée négative, et aucune consommation d'aliment à risque par cette personne dans les jours précédant la phase clinique n'a été identifiée. Un traitement à base d'inhibiteur d'acétylcholinestérase s'est accompagné d'une amélioration rapide. Ce cas très suspect, non retenu comme botulisme, est resté non résolu.

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 2013, 8 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Miller Fisher), d'accident vasculaire cérébral (Tableau 8-2). 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° 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 (Tableau 10).

Un total de 13 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.

3-1-1-2 Botulisme agro-alimentaire et environnemental

Des échantillons d'aliments nous sont adressés dans le cadre de foyers avérés ou suspects de botulisme humain. Ces échantillons nous sont envoyés par les agents chargés des enquêtes d'hygiène alimentaire et appartenant aux Agences régionales de santé et Directions départementales de la protection des populations (ex-Services Vétérinaires et Directions des Affaires Sociales) ou parfois sur réquisition de la Préfecture de Police ou du Tribunal lors d'enquête judiciaire. Occasionnellement, nous recevons des échantillons alimentaires ou environnementaux de la part d'industriels pour des contrôles de fabrication ou d'enquêtes sur le botulisme animal. Les résultats sont présentés au Tableau 9-1.

3-1-1-3 Botulisme animal

Le botulisme animal est de plus en plus réalisé par les laboratoires vétérinaires départementaux ou régionaux, auxquels nous avons transféré la méthodologie. Les demandes d'analyse de botulisme animal que nous recevons proviennent de laboratoires vétérinaires départementaux ou privés et concernent essentiellement des confirmations d'examen réalisés en première intention et de typage de botulisme ou des analyses de foyers et cas litigieux. Notre rôle consiste principalement en une activité de référence basée sur des confirmations ou

infirmations de premières analyses et de typage de botulisme. Les analyses concernant le botulisme animal sont résumées au Tableau 11.

Botulisme bovin. Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2013, un total de 65 échantillons, représentant 22 foyers et 40 cas, ont été analysés, principalement des échantillons de contenu intestinal, du fait que la recherche de toxine botulique dans le sérum des bovins n'est pas fiable. Le botulisme a été confirmé dans 7 foyers (16 cas). Il s'agit principalement de botulisme de type mosaïque D/C (6 foyers sur 7) et un foyer de type C a été suspecté. Comme l'année précédente le type mosaïque D/C semble prédominant chez les bovins en France.

Botulisme des oiseaux sauvages. En France et dans toute l'Europe occidentale, les oiseaux sauvages, en particulier les canards et autres oiseaux aquatiques, paient un lourd tribut au botulisme chaque année, essentiellement en saison chaude et sèche. En 2013, un total de 35 échantillons représentant 22 foyers et 27 cas ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 18 foyers (22 cas). Le fait marquant est que d'après l'analyse génétique des souches isolées ou de l'ADN préparé des cultures d'enrichissement, les souches de *C. botulinum* des oiseaux sauvages correspondaient principalement au type mosaïque C/D (12 foyers sur 18), c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D. Les souches de *C. botulinum* mosaïque C/D sont distinctes de celles de type D/C retrouvées notamment chez les bovins. Une contamination croisée entre les deux espèces ou une source environnementale commune aux deux espèces semble peu probable.

Botulisme des oiseaux d'élevage. Le botulisme est relativement fréquent ces dernières années dans les élevages industriels de volailles (poulets, dindes, canards...). Outre les pertes économiques, parfois très importantes en élevage, le botulisme aviaire représente un risque de santé humaine. En 2013, 19 échantillons provenant de 12 élevages (24 cas) ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 10 élevages. Le profil des types de botulisme chez les oiseaux d'élevage (2 foyers de type C/D, un de type D, 2 de type C ou D, et 2 de type D ou C./D), était plus varié que chez les oiseaux sauvages. On peut s'interroger sur une transmission possible du botulisme entre oiseaux sauvages et oiseaux d'élevage. Mais, l'apparition du botulisme des oiseaux sauvages est très saisonnière, majoritairement en période chaude, été et début d'automne, alors que le botulisme survient de façon plus continue au cours de l'année dans les élevages de volailles.

3-1-2 Surveillance des infections à *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, Paris VI) et un réseau de 5 laboratoires experts (Rouen, Nice, Nancy, Montpellier, Toulouse) couvrant chacun une région, assurent une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*. Il faut toutefois signaler que le laboratoire expert de Nice a cessé son activité d'expertise sur *Clostridium difficile* le 20 octobre 2013. L'activité a été récupérée dans son intégralité par le laboratoire associé à Saint Antoine.

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)	2013 (592 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant hospitalisation	70	243	279
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	14	303	275
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	10	288	294
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	53	235	304
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	9	288	295
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	229	164	199

NR : non renseignés

Le nombre de prélèvements reçus par chaque laboratoire est détaillé dans le tableau IV et l'évolution est représentée sur la figure 2.

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

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

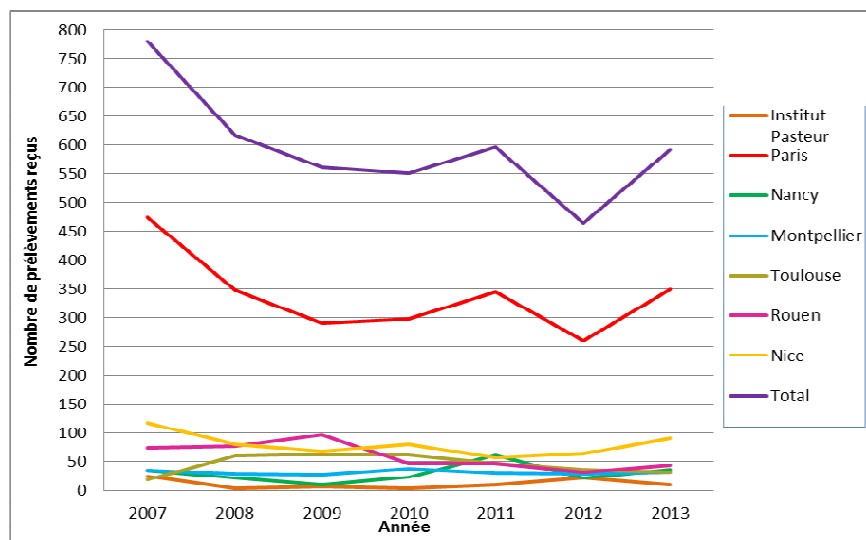


Figure 2: Répartition par laboratoire des prélèvements reçus depuis 2007

La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la figure 3.

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.

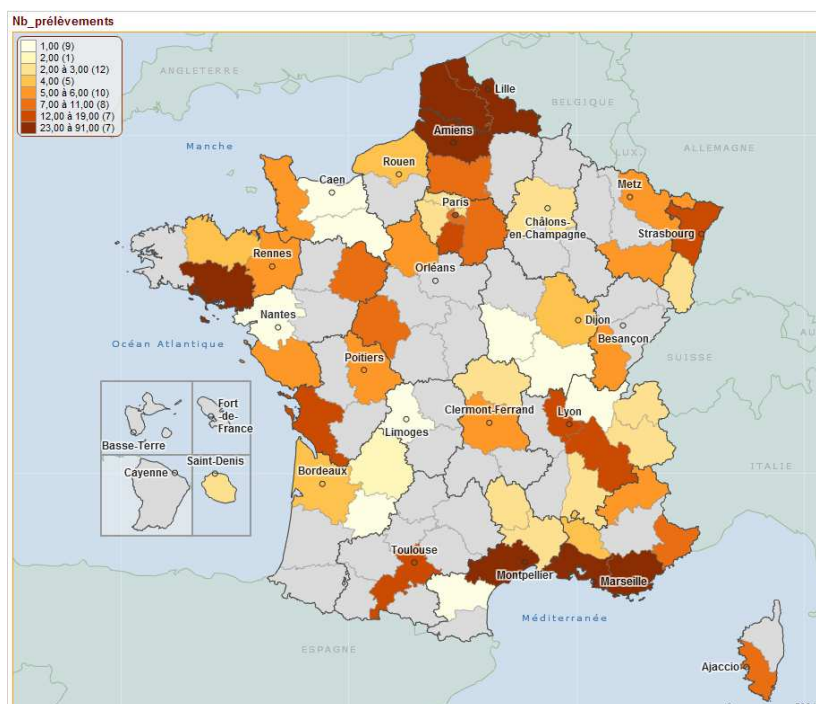


Figure 3 : Répartition des prélèvements (n=592) envoyés par département, en 2013

A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement, 2 prélèvements provenaient de Monaco.

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

En 2013, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient de selles (513 souches) à l'exception de 4 souches qui provenaient d'une hémoculture (n=2), d'une biopsie (n=1) et d'un prélèvement de sacrum (n=1). Dans 13 cas l'origine du prélèvement de la souche toxigène n'était pas renseignée.

Deux cent quatre-vingt-dix-sept souches (57,4%) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes, 220 (42,6%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 13 cas.

L'âge des patients, renseigné dans 518 cas, chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représenté sur la figure 4. **Au total, en 2013, 77% des patients ont plus de 65 ans** (versus 73,8% en 2012).

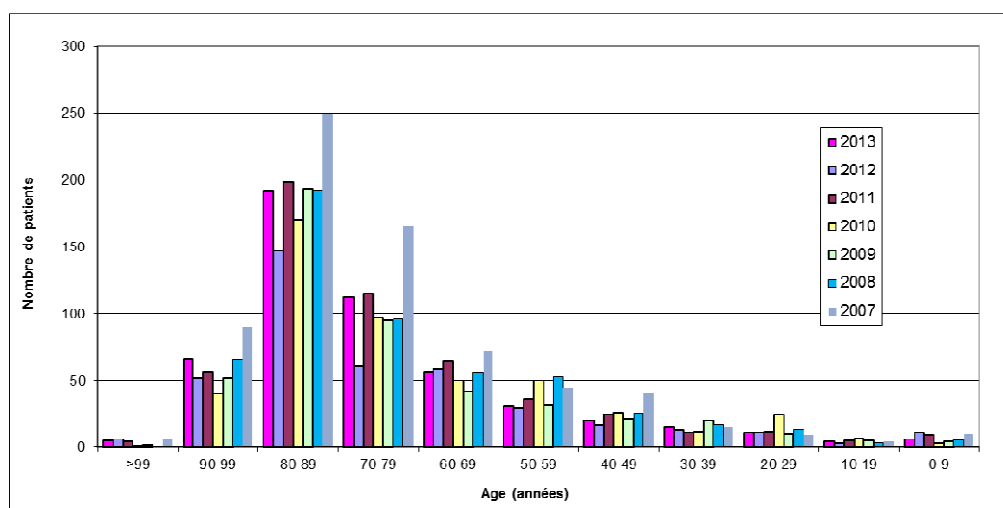


Figure 4 : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge et en fonction de l'année (2007 à 2013)

Les 10 PCR-ribotypes recherchés par les laboratoires représentent 63,6% des souches toxigènes. Les souches 027, 014/020/077 et 078/126 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 49,8 % des souches toxigènes (Tableau V, figure 5). Pour 37 souches (7%) l'identification du PCR-ribotype n'a pas été faite.

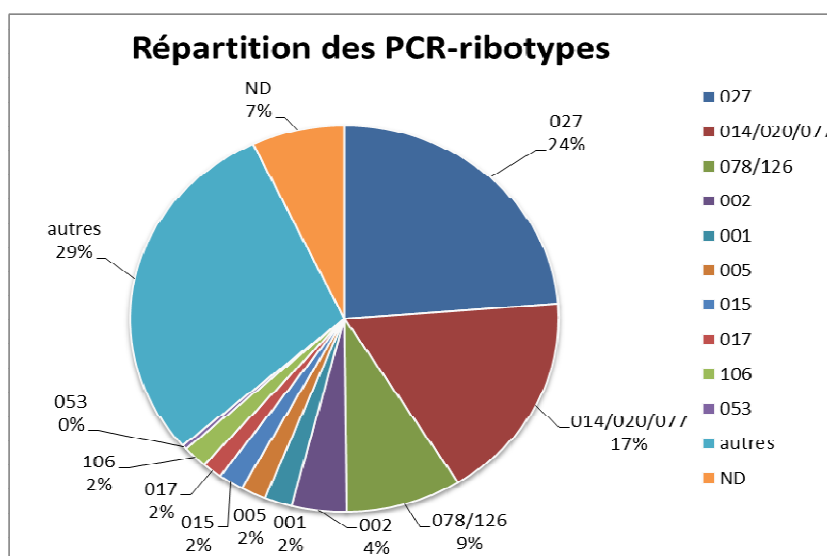
Tableau V: Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2013

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

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

ND : non déterminé (PCR-ribotype non 027, mais identification non faite)

Parmi les PCR-ribotypes autres, les PCR-ribotypes 012/048 (11 souches), 087 (10 souches), 070 (7 souches) et 050 (6 souches) sont les plus fréquemment retrouvés en 2013 mais ne sont pas caractérisés par tous les laboratoires.

**Figure 5 :** répartition des PCR-ribotypes en 2013

Parmi les 530 souches de *C. difficile* toxigènes, 126 (23,8%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**.

Parmi ces souches 027, 9 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « historique » c'est-à-dire sensibles à l'érythromycine et à la moxifloxacine (souches isolées dans les départements de l'Isère (n=2), du Morbihan (n=1), du Nord (n=1), du Rhône (n=1), de la Somme (n=2), du Var

(n=1) et de la Haute Vienne (n=1)).

Les 117 souches épidémiques 027 ont été isolées dans les Alpes-Martime (n=1), les Bouches du Rhône (n=37), en Ile-et-Vilaine (n=2), en Indre et Loire (n=2), en Isère (n=3), dans le Morbihan (n=10), dans le Nord (n=29), dans l'Oise (n=1), dans le Pas-de-Calais (n=15), dans le Bas-Rhin (n=1), dans le Haut Rhin (n=2), dans le Rhône (n=2), à Paris (n=6), dans les Yvelines (n=1), dans les Hauts de Seine (n=3), en Seine Saint Denis (n=1) et dans le Val de Marne (n=1) (figure 5).

La souche 027 épidémique a été isolée pour la première fois en 2013 dans les départements des Alpes Maritimes, des Bouches du Rhône, de l'Indre et Loire, du Morbihan, de l'Oise, du Haut-Rhin, des Yvelines et de la Seine Saint Denis, suggérant une diffusion de cette souche à tout le territoire. Par rapport aux années précédentes, les souches 027 ne sont plus majoritairement localisées dans la partie Nord de la France (Figure 6).

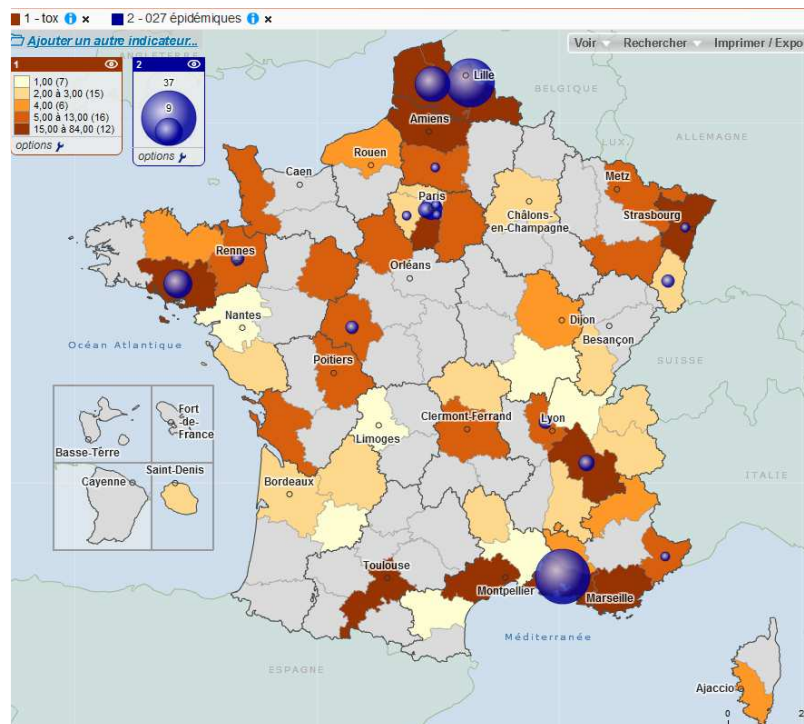


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques en fonction des départements, en 2013. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé en France, après le 027 est le 014/020/077, retrouvé sur tout le territoire (figure 7). Les souches de PCR-ribotype 078/126 arrivent en 3^{ème} position (figure 8), bien que le pourcentage d'isolement de ces souches semble diminuer.

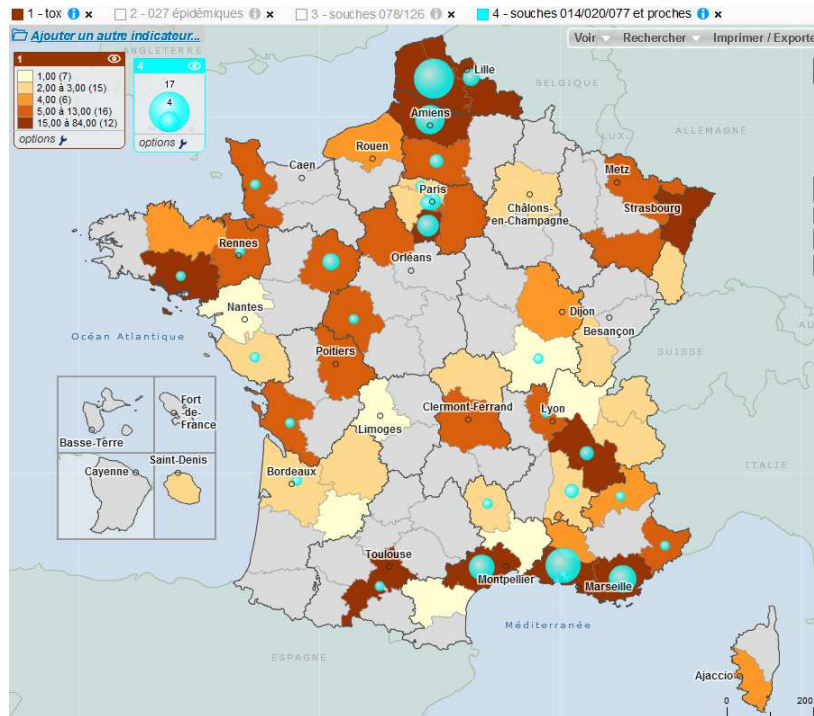


Figure 7 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 ou proches du PCR-ribotype 014/020/077 en fonction des départements en 2013. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

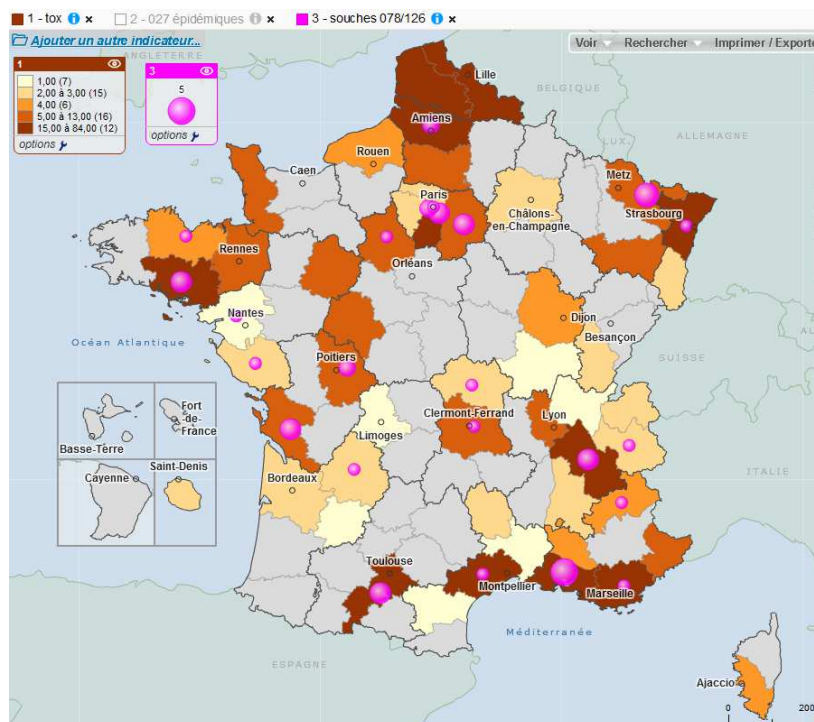


Figure 8 : Répartition des souches PCR-ribotype 078/126 ou proches du PCR-ribotype 078/126 en fonction des départements en 2013. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en couleur.

Le toxinotypage a été réalisé sur 2 souches de toxinotypes XIa et XIb. Ces toxinotypes rares ont pour particularité de ne produire que la toxine binaire. Les toxines A et B ne sont pas

produites. Ces souches ne peuvent être détectées que par les tests ciblant la toxine binaire en plus des toxines A et B. Le test de diagnostic par PCR, Xpert *C. difficile* (Cepheid), est un des rares tests commercialisés capables de détecter ce type de souche à l'heure actuelle. Ce type de souche est à surveiller.

Au cours de l'année 2013 une diminution de la proportion de souches possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée, dans la lignée de ce qui est observé depuis 2011 (Tableau VI).

Tableau VI: Evolution de la proportion de souches productrices de toxine binaire, 2007-2013

	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007
Nb de <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	390	343	453	444	421	461	656
Nb <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	159	150	223	207	188	193	264
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	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	100	87	127	95	116	85	145
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs hors souches 027 (%)	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 résistances 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.

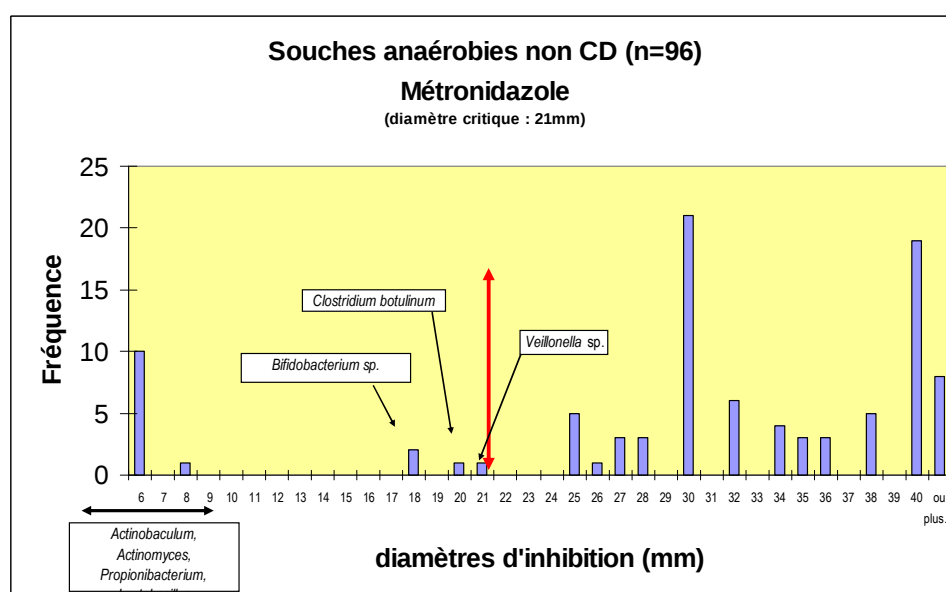
Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta-lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

En 2013, parallèlement aux tests phénotypiques nous avons effectué sur **96 souches** un antibiogramme standard selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les résultats sont repris dans le tableau 7-1. Les données d'antibiorésistance des 47 souches de *Clostridium difficile* sont données tableau 7-2 et discutées plus bas.

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*, *Bifidobacterium* etc...) présentent une résistance naturelle plus ou moins importante vis-à-vis de cet antibiotique. Une souche de *Clostridium botulinum* présentait une résistance hétérogène au métronidazole qui n'était objectivée qu'après une incubation longue (>48heures) en présence de l'antibiotique ou avec l'utilisation d'un disque de métronidazole chargé à 4 ou 5µg (la charge normalement utilisée est de 16µg). Une souche de *Veillonella* sp. présentait un diamètre de 20mm proche du diamètre critique (21mm). Tous les *Clostridium difficile* testés (n=47) étaient très sensibles (diamètre ≥ 28mm).



Amoxicilline, association amoxicilline/ac. clavulanique et imipénème

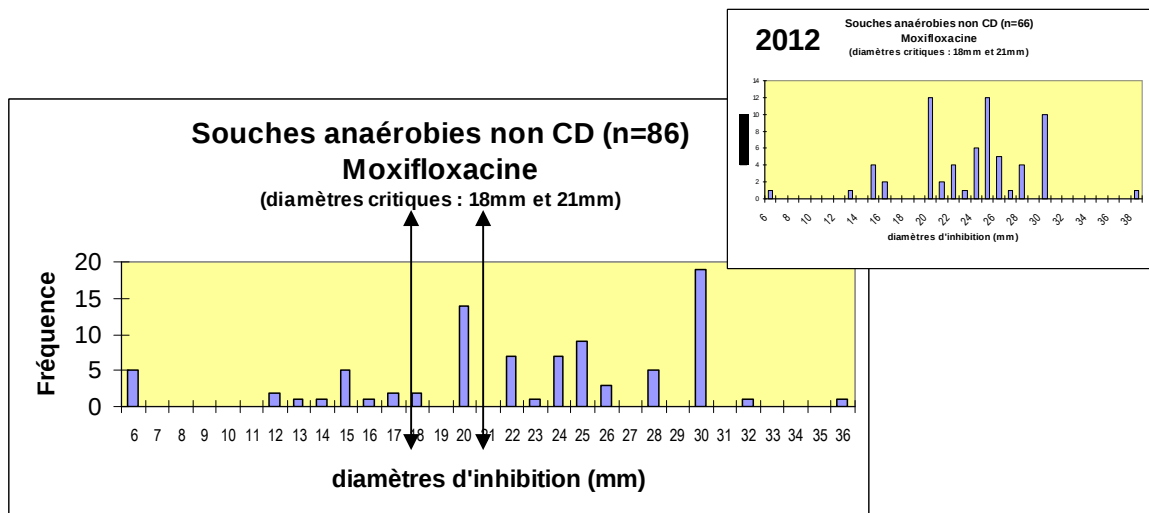
Parmi les souches très résistantes à l'amoxicilline figurent tous les *Bacteroides* (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*), une souche de *Finegoldia magna* et une souche de *Clostridium botulinum* (outre la résistance hétérogène au métronidazole citée plus haut, cette souche présente également une résistance au contact avec l'amoxicilline, la ticarcilline, la céfalotine mais conserve malgré tout une certaine activité avec l'association amoxicilline-acide clavulanique, C2G (céfoxitine), C3G (céfotaxime) (diamètres de 25mm, 40mm et 25mm, respectivement). Elle est très sensible à la moxifloxacine (30mm).

En général l'activité de l'amoxicilline a été restaurée en présence d'acide clavulanique sauf chez 2 souches de *Bacteroides fragilis*, une souche de *Bacteroides uniformis*, un *Clostridium* sp., une souche de *Desulfovibrio* sp.

Parmi les 12 souches de *Bacteroides*, dix (8 *Bacteroides fragilis*, 1 *B. thetaiotaomicron* et 1 *B. uniformis*) produisaient une β -lactamase (test à la nitrocéfine). Les génotypes (recherche par PCR des gènes *cepA*, *cfxA* et *cfiA*) de ces différentes souches sont donnés tableau 7-1. Seules 2 souches de *Bacteroides fragilis* possédaient le gène *cfiA* (codant pour une carbapénémase) qui se traduisait phénotypiquement par des diamètres diminués à l'imipénème (16mm et 20mm) (diamètres critiques : 17mm et 21mm).

Moxifloxacine

Par rapport à 2012, on peut noter une augmentation du nombre de souches résistantes au contact à la moxifloxacine: en 2012 une seule souche (*Eggerthella lenta*), en 2013 7 souches (*Finegoldia magna*, *Bacteroides uniformis*, *Alistipes onderdonkii*, *Actinomyces neuui* et *Clostridium septicum*). En pourcentage les souches résistantes + intermédiaires semblent en augmentation (17.7% en 2013 vs 12% en 2012 - différence non significative).

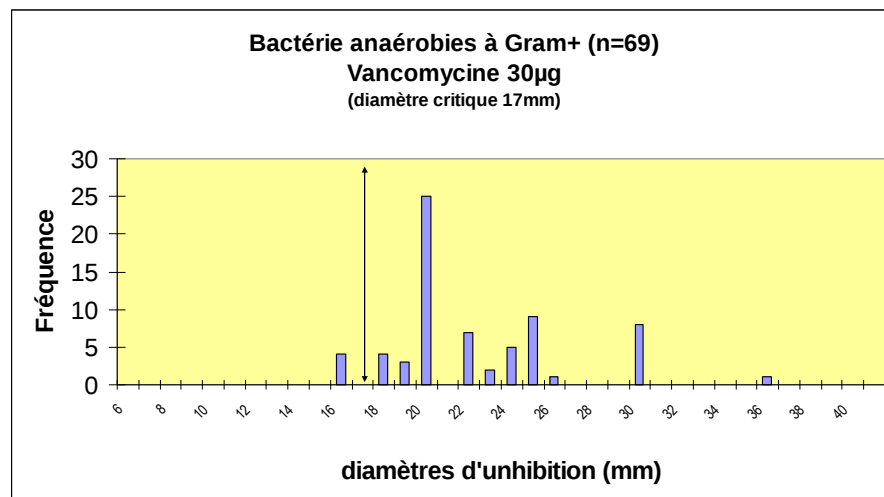


Clindamycine

Parmi les bactéries à Gram+ (n=69) des résistances à la clindamycine ont été trouvées pour 5 souches (hors *Clostridium difficile*): *Finegoldia magna* (6mm), *Actinomyces odontolyticus* (6mm), *Clostridium sporogenes* (8mm), *Eggerthella* sp. (12mm) et *Clostridium celerescens* (14mm).

Vancomycine (bactéries à Gram+)

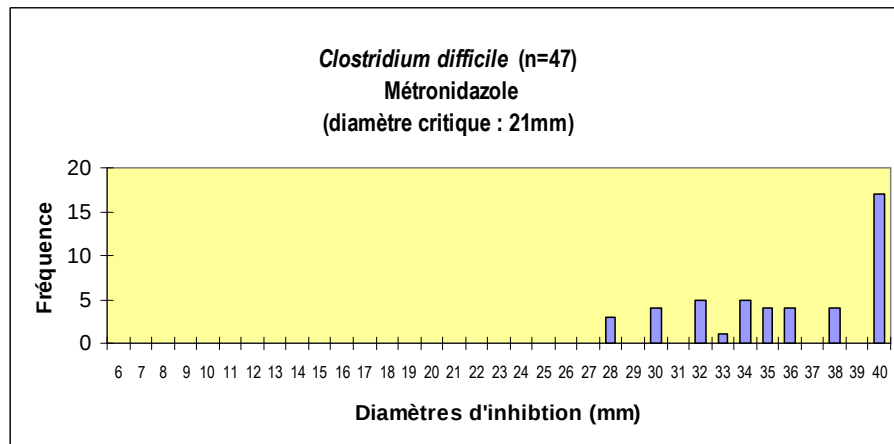
Les bactéries à Gram+ (hors *Clostridium difficile*) restent bien sensibles *in vitro* à la vancomycine. Quatre souches ont été trouvées résistantes : 3 bacilles à Gram+ [*Actinomyces oris* (1 souche), *Clostridium perfringens* (2) et un coque à Gram+ appartenant à l'espèce *Finegoldia magna* (1 souche)].



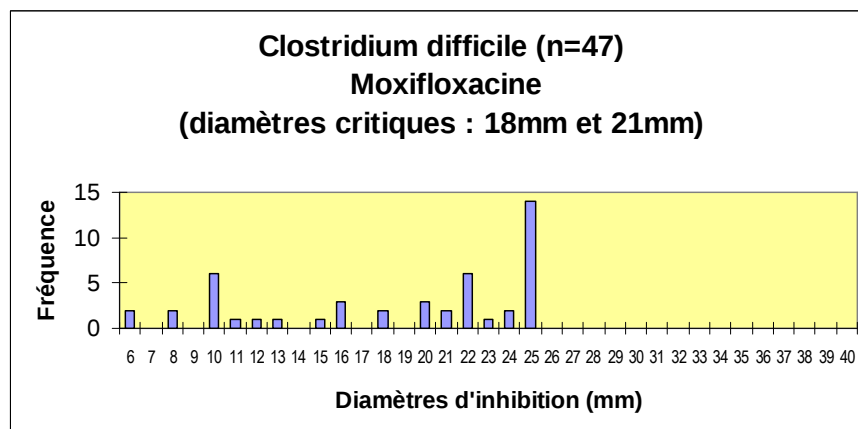
Sensibilité aux antibiotiques chez *Clostridium difficile*

Chez les souches de *Clostridium difficile* étudiées au CNR, les proportions des souches intermédiaires + résistantes sont données dans le tableau 7-2 (paragraphe 8).

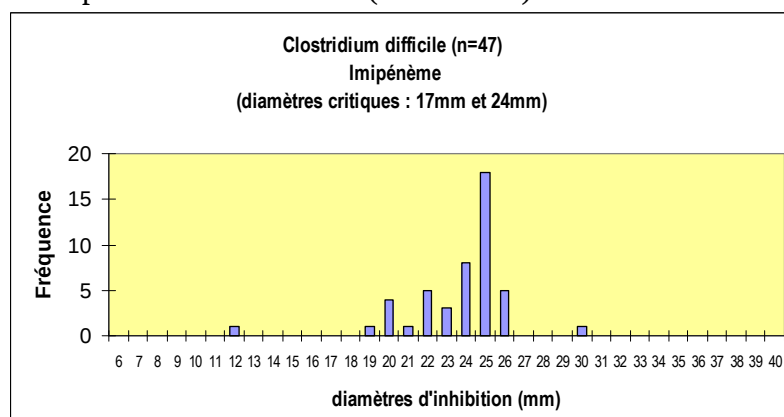
Le **métronidazole** reste très actif *in vitro* avec des diamètres supérieurs ou égaux à 28mm (diamètre critique : 21mm).



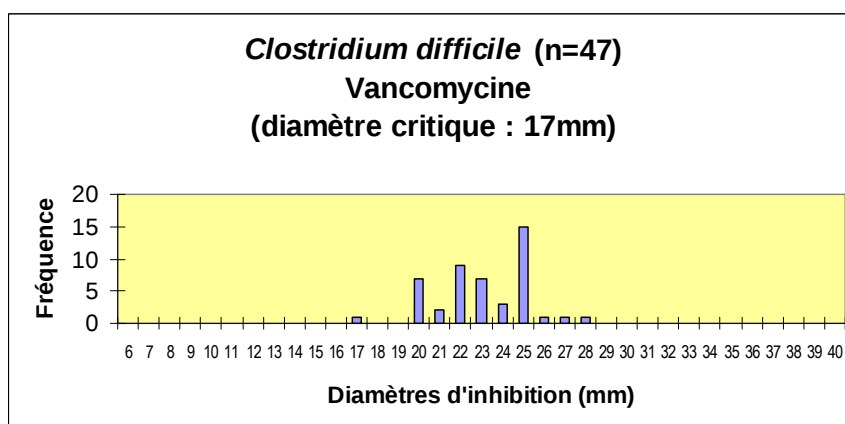
Pour la **moxifloxacine** les souches I+R sont rencontrées dans les PCR ribotypes 027 (6 souches), 078/126 (6) et les autres PCR ribotypes (19 souches) (Tableau 7-2)



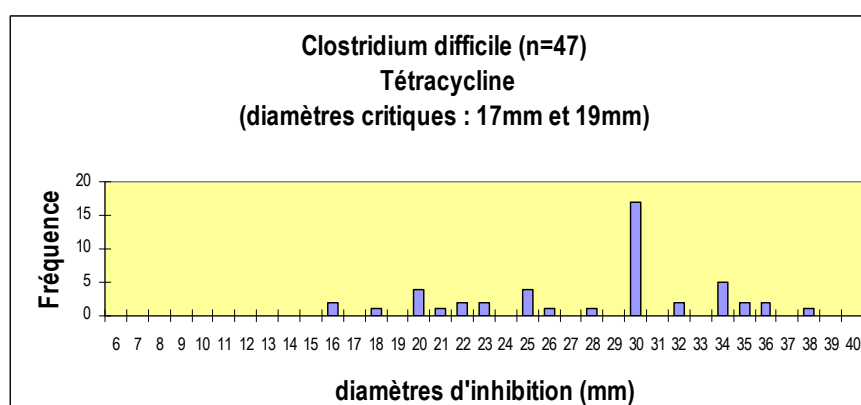
Pour l'**imipénème**, 15 souches sur 47 étaient intermédiaires ou résistantes à cet antibiotique : PCR ribotype 027 (2 souches I) ; 078/126 [1 souche R (diamètre 12mm) et 1 souche I] ; 8 souches trouvées I (TcdA+, TcdB+, CDT-, tcdC non délété) et une souche non toxigène avec une susceptibilité intermédiaire. (tableau 7-2).



La **vancomycine** reste très active sur *Clostridium difficile* puisque toutes les souches testées (47) étaient sensibles avec des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 17mm.



Les 3 souches trouvées intermédiaires ou résistantes à la **tétracycline** appartenaient au PCR ribotype 078/126.



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 526, 525, 526, 492, 526 et 500 souches de *C. difficile* toxigènes respectivement, en 2013. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 44 et 25 souches respectivement.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22mm) de 43,2%, pour la clindamycine (diamètre < 15mm) de 83,2%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21mm) de 38,2%, pour la tétracycline (diamètre < 19) de 4,4% (Tableau VII). Ces taux de résistance sont relativement stables ces dernières années.

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

La majorité des souches toxigènes étaient sensibles au métronidazole (diamètre ≥ 21 mm, ou CMI ≤ 2 mg/l selon l'Eucast) ; 2 souches avaient une CMI à 3 (souche épidémique 027) et 4 (souche de PCR-ribotype autre) mg/l par la méthode du E-test et 19 souches ont montré un diamètre entre 27 et 35 mm avec l'utilisation d'un disque de métronidazole chargé à 16µg (sensible >35 mm).

Il n'est cependant pas rare de voir des colonies dans le diamètre du métronidazole ; les CMI de ces souches restent ≤ 2 mg/l. 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

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). Des échanges sont établis à propos de chaque foyer avec l'InVS, les cliniciens concernés, l'ARS, et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé.

Contribution aux réseaux de surveillance européens

Un essai interlaboratoire a été réalisé avec le Laboratoire de Référence du Botulisme, Direction Opérationnelle Maladies Transmissibles et Infectieuses, Bruxelles (Dr Y Fikri) concernant des échantillons contaminés par de la toxine botulique, ou *C. botulinum*, ou *C. perfringens* entérotoxigène, afin d'évaluer la capacité et la méthodologie des deux laboratoires dans le diagnostic du botulisme et des affections à *C. perfringens* entérotoxigène.

Participation (C. Mazuet, M. Popoff) au projet européen EQuATox organisé par B. Dorner, Robert Koch Institut, Berlin, qui regroupe des laboratoires européens spécialisés dans la détection de toxines biologiques et inclut des experts de la sécurité, de la santé et du contrôle

alimentaire. Des essais interlaboratoires vont être prochainement organisés à propos de la toxine botulique.

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

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé (https://epidemie.pasteur.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 **31 mai 2013** 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** est membre du comité exécutif de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*) 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 2011).
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent au projet **ECDIS-net** (supporting capacity building of *C. difficile* infections at European level) et collaborent au WP4 (diagnostic) et au WP2 (épidémiologie).
- **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)
- **F. Barbut** et **C. Eckert** participent au projet **ClosER** (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes)

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 collaborent au WP4 (diagnostic) et au WP2 (épidémiologie).

Diagnostic testing and measurement of *Clostridium difficile* infections across Europe

van Dorp S., M.P.M. Hensgens, A. Virolainen, E. Nagy, P. Mastrantonio, K. Ivanova, F. Fitzpatrick, **F. Barbut**, V. Hall, T. Eckmanns, C. Suetens, K.A. Davies, M.H. Wilcox, D. Notermans, E.J. Kuijper **on behalf of the ECDIS-Net participants.**
(23rd ECCMID 2013, Poster P1869)

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.

Il s'agit d'une étude non interventionnelle dont les objectifs sont de mieux définir le poids de l'infection à *C. difficile* en Europe et la nature des souches qui circulent. Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au Centre National de Référence des anaérobies a été chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Il s'agit d'une enquête bi-annuelle de prévalence des infections à *C. difficile*. Le premier volet s'est déroulé en décembre 2012, le deuxième en juillet 2013. Soixante-douze laboratoires français sont impliqués dans cette étude de surveillance et ont envoyé un jour donné pour chaque volet, toutes les selles diarrhéiques au CNR quelle que soit la demande du clinicien. La recherche de *C. difficile* et de ses toxines a été recherchée par le CNR sur l'ensemble des selles reçues.

Prévalence des infections à *Clostridium difficile* (CD) chez les patients hospitalisés avec une diarrhée: résultats d'une étude bi-annuelle prospective multicentrique.

Rame L., A. Petit, L. Suzon, A. De Chavigny, C. Eckert, F. Barbut, Réseau français Euclid.

(RICAI 2013, Communication orale 102- récompensée par le prix RICAI)

First report from EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLOstridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea (EUCLID)

Davies K.A., C.M. Longshaw, G.L. Davis, S. Ashe, H. Ashwin, F. Lee, M.H. Wilcox
(Leeds, Chertsey, GB)
(23rd ECCMID 2013, LB 2968)

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

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.

4. Infection à *Clostridium difficile* : une étude multicentrique sur l'incidence et le surcoût des récidives.

Le Monnier A., A. Duburcq, J.R. Zahar, S. Corvec, T. Guillard, V. Cattoir, P.L. Woerther, V. Fihman, V. Lalande, H. Jacquier, A. Mizrahi, E. Farfour, P. Morand, G. Marcadé, F. Fagnani, F. Barbut, Groupe de Microbiologie Clinique.

(RICAI 2013, Communication orale 103)

Soutien financier : laboratoires Astellas

Introduction : Les infections à *C. difficile* (ICD) et leurs récidives ont un impact économique important. Cependant, peu d'études ont évalué leur(s) surcoût(s) en France.

Objectif : Estimer le taux et les surcoûts des récidives des ICD sur l'ensemble des épisodes identifiés microbiologiquement en distinguant les récidives survenues au cours d'un même séjour et celles survenant lors de séjours successifs.

Méthode : Cette étude multicentrique rétrospective a été réalisée dans 12 établissements hospitaliers (9 CHU, 2 CH et 1 CLCC). Les données microbiologiques ont été mises en relation avec celles du PMSI (MCO) de l'établissement en 2011. Les récidives ont été identifiées en cas de prélèvement positif ≥ 10 jours et < 2 mois après un premier prélèvement positif. Les surcoûts ont été estimés par appariement des séjours sur l'âge, le sexe et le GHM lorsque les récidives d'ICD surviennent au cours du même séjour ou par le coût du séjour lorsqu'elles constituent le motif d'hospitalisation (A047 en diagnostic principal).

Résultats : Un total de 1280 prélèvements bactériologiques positifs a été rapporté en 2011 chez 1034 patients différents. Parmi ces prélèvements, 17,0% ont été identifiés comme étant des récidives. En moyenne 14,4 jours (+/-11,8) ont été observés entre la date de fin de l'épisode initial et celle de la 1^{ère} récidive. Parmi les 1034 patients concernés, 159 (15,4%) patients ont connu 1 ou plusieurs récidives. 1067 (83,3%) prélèvements positifs correspondent à des séjours MCO (979 séjours différents) selon le PMSI de l'établissement. 51,7% des cas de récidive surviennent au cours du même séjour que l'épisode index. La durée moyenne de séjour observée est alors multipliée par un facteur 3,2 (63,8 jours versus 20,1 jours). Le surcoût moyen par séjour avec récidive pour l'assurance maladie est estimé à 9403 €. L'extrapolation au niveau de la France entière du surcoût annuel pour les seules récidives est de 28,55 Millions € soit 12,5% du surcoût total lié aux ICD estimé à 227,3 Millions €.

Conclusion : Le surcoût des récidives en hospitalisation de court séjour est important. Le coût réel total doit également intégrer celles des récidives d'ICD survenant en SSR, en long séjour et les épisodes non hospitalisés.

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

Collaboration avec Bertille Mullie, dans la cadre de sa thèse d'exercice pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

L'objectif de l'étude est 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 seront analysées et confrontées aux résultats de typages, réalisés au laboratoire associé.

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

Etude réalisée en partenariat avec les HCL (2011-2013)

L'objectif principal de cette thèse est 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 est 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)

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 2013 a été marquée par une épidémie d'infections à *C. difficile*, due à la souche épidémique 027, qui a touché Marseille et sa région. Cette épidémie a donné lieu à plusieurs réunions téléphoniques avec notamment l'InVS, le CCLIN Sud-Est, et l'ARLIN PACA. Toute nouvelle souche 027 détectée en région PACA a immédiatement fait l'objet d'un mail au CCLIN Sud-Est, à l'ARLIN et à l'InVS.

Par ailleurs, l'épidémie d'infections à *C. difficile* de PCR ribotype 027 dans la région Nord Pas-de-Calais se poursuit et la souche 027 épidémique a été isolée pour la première fois dans 8 nouveaux départements en 2013. Les souches de PCR-ribotype 078/126 ainsi que les PCR-ribotypes fréquents en France font également l'objet d'un suivi.

Deux souches très particulières ont été détectées par le test Cepheid GeneXpert *C. difficile* (gène codant pour la toxine binaire positif mais gène codant pour la toxine B négatif). Elles ont été isolées chez des patients atteints d'infection à *C. difficile* hospitalisés respectivement à Marseille et à Bordeaux. 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 aux toxinotypes XIa et XIb. Deux souches de ce type avaient déjà été identifiées en 2012. 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 2013

5-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

- Cours de Bactériologie Médicale, semaine Anaérobies, Institut Pasteur, Paris. (P. Bouvet, M. Popoff, co-organisateurs de la semaine anaérobie (13-17 mai 2013))
 - o Exposés: Introduction à la bactériologie anaérobie, Bactéries anaérobies d'intérêt médical à Gram positif et à Gram négatif, *Clostridium* toxinogènes, Travaux pratiques.
- Cours Master M2 (MP) "Interactions toxiques dans les écosystèmes et biotechnologies liées aux toxines" du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris (26 septembre 2013)
 - Interactions toxines bactériennes-cellules intestinales.
 - *Clostridium*s neurotoxinogènes et leurs toxines, propriétés, activités et méthodes de détection.
- Cours (MP) "Neurotoxines botuliques et tétanique" DU de Microbiologie Cellulaire organisé par M Simonet et P Lafont, Institut Pasteur de Lille, 7 mars 2013
- 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, (1 octobre 2013).
- Cours (MP) "Botulisme" dans le cadre du DU Master 2 Pro "Risques sanitaires NRBC", organisé par le Prof. JD Cavallo/B. Catell, Hôpital du Val de Grâce, Paris 16 octobre 2013.

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

Cours de Bactériologie médicale de l'Institut Pasteur : « Infections à *C. difficile* »

C. Eckert

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

DES, UE relation hôte-microorganismes au sein de l'écosystème intestinal (Faculté de Pharmacie, Paris V)

5-2 Formations aux professionnels de santé

5-2-1 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Staff de service sur les infections à C. difficile :

Eckert C. Infections à *Clostridium difficile*, Hôpital Saint Maurice 23 avril 2013

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*, Clinique de rééducation du Pré Saint Gervais, 10 avril 2013

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*, Hôpital Cochin, service de Maladies Infectieuses et Tropicales, 15 avril 2013

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*, Hôpital Saint Antoine, techniciens d'Etudes Cliniques, 28 mai 2013

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*, Hôpital Saint Antoine, service de réanimation médicale, 13 juin 2013

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*, Hôpital Robert Debré, 12 décembre 2013

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, 02/11/2010 au 31/10/2013 : thèse sur « Caractérisation de la voie d'entrée intestinale des toxines botuliques » Stage postdoctoral 1/11/2013 au 1/11/2014.
- Refes Yacine 1/10/2012 au 07/2013 : étudiant M2 Mécanisme d'action des toxines formant des pores: toxine epsilon de *C. perfringens* et toxine alpha de *C. septicum*.
- Morineaux Valérie (CEB) : thèse en cours.
- Selma Brahmi, 01/08/2013 à 12/2013 : étudiante M2 Diversité génétique et phénotypique de 7 souches de *Clostridium perfringens* responsables d'hémolyse intra-vasculaire par Multilocus Sequence Typing (MLST) et dosage de la toxine α .

5-3-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

- Aké Grace **Sika**, BTS bioanalyse et contrôle, ESTBA
- Laëtitia **Ramé**, Master QUESS (Qualité Environnement Sécurité Sanitaire), UPMC
- Ophélie **Valentin**, Master 2 Sciences de la vie et de la santé, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes
- Bertille **Mullie**, interne en biologie, Saint Philibert
- Marine **Sardaby**, Master 1, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes
- Eléonore **Holscher**, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine
- Alix **De Chevigny**, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine
- Arek **Sulukdjian**, 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/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-reference-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-bacteries-anaerobies-et-du-botulisme/activites-de-service>
- 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 récentes liées à la souche 027.

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

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 sur le programme NRBC, CEA Saclay 18 décembre 2012.

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.

5-7-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

F. Barbut ou C. Eckert ont été régulièrement en contact avec B. Coignard, 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 Activités de recherche du CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Passage de la toxine botulique B à travers la barrière intestinale (Travail de thèse de C. Connan, financement DGA et programme Européen FP7) (Plos Pathogens 2012, 8: e1002583)

Le passage de la barrière intestinale constitue la première étape de l'intoxication botulique par voie alimentaire, qui est encore peu connue. Nous avons, dans un premier temps, étudié le trafic de la neurotoxine botulique A dans un modèle de monocouche de cellules intestinales et nous avons montré que le transport de la toxine botulique A consistait en un mécanisme de transcytose dépendante de récepteurs spécifiques (gangliosides GT1b, GD1b et la protéine SV2) qui sont les récepteurs de cette toxine sur les cellules neuronales. Il semble que les récepteurs pour la toxine botulique A soient les mêmes sur les cellules neuronales et sur les cellules intestinales.

Le passage de la toxine botulique B à travers la barrière intestinale a été suivi en utilisant le domaine Hc de la toxine, qui correspond au domaine de liaison au récepteur, marqué avec une molécule fluorescente (Hc-Cy3) et le modèle d'anse intestinale de souris semi *in-vivo*. Hc-Cy3 a été injecté dans la lumière d'anses intestinales et à différents temps d'incubation, les anses ont été préparées pour l'observation en microscopie confocale. Contrairement à la toxine botulique A, le Hc-Cy3 de BoNT/B ne reconnaît pas particulièrement les cellules des cryptes intestinales au niveau de la muqueuse intestinale. Le fragment Hc de BoNT/B passe rapidement la barrière intestinale (en 10 – 20 min) et marque ensuite les extensions neuronales des plexus muqueux et myentérique. Ce passage du fragment Hc est totalement bloqué en administrant dans l'anse intestinale du Dynasore, un inhibiteur d'endocytose, en même temps que le fragment Hc fluorescent. Ceci confirme que le fragment Hc passe la barrière épithéliale intestinale par un processus d'endocytose et n'utilise pas la voie paracellulaire. Le type de neurones reconnus par le fragment Hc de BoNT/B a été analysé par comarquage avec des anticorps spécifiques de chaque type neuronal. Hc de BoNT/B reconnaît dans la paroi intestinale préférentiellement les neurones cholinergiques, et dans une moindre mesure des neurones à sérotonine, glutamate ou VIP. Ceci est en accord avec le fait que la toxine botulique A bloque la sécrétion d'acétylcholine au niveau des motoneurones. Les effets de la toxine botulique sur ce type de neurones ne sont pas connus, ils pourraient être utilisés par la toxine pour son transport vers les motoneurones cibles dans le reste de l'organisme.

Les essais sur cultures cellulaires montrent des différences dans les voies d'entrée et le trafic intracellulaire entre cellules neuronales et cellules épithéliales intestinales. BoNT/B utilise les gangliosides GD1b et GD1b et la protéine synaptotagmine comme récepteurs sur les cellules neuronales, mais reconnaît un autre récepteur protéique sur les cellules intestinales. La voie d'entrée de BoNT/B dans les cellules intestinales est dépendante de Cdc42, alors que l'internalisation dans les cellules neuronales est indépendante des Rho-GTPases.

Caractérisation de l'activité enzymatique de TpeL, une toxine de la famille des grandes toxines clostridiennes glucosylantes. (Toxicon 2013, 75:136-143).

La famille des toxines clostridiennes glucosylantes de grande taille (250-300 kDa) regroupe les toxines de *C. difficile* (Toxines A et B), les toxines de *C. sordellii* (LT et HT), la toxine alpha de *C. novyi*, ainsi que la toxine TpeL de *C. perfringens*, qui est la dernière toxine récemment identifiée.

Les toxines de cette famille se caractérisent par leur capacité à pénétrer dans la cellule cible et d'inhiber des protéines G des familles Rho et parfois Ras. Ainsi ces toxines modifient de façon drastique le cytosquelette d'actine et les jonctions intercellulaires et altèrent l'intégrité des barrières épithéliales, telle que l'épithélium intestinal, ainsi que les barrières endothéliales. Chaque toxine de cette famille interagit avec un profil distinct de substrats qui sont des protéines des familles Rho et Ras, et ainsi induit des effets cytotoxiques particuliers.

Nous avons caractérisé l'activité enzymatique de TpeL et déterminé son profil de substrats. TpeL utilise préférentiellement l'UDP-N-acetylglucosamine comme cosubstrat et modifie essentiellement les protéines Ras (cH-Ras, K-Ras, et N-Ras) et dans une moindre mesure Rpa, R-Ras3, et Rac. En utilisant des essais en biochimie et la spectrométrie de masse, nous avons déterminé que TpeL inactive Ras en glucosylant le résidu Thr35, comme la toxine de LT de *C. sordellii*.

TpeL représente un inhibiteur très spécifique des protéines Ras, et pourrait ainsi être utilisé à des fins thérapeutiques dans certains cancers dépendants d'une suractivation de Ras.

Interaction des toxines clostridiennes de grande taille avec la membrane cellulaire
(financement NRBC/CEA et PTR Institut Pasteur, travail en cours de C. Varela-Chavez, post doc)

La toxine LT de *C. sordellii* appartient comme les toxines A et B de *C. difficile* au groupes des toxines clostridiennes de grande taille qui inactivent les GTPases de la famille Rho/Ras par glucosylation et qui ont un rôle majeur dans les pathologies générées par ces bactéries. Nous avons montré au préalable que la toxine LT reconnaît spécifiquement la phosphatidylserine (PS) et que son activité enzymatique était supérieure d'un facteur environ 100 quand son substrat, Rac ou Ras, était ancré dans des membranes lipidiques enrichies en PS par rapport au substrat en solution (J. Biol. Chem. 2004, 279: 49876-49882). Le site de liaison à la PS est localisé dans le domaine enzymatique de la toxine (acides aminés N-terminaux 1-543) et les 10 premiers acides aminés sont importants pour cette liaison. En effet le domaine enzymatique recombinant délété des 11 premiers acides aminés montre une affinité très basse pour la PS. L'objectif de ce travail est de caractériser le site de liaison à la PS sur les toxines clostridiennes de grande taille et d'analyser le rôle de cette liaison à la PS dans l'activité des toxines. Des mutants ont été obtenus dans la partie N-terminale du domaine enzymatique de LT. Ces domaines ainsi que le domaine enzymatique sauvage sont obtenus en tant que protéines recombinantes et purifiées. Leur affinité de liaison à la PS est mesurée par ELISA et par "surface plasmon resonance" (Biacore). Ainsi ont pu être déterminées les constantes d'affinité de ces domaines, sauvages et mutés, pour la PS. Certains de ces mutants ont perdu en grande partie leur capacité de liaison à la PS. Un test d'électroporation de protéines a été mis au point pour internaliser ces domaines dans des cellules Vero et analyser leurs effets biologiques. Les mutants qui perdent leur liaison à la PS perdent également leur capacité à altérer le cytosquelette d'actine indiquant que la liaison à la PS est une condition indispensable pour l'activité intracellulaire de cette toxine. L'analyse de nouveaux mutants ainsi que des autres toxines de la famille des toxines clostridiennes de grande taille a permis de mieux définir le site de liaison à la PS.

Une meilleure compréhension de l'activité intracellulaire de ces toxines, notamment du trafic et de la localisation subcellulaire du domaine catalytique devrait permettre de développer de nouveaux inhibiteurs efficaces de ces toxines dans une perspective thérapeutique.

Régulation de la toxinogénèse chez *Clostridium tetani* (financement SANOFI-PASTEUR, D. Chapeton post-doc)

L'objectif est de comprendre le système de régulation de la synthèse de toxine tétanique chez *C. tetani* de façon à améliorer la production de toxine tétanique (TeNT) au niveau industriel pour la préparation de vaccin. Le gène de TeNT est précédé d'un gène régulateur (TetR) que nous avons précédemment caractérisé. Ces deux gènes sont localisés sur un plasmide de grande taille chez *C. tetani*. La première partie de ce travail a consisté à mesurer l'expression des gènes *tent* et *tetR* par RT-PCR au cours de la cinétique de croissance de souches de *C. tetani* hautement et faiblement toxigènes et dans différents milieux. Le génome de *C. tetani* contient une vingtaine de gènes régulateurs potentiels. L'analyse de ces gènes régulateurs sur la synthèse de TeNT est en cours par construction de souches mutantes de *C. tetani* chez lesquelles un plasmide recombinant portant un système d'expression d'ARN antisens pour chacun des gènes d'intérêt a été introduit.

Ainsi nous avons défini que trois systèmes à deux composants ont un rôle d'activation de l'expression du gène *tent* et de la production de TeNT, et un système à deux composants à un rôle négatif. De même, nous avons montré que la concentration en phosphate inorganique du milieu de culture et le taux de CO₂ dans la phase gazeuse influençaient l'expression des gènes *tent* et *tetR* et ainsi la production de TeNT.

Toxine epsilon de *C. perfringens* (Toxicon 2013, 23: 90-101; Toxins 2013, 5: 2138-2160) (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). Pour mieux comprendre le mode d'action de cette toxine, notamment si la formation du pore à la membrane plasmique est responsable de l'ensemble des effets cytotoxiques, des mutants dans le domaine du pore ont été construits et sont en cours d'exploration (cytotoxicité sur cellules sensibles telles que MDCK, activité de formation de pores sur les bicouches lipidiques artificielles, liaison aux cellules par immunomarquage et observation microscopique, analyse des flux d'ions K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ après administration à des cellules sensibles. Une meilleure connaissance de la fonction du pore induit par ETX et de son implication dans le mécanisme de cytotoxicité permettra de développer des inhibiteurs spécifiques et efficaces. Des premiers essais avec des inhibiteurs de formation de pore dérivés des cyclodextrines sont encourageants.

Caractérisation d'une souche atypique de *C. botulinum* isolée d'une hémoculture. (J. Clin. Microbiol. 2014, 52:339-343)

Une souche de *Clostridium* a été isolée d'un cas de choc septique fatal chez une personne âgée. Cette souche a été identifiée comme appartenant au groupe III de *C. botulinum* sur la base des caractères phénotypiques et du séquençage du gène ARN 16s.

Une étude plus approfondie incluant le séquençage du génome total a montré que cette souche est apparentée aux *C. botulinum* de type D/C, qui sont retrouvés principalement dans le botulisme des oiseaux. Elle possède les gènes des facteurs de virulence: botulinolysine, phospholipase et enzyme C3, mais n'a pas les gènes de neurotoxine, toxine C2, ni clostridiolysine. Cette souche a peut être perdu le phage qui chez *C. botulinum* groupe III et *C. novyi* porte les gènes des neurotoxines ou toxine alpha, respectivement. Son pouvoir pathogène est discuté.

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 dont l'hôpital Saint Antoine) 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 de l'activité in vitro du CB-183,315 (surotomycin) vis-à-vis d'isolats cliniques de *Clostridium difficile*

Valentin O., C. Eckert, F. Barbut
(Soutien financier : laboratoires Cubist)

L'objectif principal est l'évaluation de la sensibilité de souches de *C. difficile* représentatives des clones qui circulent en France, à la surotomycine (CB183.315), au CB-2, et à 5 antibiotiques commercialisés (vancomycine, métronidazole, clindamycine, rifampicine et fidaxomicine). L'objectif secondaire est de comparer la sensibilité aux différentes molécules en fonction des PCR-ribotypes.

Résumé accepté sous format poster à l'ECCMID 2014

3. Etude INFLADIFF: signification clinique de la présence d'une souche toxino-gène 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 toxino-gène pourrait être utile pour différencier les patients infectés des patients colonisés.

4. Les caractéristiques des patients infectés par *Clostridium difficile* avec des toxines libres dans les selles sont-elles différentes de celles des patients infectés sans toxine libre ?

Rame L., N. Khanafer, C. Eckert, V. Lalande, F. Barbut

(RICAI 2013 Poster P542, Résumé accepté sous format poster à l'ECCMID 2014)

Objectif : Comparer la présentation clinique et l'évolution (mortalité) des patients ayant une infection à *Clostridium difficile* (ICD) en fonction de la présence ou non de toxines libres dans les selles au moment du diagnostic.

Méthodes: Une étude prospective des patients adultes ayant une ICD a été réalisée du 4 décembre 2010 au 19 avril 2013. Les patients ont été classés en deux groupes: ceux qui avaient des toxines libres dans les selles (test de cytotoxicité positif) et ceux dont le diagnostic ne reposait que sur la présence d'une souche toxino-gène (test de cytotoxicité négatif mais culture toxigénique ou PCR positive). Un questionnaire standardisé a été élaboré pour le recueil des variables suivantes: données démographiques, cliniques (sévérité, décès à J+30) et biologiques (leucocytes, CRP). Un modèle multivarié de régression logistique a été utilisé pour identifier les facteurs associés à la présence de toxines libres et à la sévérité de l'ICD. Les facteurs associés au décès ont été déterminés par un modèle de Cox.

Résultat: 312 patients atteints d'ICD ont été inclus : 191 avaient des toxines libres dans les selles et 121 avaient une souche toxino-gène sans toxine détectable dans les selles. Les facteurs significativement associés à la présence de toxine libre étaient le taux de leucocytes (OR=1.48, IC95% 1.02-2.15, p=0.04.), l'administration d'antibiotiques dans les 2 mois précédents (OR=1.94, IC95% 1.06-3.57, p=0.03) et le diagnostic de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (OR=0.50, IC95% 0.28-0.87, p=0.013). Les facteurs indépendants associés à une forme sévère d'ICD étaient une CRP élevée (OR=1.08, IC95% 1.02-1.14, p=0.006) et des leucocytes >10000/mm³ (OR=6.34, IC95% 1.25 – 32.28, p=0.03). La mortalité à J+30 était significativement plus élevée chez les patients âgés (> 65 ans)(HR=3.76, IC95% 1.5-9.40) ayant une ICD sévère (HR=5.19, IC95% 1.98-13.62), une hyperleucytose (HR=4.52, IC95% 1.56-22.50) ou une leucopénie (HR=6.05, IC95% 1.29-15.86) et sans traitement spécifique (HR=0.3, IC 95% 0.12-0.73).

Discussion: La présence de toxine libre au moment du diagnostic n'est pas associée à une forme sévère d'ICD ou à une mortalité plus élevée. En revanche, elle est significativement associée à des marqueurs biologiques ou des facteurs de risque d'infection.

5. Pouvoir pathogène et prévalence des souches de *Clostridium difficile* produisant uniquement la toxine binaire.

Eckert C., L. Cathala, A. Le Monnier, A. Emirian, H. De Montclos, J. Goret, P. Berger, A. Petit, A. De Chevigny, H. Jean-Pierre, M. Sardaby, V. Lalande, H. Marchandin, F. Barbut

(RICAI 2013, Communication orale 101, Résumé accepté sous format poster à l'ECCMID 2014)

Objectifs: Depuis 2011, le CNR *Clostridium difficile* a caractérisé 5 souches non épidémiologiquement reliées de *C. difficile* appartenant au toxinotype XI. Ce toxinotype est caractérisé par la production de toxine binaire sans production associée de toxines A et B (gène *tcdB* absent, délétion en 5' du gène *tcdA*). Le rôle pathogène et la fréquence de ces souches sont mal connus. Les objectifs de cette étude étaient (i) d'analyser les caractéristiques cliniques des 5 patients chez qui ces souches ont été isolées et (ii) d'évaluer la prévalence de ces souches.

Méthodes: Les données cliniques des 5 patients porteurs de souche de toxinotype XI ont été analysées à partir des comptes-rendus d'hospitalisation. Pour estimer la prévalence des *C. difficile* de toxinotype XI, 234 souches isolées depuis 2011 à Paris et à Montpellier, et caractérisées comme non toxinogènes (NT) par les méthodes habituelles de diagnostic, ont été analysées. Après extraction d'ADN, des PCR ciblant les gènes de la toxine binaire (*cdtA* et *cdtB*), des toxines A (*tcdA*) et B (*tcdB*) et du fragment spécifique de 115pb qui remplace les gènes *tcdA* et *tcdB* dans les souches NT, ont été réalisées.

Résultats: Le diagnostic clinique d'infection à *C. difficile* (ICD) a été établi par le médecin traitant chez 4 des 5 patients et une antibiothérapie par métronidazole initiée chez ces 4 patients. Parmi les 234 souches analysées, 219 (93,6%) ont été confirmées NT et négatives en toxine binaire par PCR, 12 (5,1%) étaient des souches toxinogènes (*tcdA* et *tcdB* présents), 1 (0,4%) souche pourrait être de toxinotype XI (*tcdB* absent, *cdtA* et *cdtB* présents, toxinotypage en cours). Enfin, aucune amplification n'a pu être obtenue pour 2 souches dont la caractérisation se poursuit actuellement.

Conclusion: Les souches de toxinotype XI, ne produisant que la toxine binaire, peuvent être pathogènes chez l'homme, suggérant un rôle de cette toxine dans la virulence. Leur fréquence semble très faible mais leur dépistage en routine est difficile du fait de l'absence de toxines A et B.

6. Evaluation comparée de l'activité de l'Oxy'Floor et de l'hypochlorite de sodium vis-à-vis des spores de *Clostridium difficile*.

Suzon L., Barbut F.

(Résumé accepté sous format poster à l'ECCMID 2014- résumé soumis à la SFHH 2014)

(Soutien financier : laboratoires Anios)

Introduction : La contamination environnementale joue un rôle majeur dans la transmission croisée de *C. difficile*. Les recommandations actuelles préconisent l'utilisation d'eau de Javel 0,5% (EJ). Ce désinfectant est reconnu pour ses propriétés sporicides mais comporte un certain nombre d'inconvénients : i) son passage doit être précédé d'un nettoyage ii) son odeur peut être irritante pour les patients et le personnel et iii) l'hypochlorite peut être corrosif pour certains matériaux

Objectif : Evaluer l'activité sporicide d'un détergent-désinfectant (Oxy'Floor, Anios) (OF) selon le protocole en trois étapes décrit par Siani *et al.* (AJIC 2011, 37, 212-219).

Matériels et méthodes : Le protocole d'étude mesure: 1) la capacité d'une lingette imbibée de produit à éradiquer les spores de *C. difficile* ($\sim 10^7$ UFC/ml) d'une surface expérimentalement contaminée dans des conditions standardisées d'application 2) la capacité des lingettes précédentes à transférer des spores sur une surface propre 3) l'activité sporicide d'une lingette imprégnée sur laquelle a été directement inoculée une suspension de spores. Trois souches ont été utilisées (PCR ribotypes 027, 078 et 014) sur trois types de porte-germes (acier, laminé, PVC). Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicate. L'activité sporicide a été mesurée par la diminution (exprimée en $\log_{10}$) de la contamination initiale et comparée par le test t apparié (Prism4, GraphPad). Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

Résultats : La réduction de la contamination initiale obtenue avec les lingettes imprégnées d'EJ ou d'OF était respectivement de $4,53 \pm 0,7 \log_{10}$ et $4,8 \pm 0,57 \log_{10}$ ($p=0,013$). L'activité sporicide de l'OF était significativement meilleure que celle de l'EJ sur le laminé (quelle que soit la souche) ou vis-à-vis de la souche 078 (quel que soit le porte-germe). En présence de substances interférentes (sérum albumine bovine 0.03%), l'activité sporicide diminue légèrement pour les deux produits (EJ : $4,05 \pm 0,52 \log_{10}$ et OF : $4,20 \pm 0,52 \log_{10}$, $p=0,31$). Le nombre de spores transférées par les lingettes était significativement plus élevé avec l'OF comparé à l'EJ ($p=0,039$). L'activité sporicide mesurée par inoculation directe de spores sur les lingettes était de $4,53 \pm 0,74 \log_{10}$ pour l'EJ et $4,69 \pm 0,62 \log_{10}$ pour l'OF ($p=0,13$).

Discussion : Dans des conditions expérimentales simulant les conditions réelles d'utilisation, l'activité sporicide de l'OF est comparable à celle de l'EJ et pourrait représenter une option plus simple pour la désinfection quotidienne environnementale.

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.

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

- 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. 2013 Nov 26. doi: 10.1099/ijs.0.057331-0. [Epub ahead of print]
- Plassart C, Mauvais F, Heurté J, Sautereau J, Legeay C, Bouvet P. First case of intra-abdominal infection with *Clostridium disporicum*. Anaerobe. 2013 Feb;19:77-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.12.002. Epub 2012 Dec 12.
- Harper CB, Popoff MR, McCluskey A, Robinson PJ, Meunier FA. Targeting membrane trafficking in infection prophylaxis: dynamin inhibitors. **Trends Cell Biol** 2013, 23(2): 90-101.
- Wigelsworth DJ, Ruthel G, Schnell L, Herrlich P, Blonder J, Veenstra TD, Carman RJ, Wilkins TD, Van Nhieu GT, Pauillac S, Gibert M, Sauvonnet N, Stiles BG, Popoff MR, Barth H. CD44 promotes intoxication by the clostridial Iota-family toxins. **PlosOne** 2012,

7: e51356.

- Wioland L., Dupont JL, Bossu JL, Popoff MR, Poulain B. Attack of the nervous system by *Clostridium perfringens* epsilon toxin: from disease to mode of action on neuronal cells. **Toxicon** 2013, 75:122-135.
- Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. **Toxicon** 2013, 75: 63-89.
- Connan C., Denève C., Mazuet C., Popoff MR. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. **Toxicon** 2013, 75:90-100.
- Autheman D, Wyder M, Popoff M, D'Herde K, Christen S, Posthaus H. *Clostridium perfringens* beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. **PlosOne** 2013, 8 (5):e64644.
- Huyet J, Naylor CE, Savva CG, Gibert M, Popoff MR, Basak AK. Structural insights into *Clostridium perfringens* Delta toxin pore formation. **PlosOne** 2013, 8 (6): e66673.
- Vanhomwegen J, Berthet N, Mazuet C, Guigon G, Vallaeys T, Stambolliyska R, Dubois P, Kennedy GC, Cole ST, Caro V, Manuguerra JC, Popoff MR. Application of high-density DNA resequencing microarray for detection and characterization of *botulinum* neurotoxin-producing clostridia. **PlosOne** 2013, 8(6): e67510.
- Pauillac S, D'allayer J, Lenormand P, Rousselle JC, Bouvet P, Popoff MR. Characterization of the enzymatic activity of *Clostridium perfringens* TpeL. **Toxicon** 2013, 75: 136-143.
- Burgain A, Rochard A, Trollet C, Mazuet C, Escriou V, Scherman D, Bigey P. DNA electroporation in rabbits as a method for generation of high-titer neutralizing antisera: examples of the *botulinum* toxins types A, B, and E. **Hum Vaccin Immunother** 2013, 9(10): 2147-2156.
- Stiles B., Barth G., Barth H., Popoff MR. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man. **Toxins (Basel)** 2013, 5: 2138-2160.
- 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.
- Popoff MR. *Botulinum* neurotoxins: more and more diverse and fascinating toxic proteins. **J Infect Dis** 2014, 209: 168-169.
- 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.

6-2-1-3 Chapitre de livre

- Popoff M., Mazuet C., Poulain B.: Botulism and Tetanus. In: Rosenberg E. (Ed.) The Prokaryotes (4th edition) – Human Microbiology: SpringerReference (www.springerreference.com). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. DOI: 10.1007/SpringerReference_365033 2013-03-12 14:36:12 UTC

6-2-1-4 Congrès, workshops

- ETOX16 European Workshop on Bacterial Protein Toxins organisé par K Aktories, Freiburg, Germany 22-26 juin 2013-09-09
 - invited chairman of the session: Clostridial toxins
 - Présentation d'un poster: Two component systems are involved in the regulation of *botulinum* neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A. C. Connan, H. Brueggemann, C. Mazuet, M. R. Popoff
 - et short talk by C. Connan
- CLOSPATH2013 8° International Conference on the Molecular Biology and Pathogenesis of the Clostridia, Palm Cove, Australia, 22-26 october 2013.
 - invited lecture "Clostridial pore-forming toxins, powerful virulence factors".
- 2° International Congress on Bacteriology and Infectious Diseases, Omics Group, Baltimore USA, 20-22 novembre 2013.
 - lecture: Genetic variation in *Clostridium botulinum*, botulism types in France
- Co-organisateur et participation aux 21° Rencontres en Toxinologie, "Toxines marines et aquatiques", Société Française d'Etudes en Toxinologie, Institut Pasteur, Paris, 9-10 décembre 2013.
- Participation à la rencontre NRBC (contremesures dans les risques biologiques) organisée par le CEA, Saclay, 19 décembre 2013.

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

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

Barbut F., B. Guery et C. Eckert. Comment traiter une infection digestive à *Clostridium difficile* en 2014 ? Revue réanimation. Sous presse.

Barbut F., V. Lalande, L. Beaugier et C. Eckert. Infections digestives à *Clostridium difficile*. Mini-revue Hépatogastro, vol 20 n°2, février 2013.

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

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.

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. 2013 Oct;81(10):3757-69.

Eckert C, Jones G, Barbut F. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the molecular approach. Future Microbiol. 2013 Dec;8:1587-98.

Eckert C., B. Coignard, M. Hebert, C. Tarnaud, C. Tessier, A. Lemire, B. Burghoffer, D. Noel, F. Barbut. On behalf of the ICD-Raisin Working Group. Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: The ICD-RAISIN 2009 national survey. Med Mal Infect. 2013 Feb;43(2):67-74.

Debast SB, Bauer MP, Sanders IM, Wilcox MH, Kuijper EJ; **on behalf of the ECDIS Study Group.** Antimicrobial activity of LFF571 and three treatment agents against *Clostridium difficile* isolates collected for a pan-European survey in 2008: clinical and therapeutic implications. J Antimicrob Chemother. 2013 Jun;68(6):1305-11.

Eckert C, Burghoffer B, Barbut F. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. J Med Microbiol. 2013 Sep;62(Pt 9):1435-8.

Eckert C., B. Burghoffer, V. Lalande, et F. Barbut. Evaluation of the chromogenic agar chromID(R) C. difficile. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):1002-4.

Otter JA, Yezli S, Perl TM, **Barbut F**, French GL. A request for an alliance in the battle for clean and safe hospital surfaces. J Hosp Infect. 2013 Aug;84(4):341-2.

Barbut F, Yezli S, Otter JA. Hydrogen peroxide room disinfection: there is no elephant in the room but there's plenty of evidence in the trunk. J Hosp Infect. 2013 Apr;83(4):355-6.

Otter JA, Yezli S, Perl TM, **Barbut F**, French GL. The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. J Hosp Infect. 2013 Jan;83(1):1-13.

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., Cornely O., Fitpatrick F., Kuijper E., Nagy E., Rupnik M., Tvede M., Wilcox M.

C. difficile in Europe. Astellas Pharma Europe Ltd. Avril 2013 (document didactique pour les membres de la commission européenne).

6-2-2-4 Communications nationales

Eckert C., A. Petit, M. Sardaby, A. De Chevigny, V. Lalande, F. Barbut. Évaluation de 3 tests détectant la GDH par rapport à la culture de *Clostridium difficile* sur milieu sélectif. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Poster 538.

Eckert C., A. Petit, E. Holscher, V. Lalande, F. Barbut. Diagnostic of *Clostridium difficile* infection: evaluation of the AmpliVue assay and the GDH-Illumigene algorithm versus toxigenic culture. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Poster 539.

Eckert C., N. Poccardi, G. Sika, A. Petit, F. Barbut. GenoType CDiff is an accurate molecular genetic assay for characterization of *C. difficile*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Poster 537.

Rame L., N. Kanafer, C. Eckert, V. Lalande, F. Barbut. Les caractéristiques des patients infectés par *Clostridium difficile* avec des toxines libres dans les selles sont-elles différentes de celles des patients infectés sans toxine libre ? Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Poster 542.

Le Monnier A., A. Duburcq, J.R. Zahar, S. Corvec, T. Guillard, V. Cattoir, P.L. Woerther, V. Fihman, **V. Lalande**, H. Jacquier, A. Mizrahi, E. Farfour, P. Morand, G. Marcadé, F. Fagnani, **F. Barbut**, Groupe de Microbiologie Clinique. Infection à *Clostridium difficile* : une étude multicentrique sur l'incidence et le surcoût des récurrences. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Communication orale 103.

Eckert C., L. Cathala, A. Le Monnier, A. Emirian, H. De Montclos, J. Goret, P. Berger, A. Petit, A. De Chevigny, H. Jean-Pierre, M. Sardaby, V. Lalande, H. Marchandin, F. Barbut Pouvoir pathogène et prévalence des souches de *Clostridium difficile* produisant uniquement la toxine binaire. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Communication orale 101.

Rame L., A. Petit, L. Suzon, A. De Chavigny, C. Eckert, F. Barbut, Réseau français Euclid. Prévalence des infections à *Clostridium difficile* (CD) chez les patients hospitalisés avec une diarrhée: résultats d'une étude bi-annuelle prospective multicentrique. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2013 Communication orale 102.

6-2-2-5 Communications internationales

Eckert C., O. Said, C. Rambaud, N. Poccardi, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut. Comparison of the VIDAS® *C. difficile* GDH and the GDH component of the *C. diff* Quik Chek Complete for detection of *Clostridium difficile* in stools. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 2013. Poster P1871.

Eckert C., B. Burghoffer, C. Rambaud, V. Lalande, M. Chioukh, F. Barbut. Evaluation of DiaSorin LIAISON *C. diff* Toxins A&B test. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 2013. Poster P 1875.

Banz A., C. Eckert, O. Said, N. Poccardi, C. Rambaud, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut, A. Foussadier. Comparison of a 3-step algorithm based on VIDAS ® C. difficile (GDH and CDAB) and chromID C.difficile with the Quik Chek Complete for the diagnosis of Clostridium.difficile infection. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 2013. Poster P 1870.

van Dorp S., M.P.M. Hensgens, A. Virolainen, E. Nagy, P. Mastrantonio, K. Ivanova, F. Fitzpatrick, F. Barbut, V. Hall, T. Eckmanns, C. Suetens, K.A. Davies, M.H. Wilcox, D. Notermans, E.J. Kuijper on behalf of the ECDIS-Net participants. Diagnostic testing and measurement of Clostridium difficile infections across Europe. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, 2013. Poster P 1869

6-2-2-6 Conférences sur invitations

Eckert C. *Clostridium difficile* : apport des nouvelles techniques diagnostiques : aide ou dérive?

3ème Journée Antibio-Résistance & Infections, 5 décembre 2013, Paris.

Eckert C. : Actualités sur le diagnostic des ICD

5^{ème} Journée régionale de formation et d'information-Prévention du risque infectieux en EHPAD, 23 mai 2013, Lille.

Barbut F., Diagnostic et traitement des infections à *Clostridium difficile* en 2013

Journées de Microbiologie clinique 2013, 27 septembre 2013, Paris

Eckert C. : Infections nosocomiales à *Clostridium difficile*

XVII Congreso Nacional VI Internacional. Medicina Preventiva en nuestro tiempo, en torno a la Economía y la Salud, 06 juin 2013, Carthagène, Espagne

Barbut F. Alleviating the burden of *Clostridium difficile* : current and emerging treatment options.

International Congress of Chemotherapy, 6 juin 2013, Yokohama, Japon.

Barbut F. Different technical approaches to *Clostridium difficile* diagnosis.

20th IFCC EFLM European Congress of Clinical chemistry and Laboratory Medicine (EuromedLab), 21 May 2013, Milan, Italie

6-2-2-7 Autre

Formation

Eckert C. Outils diagnostiques, stratégies diagnostiques des infections à *Clostridium difficile*, Courchevel, bioMérieux, 23 janvier 2013

Barbut F. Enseignement sur les Anaérobies, bioMérieux, 18-21 mai 2013

7- PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2014-2015

7-1 Programme du CNR Bactéries anaérobies et botulisme

7-1-1 Identification des souches de bactéries anaérobies

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

7-1-2 Diagnostic du botulisme

Le CNR poursuit ses activités de diagnostic de botulisme à partir des échantillons biologiques et alimentaires qui lui sont envoyés. De plus, nous réalisons l'isolement des souches de *C. botulinum* à partir des échantillons de selles et/ou d'aliments détectés positifs, ainsi que leur caractérisation par génotypage et séquençage du gène de la neurotoxine.

7-1-3 Activités de recherche en relation avec le CNR

Développement de tests alternatifs de dosage des toxines botuliques

La mise au point des tests de détection des toxines botuliques A, B et E basés sur l'activité protéolytique des substrats spécifiques (SNAP25 pour les toxines botuliques A et E, et VAMP2 pour la toxine botulique B) et révélation par des anticorps spécifiques de la forme clivée en format ELISA sera poursuivie. L'objectif est de remplacer les tests de létalité chez la souris par des tests *in vitro* pour la détection et l'identification des toxines botuliques dans les échantillons biologiques et alimentaires. La contrainte est d'obtenir une sensibilité de détection aussi élevée avec les tests *in vitro* par rapport au test souris, notamment dans les échantillons de sérum humain.

Caractérisation génétique des souches de *C. botulinum* isolées au CNR (suite)

Les souches récemment isolées de cas de botulisme humain sont en cours d'analyse pour le génotypage du locus botulique, séquençage du gène de la neurotoxine botulique pour déterminer le sous-type, et MLST pour évaluer la variabilité génétique de ces souches.

Caractérisation des souches de bactéries anaérobies atypiques adressées au CNR

Certaines souches adressées au CNR sont issues de cas pathologiques très particuliers comme des septicémies ou chocs toxiques foudroyants, ou bien présentent des caractères atypiques. En plus des tests habituellement réalisés pour l'identification de ces souches, des analyses plus approfondies sont entreprises sur certaines d'entre elles pour mieux appréhender leur pouvoir pathogène ou leur mode de transmission. Ces analyses comprennent: mise en évidence de toxine ou activité toxique particulière, séquençage partiel du génome, analyse de la variabilité génétique par MLST quand cette souche est apparentée à un groupe particulier de bactéries anaérobies, résistance aux antibiotiques, étude détaillée des caractères biochimiques

...

Programme SERODIF (Rôle pronostique de la réponse immunitaire de l'hôte dans les infections à *C. difficile*, leurs complications et les rechutes)

L'objectif est d'étudier la relation entre le profil de réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'un panel d'antigènes de *C. difficile* et la survenue d'une infection à *C. difficile*, décrire les caractéristiques de la réponse immunitaire, identifier un profil de réponse immunitaire à valeur pronostique (formes graves et rechutes) et évaluer le poids de l'immunité parmi l'ensemble des facteurs de risque d'une infection à *C. difficile*.

Le CNR est chargé de la production/purification des toxines A, B et CDT (toxine binaire) pour leur utilisation comme antigène dans les analyses de réponse anticorps des patients qui seront effectuées par l'Unité de ML Gougeon Immunité antivirale, Biothérapie et Vaccin.

Déclaration d'invention Institut Pasteur 2013: " Predictive Value of *Clostridium difficile*-specific Immune Response for Recurrence and Disease Outcome"

- principal inventeur Marie Lise Goujon (Unité d'Immunité antivirale, Biothérapie et Vaccin, Institut Pasteur).
- Alban Lemonnier (Université Paris Sud)
- Anne Collignon (Université Paris Sud)
- M. R. Popoff (préparation/purification des toxines A et B de *C. difficile*)

Poursuite des activités de recherche engagées dans l'Unité (voir partie travaux de recherche).

7-2 Programme du Laboratoire associé *Clostridium difficile***Epidémiologie : Projet de réseau européen pour la surveillance des infections à *C. difficile* (ECDIS-net) "Supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level"**

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*.

Epidémiologie : Analyse par la technique du MLVA de souches 027 isolées dans différentes régions françaises et notamment en PACA

Suite à l'émergence du clone épidémique 027 dans la région PACA et plus particulièrement à Marseille et ses environs, il a été décidé de réaliser un typage par MLVA des souches de PCR-ribotype 027 afin de pouvoir distinguer des clones au sein de ces souches.

Epidémiologie : 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.

Epidémiologie : Etude pilote européenne de surveillance des infections à *Clostridium difficile* (étude LuCID)

Etude organisée sous l'égide de l'Université de Leeds (Pr M. Wilcox)

Il s'agit d'une étude non interventionnelle qui durera, d'avril 2014 à mars 2015. Ses 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 coproculture pour recherche de *C. difficile*, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées.

Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des anaérobies est chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Cette étude sera réalisée auprès de 25 laboratoires d'établissements hospitaliers.

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

Etude réalisée en partenariat avec les HCL (2011-2013)

L'objectif principal de cette thèse est 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 est d'assurer la caractérisation moléculaire des souches de *C. difficile* isolées.

Epidémiologie : Caractérisation d'isolats cliniques de *Clostridium difficile*, isolés à Saint Philibert

Collaboration avec Bertille Mullie, dans la cadre de sa thèse d'exercice pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

L'objectif de l'étude est 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 seront analysées et confrontées aux résultats de typage, réalisés au laboratoire associé.

Diagnostic : Evaluation d'un nouveau test diagnostic pour la mise en évidence de gènes de *C. difficile* dans les selles : Apollo (bioMérieux)

Le test Apollo est un test moléculaire qui permet de détecter plusieurs gènes de *C. difficile* directement dans les selles. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de ce nouveau test.

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

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.

Physiopathologie: Etude SERODIFF (rôle pronostique de la réponse immunitaire de l'hôte dans les infections à *C. difficile*, leurs complications et les rechutes)

L'objectif est d'étudier la relation entre le profil de réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'un panel d'antigènes de *C. difficile* et la survenue d'une ICD, décrire les caractéristiques de la réponse immunitaire, identifier un profil de réponse immunitaire à valeur pronostique (formes graves et rechutes) et évaluer le poids de l'immunité parmi l'ensemble des facteurs de risque d'ICD

Durée totale de l'étude : 18 mois dont 15 mois d'inclusion dans les 17 centres participants (5 à 10 inclusions/mois/centre).

8- TABLEAUX (CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME)

TABLEAU 1

**Demandes d'identification de souches d'origine humaine (CD compris)
Fréquences par département**

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

DEPARTEMENTS	FREQUENCES
2	2
3	5
7	1
8	1
9	1
10	1
13	18
16	3
20	1
23	1
24	3
28	1
31	3
33	1
34	34
35	1
37	1
38	3
41	1
44	1
59	10
60	3
64	1
67	1
68	1
70	1
71	2
72	1
74	4
75	3
76	4
77	4
79	1
80	19
83	7
84	1
90	1
91	1

DEPARTEMENTS	FREQUENCES
92	1
93	8
94	6
95	1
France métropolitaine	164
971	2
972	1
973	12
974	3
Polynésie française	1
Nouvelle-Calédonie	2
TOTAL	185

Fréquence par département des patients enregistrés au CNR avec infections à *Clostridium difficile* (ICD) et infections non ICD

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

DEPARTEMENTS	Nombre de patients	
	Infections non ICD	ICD
2	1	1
3	2	
7	1	
8	1	
9	1	
10	1	
13	5	7
16	2	1
20		1
23		1
24	1	2
28	1	
31	3	
33		1
34	30	2
35	1	
37	1	
38	2	
41	1	
44	1	
59		3
60	1	1
64		1
67	1	
71	2	
74	3	1
75	1	
76	3	
77	3	
79	1	
80	2	17 (*)
83	6	
90	1	
91	1	
92	1	
93	4	
94	4	
95		1
Sous-total France métropolitaine	89	40
971	1	
973	5	7
974	3	
Polynésie française	1	
Nouvelle-Calédonie	1	
Sous-total DOM, COM et Nouvelle-Calédonie	11	7
TOTAL	100	47

TABLEAU 2

Répartition des souches d'origine humaine par site d'infection (hors *Clostridium difficile*)**Période du 01/01/2013 au 31/12/2013**

LOCALISATIONS	FREQUENCES
Coproculture	20
Gynécologie	4
Hémoculture	35
Infection ORL (amygdale, sinus, etc...)	4
Infections cutanées et musculaires (abcès, suppurations, gangrènes)	8
infections hépatiques/pancréatiques	2
Infections intra-abdominales (pus, redon, etc...)	8
Infections osseuses	6
infections péri-rectales, périnéales	5
infections pleuro-pulmonaires	4
Non précisé	4
Urologie/néphrologie	10
	110

TABLEAU 3

Répartition des souches d'origine humaine par genre

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

GENRES	NOMBRES
ACIDAMINOCOCCUS	1
ACTINOBACULUM	2
ACTINOMYCES	6
AKKERMANSIA	1
ALISTIPES	1
ANAEROCOCCUS	1
ANAEROTRUNCUS	1
BACTEROIDES	12
BIFIDOBACTERIUM	2
BRACHYSPIRA	1
BUTYRICIMONAS	2
"CATABACTER"	1
CLOSTRIDIUM (incluant 47 souches de <i>Clostridium difficile</i>)	81
DESULFOVIBRIO	2
DIALISTER	3
EGGERTHELLA	6
EGGERTHIA	1
EIKENELLA	1
EUBACTERIUM	1
FILIFACTOR	1
FINEGOLDIA	1
FUSOBACTERIUM	5
GORDONIBACTER	1
LACTOBACILLUS	2
PARVIMONAS	2
PEPTOCOCCUS	1
PEPTONIPHILUS	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS	1
PREVOTELLA	1
PROPIONIBACTERIUM	1
PYRAMIDOBACTER	1
SELENOMONAS	1
VEILLONELLA	11
SOUS-TOTAL	156
RECHERCHE DE BACTERIES SPECIFIQUES NEGATIVE	6
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	5
ANALYSE NON EFFECTUEE	1
SOUCHES RE-TRANSMISES AU LABORATOIRE ASSOCIE CD	17
TOTAL	185

TABLEAU 4

Répartition des souches d'origine humaine par espèce

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

135 souches appartenant à 49 espèces nommées
 21 souches appartenant à des espèces non nommées (nouvelles espèces potentielles)

ESPECES	NOMBRES
ACIDAMINOCOCCUS INTESTINI	1
ACTINOBACULUM SCHAALII	1
ACTINOBACULUM URINALE	1
ACTINOMYCES ISRAELII	1
ACTINOMYCES NEUII	1
ACTINOMYCES ODONTOLYTICUS	2
ACTINOMYCES ORIS	2
AKKERMANSIA MUCINIPHILA	1
ALISTIPES ONDERDONKII	1
ANAEROCOCCUS TETRADIUS	1
ANAEROTRUNCUS COLIHOMINIS	1
BACTEROIDES FRAGILIS	9
BACTEROIDES THETAOTOMICRON	2
BACTEROIDES UNIFORMIS	1
BIFIDOBACTERIUM BREVE	1
BIFIDOBACTERIUM SP.	1
BRACHYSPIRA PILOSICOLI	1
BUTYRICIMONAS SP.	2
"CATABACTER HONGKONGENSIS"	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type A	2
CLOSTRIDIUM CELERECRESCENS	1
CLOSTRIDIUM CLOSTRIDIOFORME	1
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	47
CLOSTRIDIUM HATHEWAYI	1
CLOSTRIDIUM LITUSEBURENSE	1
CLOSTRIDIUM NOVYI A	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	20
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	2
CLOSTRIDIUM SP.	1
CLOSTRIDIUM SPIROFORME	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
CLOSTRIDIUM TETANOMORPHUM	1
DESULFOVIBRIO DESULFURICANS	1
DESULFOVIBRIO SP.	1
DIALISTER PNEUMOSINTES	3

EGGERTHELLA LENTA (ancien EUBACTERIUM LENTUM)	5
EGGERTHELLA SP.	1
EGGERTHIA CATENAFORMIS (ancien LACTOBACILLUS CATENAFORMIS)	1
EIKENELLA CORRODENS	1
EUBACTERIUM CYLINDROIDES	1
FILIFACTOR ALOCIS	1
FINEGOLDIA MAGNA (ancien Peptostreptococcus magnus)	1
FUSOBACTERIUM GONIDIAFORMANS	1
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	2
FUSOBACTERIUM SP.	1
FUSOBACTERIUM VARIUM	1
GORDONIBACTER SP.	1
LACTOBACILLUS SP.	2
PARVIMONAS MICRA (ancien MICROMONAS MICROS)	2
PEPTOCOCCUS NIGER	1
PEPTONIPHILUS HAREI	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS ANAEROBIUS	1
PREVOTELLA LOESCHEII	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	1
PYRAMIDOBACTER PISCOLENS	1
SELENOMONAS ARTEMIDIS	1
VEILLONELLA SP.	11
SOUS-TOTAL	156

RECHERCHE DE BACTERIES SPECIFIQUES NEGATIVE	6
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	5
ANALYSE NON EFFECTUEE	1
SOUCHES RE-TRANSMISES AU LABORATOIRE ASSOCIE CD	17
TOTAL	185

TABLEAU 5

Souches d'origine vétérinaire : répartition par espèce

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

ESPECES	NOMBRES
CLOSTRIDIUM ARGENTINENSE (VARIANT NON TOXIQUE)	1
CLOSTRIDIUM CHAUVOEI	2
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	13
CLOSTRIDIUM SPOROGENES + BIFERMENTANS - ABSENCE DE SORDELLII	2
TOTAL	18

TABLEAU 6

Souches d'autres origines: répartition par espèce

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Origine industrielle, collections

ESPECES	NOMBRES
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	9
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	5
CLOSTRIDIUM SP. (PROCHE C. PUNICEUM)	1
PORPHYROMONAS GINGIVALIS	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	7
TOTAL	23

EIL EUROPEEN

ESPECES	NOMBRES
CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type A	2
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	2
TOTAL	6

Tableau 7-1 : Résistance (R+I) aux antibiotiques des souches isolées en 2013

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* (57 souches) – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

CATEGORIES	ESPECES	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox- ac. Clav.	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
ACTINOBACTERIACEAE	<i>Actinobaculum</i> spp.	2	2 (*)	0	0	0	0	0	1
	<i>Actinomyces</i> spp.	6	6 (*)	0	0	2 (I : 20mm) <i>A. oris</i>	1	1 [R : 16mm) <i>A. oris</i>	3
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	2 (*)	0	0	0	0	0	0
	<i>Gordonibacter</i> sp.	1	0	0	0	0	1	0	5
	<i>Propionibacterium</i> <i>acnes</i>	1	1 (*)	0	0	0	0	0	0
COQUES A GRAM+		7	0	2	1 (R : 20mm) <i>Finegoldia magna</i>	1 (I) <i>Peptoniphilus harei</i>	1	1 [R : 16mm) <i>Finegoldia magna</i>	2
BACILLES A GRAM+ NON CLOSTRIDIUM	<i>Anaerotruncus</i> <i>colihominis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
	" <i>Catabacter</i> <i>hongkongensis</i> "	1	0	1	0	0	0	0	1
	<i>Eggerthella lenta</i>	6	0	2	0	0	1	0	4
	<i>Eggerthia</i> <i>catenaformis</i> (ancien <i>Lactobacillus</i> <i>catenaformis</i>)	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Eubacterium</i> <i>cylindroides</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
CLOSTRIDIUM SPP.		28	1 (R : 20mm) (**) <i>C. botulinum</i>	3	1 (R : 12mm) <i>Clostridium</i> sp.	0	3	0	15 (4R (***) ; 11I)

(*) Espèces naturellement résistantes

(**) Résistance hétérogène.

(***) *Clostridium septicum* : 6mm ; *C. perfringens* : 15mm ; *C. butyricum* : 17mm ; *C. clostridioforme* : 17mm.

Bactéries à Gram – (38 souches) – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

Espèce en clair	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Tétracycline	Erythromycine	Imipenem	Céfalotine	Céfoxitine	Céfotaxime	Clindamycine	Rifampicine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxifloxacine
<i>Acidaminococcus intestini</i>	1	0	0	0			0				0		1		0
<i>Alistipes onderdonkii</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
<i>Bacteroides</i> spp. (*)	12	0	11	4	11	10	2	12	5	12	5	0	9	0	
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Butyricimonas</i> sp.	2	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>Desulfovibrio</i> spp.	2	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	2	2	0	0
<i>Dialister pneumosintes</i>	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Fusobacterium</i> spp.	3	0	2	1			0				0		3		2
<i>Prevotella loescheii</i>	1	0	1	0			0				0		1		1
<i>Pyramidobacter piscicola</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Selenomonas artemidis</i>	1	0	0	0			0				0		1		0
<i>Veillonella</i> sp.	11	1	10	5		1/1		3	6		0/9	1/1	1/1	0/0	1/1

(*) détails des espèces et leur génotype

Phénotypes et génotypes des souches de *Bacteroides* identifiées en 2013

Espèces	CNR#	β - lactamase	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>	groupe ADNr 16S de <i>Bacteroides</i> <i>fragilis</i>	Diamètre d'inhibition pour l'imipénème (diamètre critique : 17mm/24mm)
<i>Bacteroides fragilis</i>	2014/00035	+	+	+	-	1	30
	2013/00042	+	-	-	+	2	16
	2013/00172	+	-	-	+	2	20
	2013/00370	+			-	1	36
	2013/00840	+	+	-	-	1	35
	2013/00841	+	+	-	-	1	30
	2013/00842	+	+	-	-	1	28
	2013/00843	+	+	-	-	1	35
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2013/00129	+	+	-	-	NA	30
<i>Bacteroides uniformis</i>	2013/00056	+	-	+	-	NA	34

NA : non applicable

Tableau 7-2 : Antibiogramme spécifique à *Clostridium difficile* – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

Caractéristiques	N	Métronidazole 16µg	Tétracycline	Erythromycine	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacin
PCR ribotype 027	6	0	0	5 (R)	4 (I)	6 (R)	0	6 (5R;1I)
PCR ribotype 078/126	6	0	3 (2R ; 1I)	6	2 [1R (12mm);1I]	4 (R)	0	6 (R)
A+,B+,CDT- (tcdC non délété)	31	0	0	7 (5R;2I)	8 (I)	22 (R)	0	16 (8R;8I)
A+,B-, CDT- (tcdC non délété)	1	0	0	0	0	1 (I)	0	0
A+,B+,CDT- (tcdC délété 18bp) mais PCR ribotype non 027	1	0	0	0	0	1(R)	0	1(R)
A+,B+,CDT+ (tcdC délétion 18bp + délétion 117) mais PCR ribotype non 027	1	0	0	0	0	1	0	1
non toxigène	1	0	0	1 (R)	1 (I)	1 (R)	0	1 (R)

BOTULISME HUMAIN
Tableau 8-1 : nombre de cas et de foyers

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

N°DOSSIER	PRELEVEMENT	DPT	Sexe	Foyer (Suspicion)	Nombre de cas	Typage de la toxine			Titre toxine (DL/ml sérum)	Autres prélèvements	Aliment suspect	Souche isolée
						A	B	E				
2013/00078	Sérum	64	F	Type Bf	1				Absence (< 1)	2013/00063: Selles B*F* (12 000 DL/g) 2013/00086/ Selles B*F* (4 DL/g)	2013/00079: Tisanes (négatif) 2013/00080: Tisanes (négatif) 2013/00081: Tisanes (négatif) 2013/00082: Tisanes (négatif) 2013/00091: Miel + Amandes PCR A+ 2013/00132/ Lait infantile (négatif)	<i>C. botulinum</i> Bf 2013/00094 <i>C. botulinum</i> A2 2013/00186
2013/00148	Sérum	27	F	Type A	1				< 1	2013/00145: Selles A+ (4 800 DL/g)	2013/00154: Lait (négatif) 2013/00155: Amidon de blé (négatif)	<i>C. botulinum</i> A2 2013/00169; 00224; 00303; 00308; 00374; 00398
2013/00204	Sérum								< 1	2013/00149: Selles PCR- (2 000 DL/g)		
2013/00249	Sérum								Absence (<1)	2013/00201: Selles A+ (300 000 DL/g) 2013/00250: Selles A+ (20 000 DL/g)		
2013/00235	Sérum	90	F	Type A	2	+			≥ 4	2013/00236: Ecouvillon A*B* 2013/00248: Selles PCR- (< 10 DL/g)	2013/00239: Conserve familiale de HV (négatif) 2013/00240: Conserve familiale de HV (négatif)	<i>C. botulinum</i> A(B) 2013/00301; 00302 <i>C. sporogenes</i> 2013/00306; 00307
2013/00237	Sérum		M			+			≥ 2	2013/00238: Ecouvillon A*B* 2013/00259: Selles A+ (10 DL/g)		
2013/00253	Sérum		M			-	+	-	2,5	2013/00254: Selles PCR- (< 20 DL/g)		
2013/00255	Sérum	42	M	Type B	2 (+ 8 convives asymptomatiques)	-	+	-	1,2<2,5	2013/00256: Selles PCR- (20 DL/g)	2013/00257: Jambon familial PCR B+ (20 000 DL/g) 2013/00258: Saucisson familial PCR B+ (20 DL/g)	<i>C. botulinum</i> Bnp 2013/00317; 00355 <i>C. sporogenes</i> 2013/00309; 00310
2013/00285	Sérum		M						Absence (< 1)			
2013/00328	Sérum		F			-	+	-	8			
2013/00341	Sérum	75	M	Type B	3	-	+	-	2 < 4		2013/00343: Barquette (négatif) 2013/00344: Couenne de lard (négatif)	<i>C. sporogenes</i> 2013/00423
2013/00352	Sérum	24	M	Type A	2	+	-	-	≥ 1	2013/00356: Selles PCR A+ (< 20 DL/g)	Conserve familiale d'asperges (non analysées)	<i>C. botulinum</i> A2 2013/00397
2013/00358	Sérum		M			+	-	-	≥ 1	2013/00359: Selles PCR- (< 20 DL/g)		
2013/00411	Sérum	31	M	Type A	1	+	-	-	2	2013/00412: Selles PCR A+ (10 240 DL/g)		<i>C. botulinum</i> A2 2013/00412
2013/00455	Sérum	43	F	Type B	1 (+3 asymptomatiques)	-	+	-	≥ 1	2013/00456: Selles PCR B+ (8000 DL/g)	2013/00458: Conserve familiale de viande aux légumes (négatif) 2013/00467: Conserve familiale de viande aux légumes (négatif)	
2013/00474	Sérum		M						Absence (< 1)			
2013/00475	Sérum		F						Absence (< 1)			
2013/00717	Sérum	91	F	Type Bf	1	-	-		Absence (< 1)	2013/00730: Selles B+F+ (340 DL/g)	Tisanes? Confitures d'abricots?	<i>C. botulinum</i> Bf 2013/00809
2013/00752	Sérum	23	F	Suspicion	2	-	-	-	Absence (< 1)	2013/000759: Selles PCR- (<10 DL/g)	Conserve familiale de pâté (porc et gibiers) non analysées 2013/00768: Foie gras commercial (négatif)	
2013/00753	Sérum		M			-	-	-	Absence (< 1)	2013/00767: Selles PCR- (<10 DL/g)		
2013/00772	Sérum	63	M	Type B	2 (+1 avec signes ophtalmiques légers)	-	-	-	Absence (< 1)		2013/00774: Jambon familial B+ (≥20 000 DL/g)	<i>C. botulinum</i> Bnp 2013/00810
2013/00773	Sérum		F			-	-	-	< 1			
2013/00783	Sérum						+		1 DL			
2013/00785	Sérum	75	F	Cas litigieux (cf texte)	1	-	-	-	Absence (< 1)	2013/00786: Selles PCR- (<20 DL/g)		
2013/00808	Sérum					Volume insuffisant						
TOTAL				10 (11)	19							

Tableau 8-2: Suspicion de neuropathies auto-immunes et autres neuropathies
Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Numéro de dossier	Département LAM	Type
201300007	93	Polyradiculonévrite
201300051	75	Miller Fisher
201300064		
201300090	29	Miller Fisher
201300326	62	AVC
201300394	75	Autre
201300521	80	Guillain Barré
201300579		
201300554	40	Guillain Barré
201300787	21	Guillain Barré

TABLEAU 9-1

Botulisme : échantillons agro-alimentaires reliés à une suspicion de botulisme

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Numero de dossier	Laboratoire	Prélèvements	Nombre	Type	Echantillon positif	Titre en toxine (DL/g)	Souche isolée
2013/00052	LABORATOIRE DU CH de NÎMES	Farce de foie gras, truffes et sanglier	1		0		
2013/00079	CH DE PAU	HERBES TISANE	6	B	0		2013/00186 (A2)
2013/00080		HERBES TISANE			0		
2013/00081		HERBES TISANE			0		
2013/00082		HERBES TISANE			0		
2013/00091		Miel + Amandes			1 (A)	N/A	
2013/00132		MILUMEL			0		
2013/00154	HOPITAL RAYMOND POINCARE - GARCHES	POUDRE DE LAIT	2	A	0		
2013/00155		AMIDON DE BLE			0		
2013/00239	Laboratoire du Centre hospitalier de Belfort	HARICOTS VERTS	2	A	0		2013/00309 (C.sporo)
2013/00240		HARICOTS VERTS			0		2013/00310 (C.sporo)
2013/00257	CHU DE SAINT ETIENNE	JAMBON	2	B	1	20 000	2013/00317 (Bnp)
2013/00258		SAUCISSON			1	20	2013/00355 (Bnp)
2013/00343	DSV 91 - COURCOURONNES	Barquette de viandes	5	B	0		2013/00423 (C.sporo)
2013/00344		Couenne de lard			0		
2013/00345		Chorizo portugais			1	< 16	
2013/00346		Saucisson à l'ail			0		
2013/00347		Saucisse sèche portugaise			1	< 16	
2013/00458	DDCSPP de la HAUTE LOIRE - LE PUY EN VELAY	BOCAL VIANDE LEGUME	2	B	0		
2013/00467		BOCAL VIANDE LEGUME			0		
2013/00569	SERVICE COMMUN DES LABORATOIRES DU MINEFI MASSY CEDEX	PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°1	6	A (Botulisme infantile en Norvège)	0		
2013/00570		PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°2			0		
2013/00571		PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°3			0		
2013/00572		PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°4			0		
2013/00573		PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°5			0		
2013/00574		PUREE D'AMANDES BLANCHES/ LOT 1626/ Bocal N°6			0		
2013/00761	LABORATOIRE LAKLACHE - MENNECY	CONSERVE DE POIVRONS ROUGES A L'HUILE	1		0		
2013/00768	CENTRE HOSPITALIER DE GUERET	Foie gras canard entier du Sud Ouest	1	Suspicion	0		
2013/00774	LABORATOIRE DU CH CLERMONT-FERRAND	JAMBON	1	B	1	≥ 20 000 DL/g	2013/00810 (Bnp)
2013/00869	CH Sud-Essonne DOURDAN/ETAMPES	FOIE GRAS	1		0		

30

6

TABLEAU 9-2

BOTULISME : Echantillons agro-alimentaires alimentation humaine (non reliés à une suspicion de botulisme)

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Nombre	Toxine après			TYPE					
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C/D	D	E	F
32	0	1	1	0	0	1	0	0	0

TABLEAU 9-3

BOTULISME : Echantillons agro-alimentaires (alimentation animale)

Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Nombre	Toxine après			TYPE					
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C/D	D	E	F
167	0	4	4	0	1	3	0	0	0

TABLEAU 9-4
BOTULISME : Echantillons environnementaux
Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Nombre	Toxine après			TYPE					
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C	D	E	F
2	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 10
Recherche d'anticorps neutralisants dirigés contre la toxine botulique
Période du 01/01/2013 au 31/12/2013

Recherche positive	1 (type A)
Recherche négative	13
Non conformités	2
TOTAL	16

TABLEAU 11

BOTULISME ANIMAL.
Répartition par espèce

Période du 01-1-2013 au 31-12-2013

ESPECE	Nombre total d'échantillons		Foyers positifs (cas analysés)			Foyers négatifs	Nbre total de foyers (nbre total de cas analysés)
OISEAUX SAUVAGES	35	54	18 (22)	C ou D	1	4	22 (27)
				C/D	12		
				D ou C/D	5		
OISEAUX ELEVAGE	19		7 (10)	D	1	5	12 (24)
				C ou D	2		
				C/D	2		
				D ou C/D	2		
BOVINS	65		7 (16)	Suspicion C	1	15	22 (40)
				D/C	6		
CHEVAL/ANE/PONEY	5		0			3	3 (3)
CHIENS/CHATS	2		1 (1)	C ou D	1	1	2 (2)
OVINS	4		0			2	2 (2)
ANIMAUX SAUVAGES/ZOO	1		0			1	1 (1)
TOTAL	131		33 (49)			31	64 (99)

9- 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.

9-1 Missions et objectifs majeurs

9-1-1 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'un contrôle de l'ANSM) à propos de la détention, cession, acquisition, et manipulation de microorganismes pathogènes et toxines (MOT) en juin 2008 et mars 2013.

9-1-2 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 5 laboratoires experts (laboratoires experts de Rouen, Nice, 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.

9-2 Equipes

9-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

➤ Effectif par catégories de fonctions en 2013

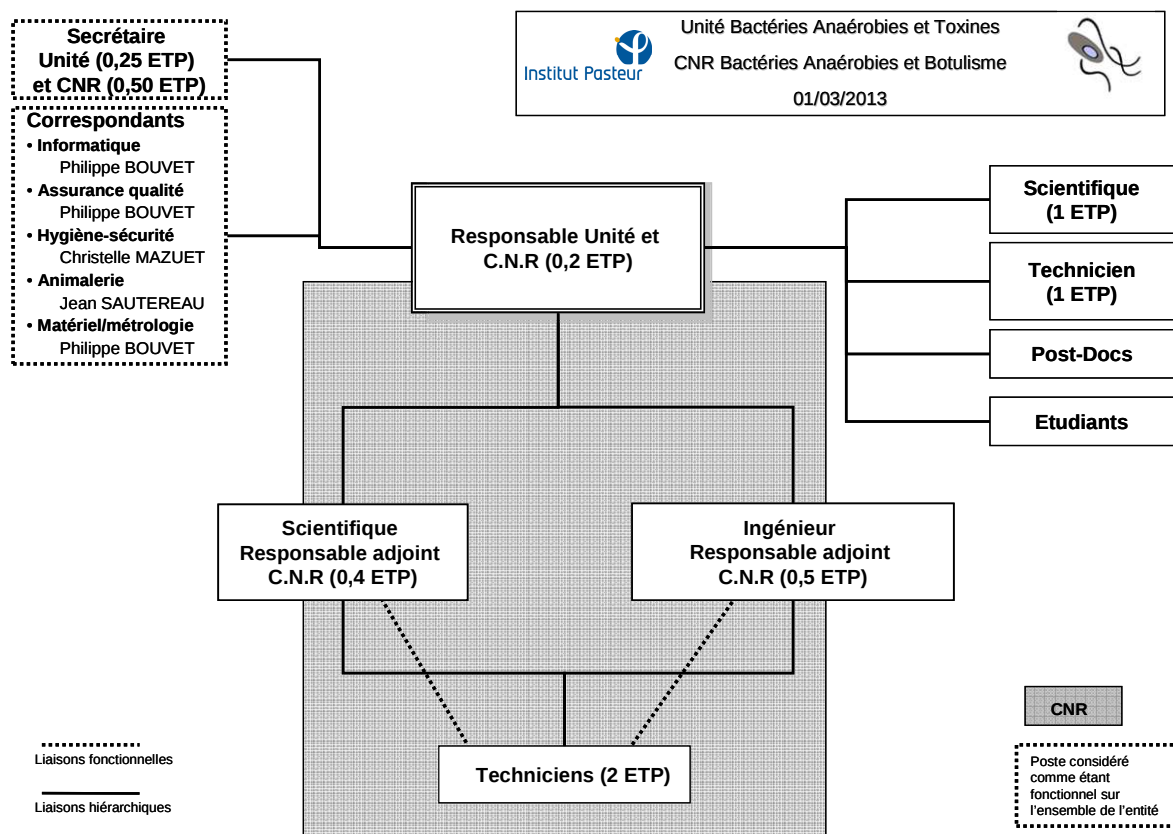
- Effectif actuel de la structure de Recherche et du CNR

	Scientifiques / Biologistes	Ingénieur	Technicien(ne)s	Agent Technique	Administratif
Nombre de postes	3	1	3	1,25	0,75

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

Fonctions		ETP réels	ETP financés par l'InVS
Scientifiques / biologistes	Chef de laboratoire, Institut Pasteur (IP)	0,2	0,2
	Chargé de Recherche IP	0,8	0,4
Ingénieur de Recherche IP		0,5	0,5
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP		2	2
Secrétaire de Direction IP		0,5	0,25
Agent technique		1	1

L'équipe de recherche comporte en plus du personnel mentionné une étudiante en thèse et deux stagiaires post-doctoraux.



9-2-2 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.ap-hop-paris.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

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	Praticien Hospitalier	0,5	AP-HP
C. Eckert	Praticien Attachée	1	InVS
V. Lalande	Praticien Hospitalier	0,2	AP-HP
A. Petit	Technicienne	1	InVS
L. Suzon	Technicienne	0,2	Autre
Réception/secrétariat/gestion		0,2	AP-HP

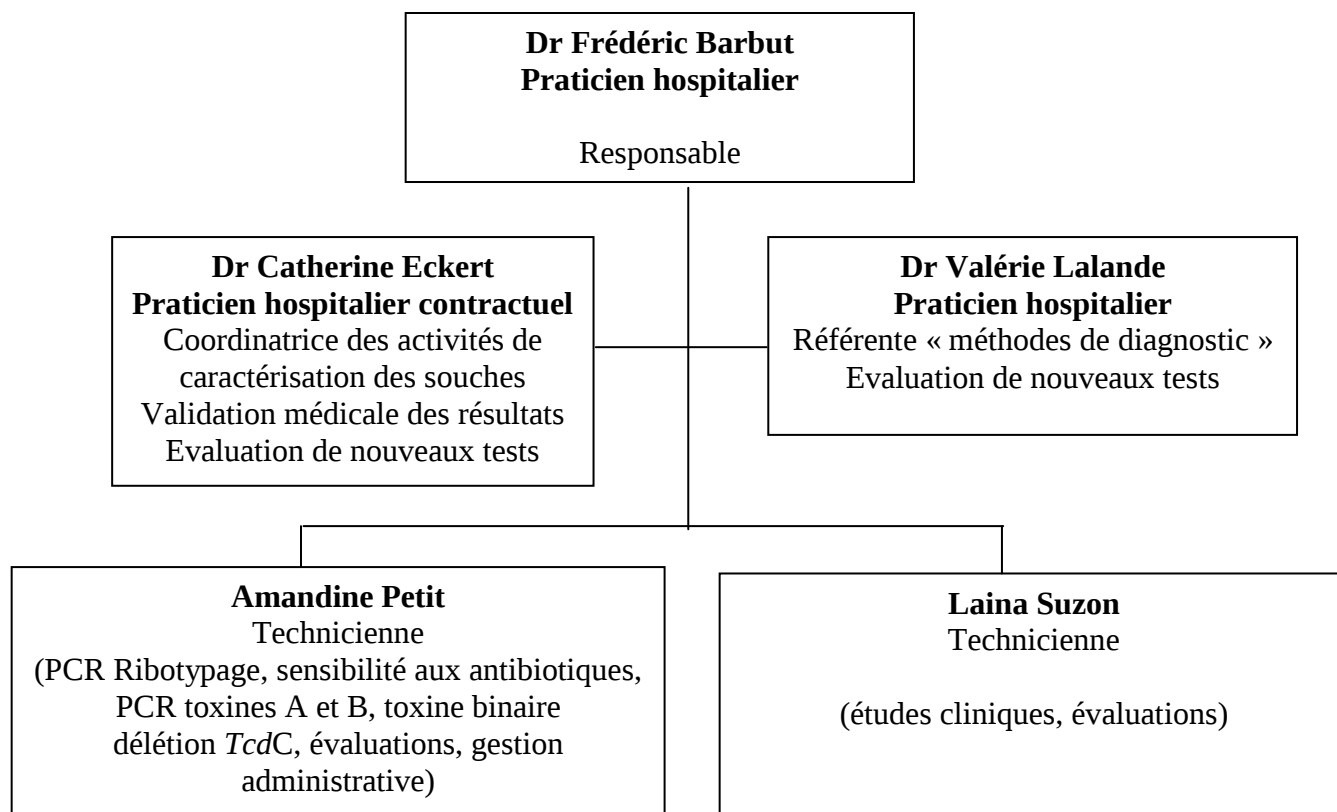
Personnel médical : 3 (ETP global : 1,7)

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.frLaboratoire 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 f.mory@chu-nancy.fr / h.tronel@chu-nancy.fr**Pr Alain Lozniewski** +33 3 83 85 18 14 ou a.lozniewski@chu-nancy.frLaboratoire 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.frLaboratoire 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****Pr Nicole Marty** +33 5 67 69 04 07 ou marty.n@chu-toulouse.fr
Dr Laurent Cavalié +33 5 67 69 03 93 ou cavaliel@chu-toulouse.frLaboratoire de Bactériologie-Hygiène
CHU de Toulouse
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
31059 Toulouse Cédex 9 TSA 40031**Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes*****Pr Ruimy** ruimy.r@chu-nice.fr**Dr Luce Landraud** +33 4 92 03 62 20 ou landraud.l@chu-nice.frLaboratoire de Bactériologie (+33 4 92 03 62 14)
Hôpital de l'Archet
151 route de Saint Antoine de Ginestière BP 3079
06202 Nice cedex 3**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.frCNR 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)

*Le laboratoire expert de Nice a cessé son activité d'expertise sur *Clostridium difficile* le 20 octobre 2013. L'activité a été récupérée dans son intégralité par le laboratoire associé.

Organigramme du laboratoire associé



9-3 Locaux et équipements

9-3-1 Locaux

9-3-1-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Le CNR Bactéries anaérobies et Botulisme a emménagé dans ses nouveaux locaux situés au rez-de-chaussée du bâtiment Guérin en avril 2008. L'unité BAT est située au 1^{er} étage du même bâtiment.

Locaux du CNR (rez-de-chaussée)

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

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

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

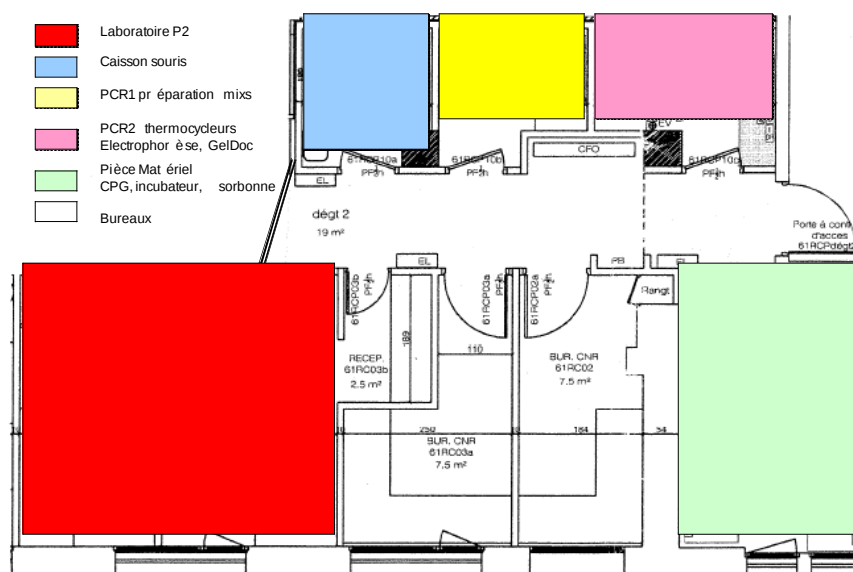


Figure : plan des locaux du CNR (rez-de-chausséedu bâtiment Guérin, Institut Pasteur)

Locaux de l'unité BAT

Rez-de-chaussée

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

1er étage

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

9-3-1-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile***Locaux**

Le plan du service est représenté sur la figure 1.

Localisation :

Service de Bactériologie 10^{ème} étage

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

GRCn°2 Epidiff

Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, UPMC, Paris VI

Site Saint-Antoine 27, rue Chaligny 75571 Paris Cedex 12.

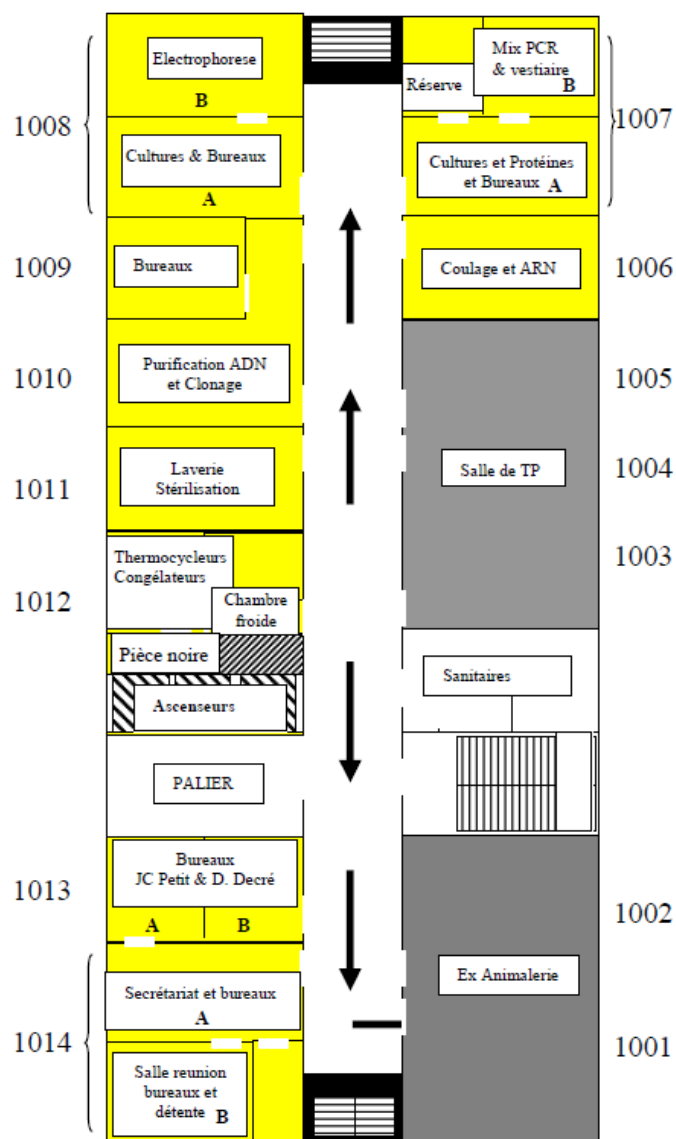


Figure 1 : plan des locaux (en jaune : pièces Bactériologie; en gris : pièces autres).

9-3-2 Equipements

9-3-2-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

MATERIEL, EQUIPEMENT DE LA STRUCTURE :

Equipements de base pour la bactériologie anaérobie comprenant entre autres :

- équipements de base de bactériologie standard
- jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system).
- enceinte anaérobie.
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.
- Enceinte climatique à 37°C.
- Microscope.
- Centrifugeuses
- Bains-marie et blocs chauffants.
- Réfrigérateurs, congélateurs (-20°C).
- chromatographes en phase gazeuse pour l'identification des métabolites et des acides gras cellulaires des bactéries anaérobies.
- containers d'azote liquide et congélation -80°C pour la conservation des souches de référence et des isolats.

Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

- appareils d'amplification génique : PCR standard (2 appareils) et PCR-temps réel (2 appareils). Hottes à PCR
- cuves d'électrophorèse et générateurs
- Lecteur analyseur d'image (GelDoc 2000, BioRad).
- séquençage et clonage d'ADN.
- hybridation ADN/ADN.
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech) (acquis en 2008).

Equipement de culture cellulaire :

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

Equipement de biochimie :

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

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

Laboratoire de préparation commun aux autres unités hébergées dans le bâtiment

Animalerie

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

Plateformes techniques du campus de l'Institut Pasteur dont nous sommes utilisateurs
Séquenceur automatique d'ADN, microséquençage de protéines, microscopie électronique et confocale, cytométrie de flux, PF8, PF5.

9-3-2-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

- 1 Centrifugeuse 5430R Eppendorf
- 1 Mini Centrifugeuse de paillasse (Extra Gen Bleu)
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)
- 2 Etuves 37°C (Jouan et Memmert)
- 2 Balances
- 1 Agitateur magnétique chauffant (Bioblock)
- 5 Cuves électrophorèse BioRad et 4 Cuves Mupid-EX
- 1 Lecteur analyseur d'image (Biorad)

- 1 Hotte PCR
- 1 Congélateur -20°C (Siemens)
- 3 Réfrigérateurs-congélateurs
- 2 Congélateur -80°C (Froilabo, Jouan)
- 1 Bain-Marie (Julabo)
- 1 Balance de précision (Sartorius)
- 1 Agitateur de microplaque (Labnet)
- 3 Thermocycleurs (2 Applied 9700 + 1 Applied 2720)
- 2 Becs chauffant
- 5 Vortex
- 2 Bain-sec chauffant
- 1 Bain-sec (thermomix Bioer)
- 1 Microscope
- 1 Electrophorèse champs pulsé (Gene Path, BioRad)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)

9-4 Démarche qualité

9-4-1 CNR Bactéries anaérobies et botulisme

Démarche qualité du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2013

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 2013 :

Paris/Lyon :

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

Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab

Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe Diphtheriae, CNR Virus Influenzae et CNR Rage)

Revue de direction LREMS

Inclusion de la vague 2 (CNR Hantavirus, CNR FHV, CNR Listeria et CNR Méningocoques) dans la démarche d'accréditation ISO 15189

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 :

Paris :

Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe Diphtheriae, CNR Virus Influenzae et CNR Rage) par le COFRAC

Guyane :

Audit initial d'accréditation ISO 15189 du Laboratoire associé au CNR des Arbovirus

Perspectives 2014 :

Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars 2014

Revue de direction LREMS : 8 Avril 2014

Poursuite du groupe de travail technique pour les validations de méthode : Juin et octobre 2013

Finalisation dossiers de validation de méthode (1^{ère} et 2^{ème} vagues) : Juin 2014

Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014.

Perspectives 2015-2016 :

Dans le cadre de l'extension du périmètre d'accréditation ISO 15189 du LREMS, une 3^{ème} et dernière vague sera incluse avec pour objectif de participer à l'évaluation de fin 2015 avec une décision d'accréditation début 2016.

La vague 3 est composée de: CNR des Mycoses invasives et anti-fongiques, CNR des *E. Coli*,

Shigelles et Salmonelles, CNR des Vibrions et du Choléra, **CNR des Bactéries anaérobies et du botulisme**, CNR des Papillomavirus, CNR de la Peste et autres yersinioles, Plate Forme de Génomique des pathogènes.

En préparation à l'intégration au sein du périmètre d'accréditation de ces entités, celles-ci suivront le plan d'action qualité et participeront aux groupe de travail technique dans l'objectif de valider leurs méthodes (juin 2015).

9-4-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

- Les modes opératoires et les procédures utilisés par le laboratoire associé et les laboratoires experts ont été rédigés et validés.

- Un **contrôle de qualité** a été réalisé au début de l'année 2013 (envoi d'une souche de PCR-ribotype défini (souche de PCR-ribotype 027) à l'ensemble des **6 laboratoires experts**.

↳ La souche 027 épidémique a été **correctement identifiée** par l'ensemble des laboratoires.

- Un **contrôle de qualité** a été réalisé en 2013, pour la deuxième 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 moxifloxacine ont également été incluses dans le contrôle de qualité.

↳ Ce contrôle de qualité 2013 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 premier **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.

- Le laboratoire associé a le projet d'intégrer le laboratoire de Microbiologie et le pôle Biologie et Pathologie du groupe hospitalier HUEP (Hôpitaux Universitaires Est Parisien) (échéance 2016) et bénéficiera ainsi de tout le système qualité déjà mis en place au sein du pôle (selon la norme 15189).

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

10-1 Techniques et marqueurs disponibles

10-1-1 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 suivant:

- gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques
- gènes des toxines de *C. perfringens* : alpha, bêta1, bêta2, iota, entérotoxine, delta, epsilon, thêta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine thêta 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 »

10-1-2 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*)

10-2 Collection de souches

10-2-1 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*

10-2-2 Laboratoire associé *Clostridium difficile*

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

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

Une collection de souches de *C. difficile* correspondant aux PCR-ribotypes les plus fréquents en France est disponible (données de l'enquête ICD-RAISIN 2009). 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).

10-3 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)