

## Rapport d'activité annuel 2013



**Centre National de Référence  
des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella***

***Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques***

*et*

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

**Responsables :**

**CNR-IP :**

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

François-Xavier WEILL  
Simon LE HELLO  
Malika GOUALI  
Secrétariat

Tél : 0145688345  
Tél : 0140613724  
Tél : 0145688344  
Tél : 0145688339

[francois-xavier.weill@pasteur.fr](mailto:francois-xavier.weill@pasteur.fr)  
[simon.le-hello@pasteur.fr](mailto:simon.le-hello@pasteur.fr)  
[malika.gouali@pasteur.fr](mailto:malika.gouali@pasteur.fr)  
Télécopie : 0145688837

**Laboratoire associé (HRD) :**

Stéphane BONACORSI  
Patricia MARIANI-KURKDJIAN  
Secrétariat

Tél : 0140035792  
Tél : 0140032341  
Tél : 0140032340

[stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr](mailto:stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr)  
[patricia.mariani@rdb.aphp.fr](mailto:patricia.mariani@rdb.aphp.fr)  
Télécopie : 0140032450

|                                                                                                                                                      |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Résumé analytique .....</b>                                                                                                                       | <b>1</b> |
| <b>1/ <i>Salmonella</i>.....</b>                                                                                                                     | <b>3</b> |
| <b>1.1 Missions et organisation du CNR.....</b>                                                                                                      | <b>3</b> |
| <b>1.2 Activités d'expertise .....</b>                                                                                                               | <b>3</b> |
| 1.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2013 .....                                                                                        | 3        |
| 1.2.1.1 Liste des techniques développées et en développement.....                                                                                    | 3        |
| 1.2.1.2 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....                                                                                      | 4        |
| 1.2.2 Activités d'expertise <i>Salmonella</i> en 2013.....                                                                                           | 4        |
| 1.2.2.1 Activité de sérotypage <i>Salmonella</i> , CNR-ESS, 2009-2013 .....                                                                          | 5        |
| 1.2.2.2 Activité de typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), CNR-ESS, 2009-2013 .....                                                        | 5        |
| 1.2.2.3 Activité de typage par la méthode MLVA, CNR-ESS, 2009 à 2013 .....                                                                           | 5        |
| 1.2.2.4 Activité de typage par la méthode MLST, CNR-ESS, 2006-2013 .....                                                                             | 6        |
| 1.2.2.5 Activité de typage de <i>S. enterica</i> sérotype Typhimurium par la méthode CRISPOL, 2010-2013 ..                                           | 6        |
| <b>1.3 Activités de surveillance des <i>Salmonella</i> .....</b>                                                                                     | <b>7</b> |
| 1.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>Salmonella</i> .....                                                   | 7        |
| 1.3.1.1 Le réseau de laboratoires correspondants du CNR-ESS pour <i>Salmonella</i> .....                                                             | 7        |
| 1.3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées.....                                                                                          | 8        |
| 1.3.1.3 Analyse de la distribution des différents sérotypes et analyse des tendances .....                                                           | 8        |
| 1.3.1.3.1 Nombre annuel de souches de <i>Salmonella</i> d'origine humaine répertoriées au CNR-ESS, 1988-2013 .....                                   | 8        |
| 1.3.1.3.2 Répartition des 20 principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> , 2000, 2005, 2010, 2012-2013 ....                                            | 10       |
| 1.3.1.3.3 Proportion de souches de <i>Salmonella</i> par rapport aux fiches d'information .....                                                      | 11       |
| 1.3.1.3.4 Nombre d'isollements annuels des sérotypes Enteritidis, Typhimurium et variant monophasique 1,4,[5],12:i:- en France, 1983-2012.....       | 12       |
| 1.3.1.3.5 Répartition par sites de prélèvement des souches de <i>Salmonella</i> reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2013 .....                           | 12       |
| 1.3.1.3.6 Distribution par tranches d'âge des patients dont les souches de <i>Salmonella</i> ont été reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2013.....       | 13       |
| 1.3.1.3.7 Nombre de souches de <i>Salmonella</i> reçues au CNR-ESS par région, 2005-2013 .....                                                       | 13       |
| 1.3.1.3.8 Évaluation de la représentativité et l'exhaustivité du système de surveillance de <i>Salmonella</i> en France, 2008 .....                  | 14       |
| 1.3.1.3.9 Le sérotype Typhi en 2013 .....                                                                                                            | 16       |
| 1.3.1.3.10 Le sérotype Paratyphi A en 2013 .....                                                                                                     | 18       |
| 1.3.1.3.11 Le sérotype Paratyphi B en 2013 .....                                                                                                     | 19       |
| 1.3.1.4 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....                                                                       | 19       |
| 1.3.1.4.1 Relevés périodiques envoyés à l'InVS : .....                                                                                               | 19       |
| 1.3.1.4.2 Notifications de foyers de cas groupés à <i>Salmonella</i> signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS entre 2005 et 2013..... | 20       |
| 1.3.1.4.3 Les différents foyers de cas groupés à <i>Salmonella</i> signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS en 2013.....              | 20       |
| 1.3.2 Contribution à la surveillance de la résistance aux antibiotiques .....                                                                        | 21       |
| 1.3.2.1 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhimurium de 1993 à 2013 .....                                                                    | 21       |
| 1.3.2.2 Résistance aux antibiotiques du sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) de 2007 à 2013 .....                                                  | 23       |
| 1.3.2.3 Résistance aux antibiotiques du sérotype Enteritidis de 1993 à 2012 .....                                                                    | 24       |
| 1.3.2.4 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhi de 1997 à 2013 .....                                                                          | 25       |
| 1.3.2.5 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi A de 2005 à 2013 .....                                                                    | 26       |
| 1.3.2.6 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi B de 2000 à 2013 .....                                                                    | 27       |
| 1.3.2.7 Résistance aux antibiotiques du sérotype Agona de 2009 à 2013 .....                                                                          | 28       |
| 1.3.2.8 Résistance aux antibiotiques du sérotype Blockley en 2010-2013.....                                                                          | 28       |
| 1.3.2.9 Résistance aux antibiotiques du sérotype Brandenburg de 1997 à 2013.....                                                                     | 29       |
| 1.3.2.10 Résistance aux antibiotiques du sérotype Corvallis de 2010 à 2013 .....                                                                     | 29       |
| 1.3.2.11 Résistance aux antibiotiques du sérotype Derby de 2000 à 2013 .....                                                                         | 30       |
| 1.3.2.12 Résistance aux antibiotiques du sérotype Heidelberg de 1997 à 2013 .....                                                                    | 31       |
| 1.3.2.13 Résistance aux antibiotiques du sérotype Indiana de 2010 à 2013.....                                                                        | 32       |
| 1.3.2.14 Résistance aux antibiotiques du sérotype Infantis de 1997 à 2013.....                                                                       | 32       |

|                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3.2.15 Résistance aux antibiotiques du sérotype Kentucky de 2001 à 2013 .....                                                                          | 33        |
| 1.3.2.16 Résistance aux antibiotiques du sérotype Montevideo entre 2011 et 2013 .....                                                                    | 34        |
| 1.3.2.17 Résistance aux antibiotiques du sérotype Newport de 1997 à 2013 .....                                                                           | 34        |
| 1.3.2.18 Résistance aux antibiotiques du sérotype Virchow de 1997 à 2013 .....                                                                           | 35        |
| 1.3.2.19 Souches de <i>Salmonella</i> présentant une résistance particulière aux antibiotiques détectées au CNR-ESS en 2013 .....                        | 36        |
| 1.3.2.19.1 Souches résistantes aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération .....                                                                  | 36        |
| a- <i>Salmonella</i> productrices de bêta-lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2013 .....                                                    | 36        |
| b- <i>Salmonella</i> productrices de céphalosporinases plasmidiques reçues au CNR-ESS en 2013 .....                                                      | 37        |
| c- <i>Salmonella</i> productrices de carbapénémases reçues au CNR-ESS en 2009-2013 .....                                                                 | 38        |
| 1.3.2.19.2 Souches résistantes à la ciprofloxacine .....                                                                                                 | 38        |
| a- Souches du sérotype Typhimurium et 1,4,[5],12:i:- résistantes à la ciprofloxacine détectées au CNR-ESS entre 2002 et 2013 .....                       | 38        |
| b- Souches du sérotype Kentucky résistantes à la ciprofloxacine détectées entre 2000 et 2013 .....                                                       | 39        |
| 1.3.2.19.3 Souches de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine d'origine plasmidique en 2013 .....                                                       | 41        |
| 1.3.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux .....                                                                                      | 42        |
| 1.3.4 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux à <i>Salmonella</i> en 2013 .....                          | 42        |
| 1.3.5 Contribution à la diffusion des données de surveillance et production du CNR .....                                                                 | 46        |
| <b>2/ <i>Escherichia coli</i> .....</b>                                                                                                                  | <b>47</b> |
| <b>2.1 Missions du CNR .....</b>                                                                                                                         | <b>47</b> |
| <b>2.2 Activités d'expertise pour l'année 2013 .....</b>                                                                                                 | <b>47</b> |
| 2.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2013 .....                                                                                            | 47        |
| 2.2.2 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ESS-LA en 2013 .....                                                                    | 47        |
| 2.2.3 Bilan des activités concernant les EHEC .....                                                                                                      | 48        |
| 2.2.3.1 Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou de souches ..                                                      | 48        |
| 2.2.3.2 Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2013 .....                                                                                   | 49        |
| 2.2.3.3 Analyse sur des souches de <i>E. coli</i> d'origine humaine productrices de Shiga-toxines .....                                                  | 49        |
| 2.2.3.4 Analyse des variants des gènes <i>stx</i> .....                                                                                                  | 53        |
| 2.2.3.5 Autres facteurs de virulence .....                                                                                                               | 55        |
| 2.2.3.6 Analyse des prélèvements dans l'entourage de patients ayant un SHU .....                                                                         | 55        |
| 2.2.3.7 Sérotypage moléculaire des souches EHEC non sérotypables .....                                                                                   | 55        |
| 2.2.3.8 Sérodiagnostic des SHU .....                                                                                                                     | 57        |
| 2.2.4 Bilan des activités concernant les <i>E. coli</i> extra-intestinaux (LA-RD) .....                                                                  | 59        |
| 2.2.4.1 Etude des facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> responsables de méningites .....                                               | 59        |
| 2.2.4.2 Etude des facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> extra-intestinales responsables de pathologies autres que les méningites ..... | 59        |
| 2.2.5 Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR-ESS-LA .....                                                                             | 61        |
| <b>2.3 Activités de surveillance des <i>Escherichia coli</i> .....</b>                                                                                   | <b>62</b> |
| 2.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....                                                                           | 62        |
| 2.3.1.1 Réseau partenaire .....                                                                                                                          | 62        |
| 2.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances .....                                                                 | 62        |
| 2.3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux .....                                                                                            | 66        |
| 2.3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches EHEC .....                                                                                             | 66        |
| 2.3.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E. coli</i> responsables de pathologies extra-intestinales .....                                 | 67        |
| 2.3.3 Participation aux réseaux de surveillance .....                                                                                                    | 67        |
| 2.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS .....                                                                          | 67        |
| 2.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens .....                                                           | 68        |
| 2.3.4 Détection et investigation des cas .....                                                                                                           | 68        |
| <b>3/ <i>Shigella</i> .....</b>                                                                                                                          | <b>74</b> |
| <b>3.1 Missions et Organisation du CNR .....</b>                                                                                                         | <b>74</b> |
| <b>3.2 Activités d'expertise .....</b>                                                                                                                   | <b>74</b> |
| 3.2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2013 .....                                                                                           | 74        |

|                                                                                                                            |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.2 Activités d'expertise pour l'année 2013 .....                                                                        | 74         |
| 3.2.2.1 Inventaire global des souches reçues au CNR-ESS en 2013 .....                                                      | 74         |
| 3.2.2.2 Analyse des 673 souches reçues de France métropolitaine en 2013 .....                                              | 75         |
| 3.2.2.3 Souches reçues des DOM-TOM .....                                                                                   | 78         |
| 3.2.2.4 Souche reçue de l'Etranger .....                                                                                   | 78         |
| 3.2.2.5 Bilan des fiches d'information reçues au CNR-ESS .....                                                             | 78         |
| <b>3.3 Activités de surveillance .....</b>                                                                                 | <b>79</b>  |
| 3.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....                                             | 79         |
| 3.3.1.1 Réseau partenaire .....                                                                                            | 79         |
| 3.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances .....                                   | 79         |
| 3.3.2 Surveillance de la résistance des shigelles aux anti-infectieux .....                                                | 81         |
| 3.3.2.1 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de <i>Shigella</i> .....                                      | 81         |
| 3.3.2.1.1 Surveillance globale .....                                                                                       | 81         |
| 3.3.2.1.3 Résistances émergentes chez <i>Shigella</i> spp .....                                                            | 85         |
| 3.3.3 Participation aux réseaux de surveillance .....                                                                      | 87         |
| 3.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS .....                                            | 87         |
| 3.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux .....                                                      | 87         |
| 3.3.4 Détection et investigation des cas .....                                                                             | 87         |
| 3.3.4.1 Epidémie à <i>Shigella sonnei</i> dans le Val d'Ariège en août 2013 .....                                          | 87         |
| 3.3.4.2 Cas groupés à <i>Shigella flexneri</i> 1c dans une communauté des gens du voyage .....                             | 88         |
| 3.3.4.3 Epidémie à <i>S. sonnei</i> en Ile de France (septembre 2013 – heure actuelle) .....                               | 88         |
| <b>4/ Alerte .....</b>                                                                                                     | <b>90</b>  |
| <b>5/ Activités d'information, de formation et de conseil .....</b>                                                        | <b>91</b>  |
| 5.1 Réunions et missions .....                                                                                             | 91         |
| 5.2 Enseignement / formation .....                                                                                         | 91         |
| 5.3 Accueil de stagiaires .....                                                                                            | 92         |
| 5.4 Congrès .....                                                                                                          | 94         |
| 5.5 Information et conseil aux biologistes et praticiens .....                                                             | 94         |
| <b>6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR-ESS-LA .....</b>                          | <b>95</b>  |
| <b>6.1 Activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR. ....</b> | <b>95</b>  |
| 6.1.1 <i>E. coli</i> .....                                                                                                 | 95         |
| 6.1.2 <i>Shigella</i> .....                                                                                                | 96         |
| 6.1.2.1 Génétique et génomique évolutive de <i>Shigella</i> .....                                                          | 96         |
| 6.1.2.2 Génomique épidémiologique de <i>S. sonnei</i> .....                                                                | 97         |
| 6.1.2.3 Etude de la structure des populations et suivi de clones internationaux de <i>S. flexneri</i> .....                | 97         |
| 6.1.2.4 Etude de l'évolution génomique de <i>S. dysenteriae</i> de type 1 .....                                            | 97         |
| 6.1.2.5 Méthodes de typage des souches de <i>Shigella</i> .....                                                            | 98         |
| 6.1.3 <i>Salmonella</i> .....                                                                                              | 99         |
| 6.1.3.1 Contribution au développement de nouvelles méthodes de typage et sous-typage .....                                 | 99         |
| 6.1.3.1.1 La méthode MLST .....                                                                                            | 100        |
| 6.1.3.1.2 Inventaire des séquences des gènes codant pour les antigènes flagellaires H .....                                | 100        |
| 6.1.3.1.3 Etude du polymorphisme des régions CRISPR .....                                                                  | 100        |
| 6.1.3.1.4 Génomique épidémiologique .....                                                                                  | 101        |
| 6.1.3.1.5 Etude du polymorphisme des régions CRISPR chez <i>S. enterica</i> sérotype Typhimurium ...                       | 102        |
| 6.1.3.1.6 Etude de la coévolution entre les régions CRISPR et le core genome .....                                         | 102        |
| 6.1.3.1.7 Génomique évolutive de différents sérotypes de <i>Salmonella</i> .....                                           | 102        |
| 6.1.3.2. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>Salmonella</i> .....                                 | 103        |
| <b>6.2 Liste des publications et communications 2013 pour le CNR-ESS-LA .....</b>                                          | <b>104</b> |
| 6.2.1 Publications nationales .....                                                                                        | 104        |
| 6.2.2 Publications internationales .....                                                                                   | 104        |
| 6.2.3 Communications internationales .....                                                                                 | 107        |
| 6.2.4 Conférences sur invitation .....                                                                                     | 107        |



|                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....</b> | <b>108</b> |
| <b>7.1 <i>Salmonella</i>.....</b>                                                                          | <b>108</b> |
| <b>7.2 <i>Escherichia coli</i> .....</b>                                                                   | <b>108</b> |
| <b>8/ Programme d'activités 2013-2015.....</b>                                                             | <b>110</b> |
| <b>8.1 Apporter une expertise microbiologique .....</b>                                                    | <b>110</b> |
| 8.1.1 Infections à <i>E. coli</i> .....                                                                    | 110        |
| 8.1.1.1 Infections à <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques.....                                              | 110        |
| 8.1.1.2 <i>E. coli</i> responsables d'infections extra-intestinales .....                                  | 111        |
| 8.1.2 Infections à <i>Shigella</i> .....                                                                   | 112        |
| 8.1.3 Infections à <i>Salmonella</i> .....                                                                 | 113        |
| <b>8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique .....</b>                                              | <b>115</b> |
| <b>8.3 Contribuer à l'alerte .....</b>                                                                     | <b>118</b> |
| <b>ANNEXE 1 .....</b>                                                                                      | <b>119</b> |
| <b>Annexe 1. Missions et organisation du CNR.....</b>                                                      | <b>119</b> |
| <b>1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR .....</b>                                                      | <b>119</b> |
| <b>1.2 Les équipes.....</b>                                                                                | <b>121</b> |
| 1.2.1 Le CNR-ESS : Effectif / Qualification du Personnel .....                                             | 121        |
| 1.2.2 Le laboratoire associé (LA-RD) : Effectif / Qualification du Personnel.....                          | 123        |
| <b>1.3 Les locaux et équipements.....</b>                                                                  | <b>123</b> |
| 1.3.1 CNR-ESS (Institut Pasteur) .....                                                                     | 123        |
| 1.3.2 LA-RD .....                                                                                          | 126        |
| <b>1.4 Démarche qualité .....</b>                                                                          | <b>127</b> |
| <b>ANNEXE 2 .....</b>                                                                                      | <b>128</b> |
| <b>Annexe 2. Capacités techniques du CNR.....</b>                                                          | <b>128</b> |
| <b>2.1 Pour <i>Salmonella</i> .....</b>                                                                    | <b>128</b> |
| 2.1.1 Liste des techniques de référence.....                                                               | 128        |
| 2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles.....                                                | 129        |
| 2.1.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence .....                                 | 130        |
| 2.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR.....                                                    | 130        |
| <b>2.2 Pour <i>Escherichia coli</i> .....</b>                                                              | <b>131</b> |
| 2.2.1 Liste des techniques de référence.....                                                               | 131        |
| 2.2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles.....                                                | 134        |
| 2.2.3 Collection de souches.....                                                                           | 134        |
| 2.2.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS-LA.....                                                       | 135        |
| <b>2.3 Pour <i>Shigella</i> .....</b>                                                                      | <b>136</b> |
| 2.3.1 Liste des techniques de référence.....                                                               | 136        |
| 2.3.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles.....                                                | 137        |
| 2.3.3 Collection de souches.....                                                                           | 138        |
| 2.3.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS .....                                                         | 138        |
| <b>2.4 Sélection de 10 publications représentatives de l'année 2013.....</b>                               | <b>139</b> |

## SOMMAIRE FIGURES

---

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Nombre annuel de souches de <i>Salmonella</i> d'origine humaine, CNR-ESS, 1988-2013.....                | 8  |
| <b>Figure 2.</b> Répartition des souches de <i>Salmonella</i> et des fiches d'information au CNR-ESS, 2000-2013 .....    | 9  |
| <b>Figure 3.</b> Evolution des principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> isolés chez l'homme 1983-2013 .....             | 12 |
| <b>Figure 4.</b> Exhaustivité/représentativité régionale du réseau du CNR-ESS .....                                      | 15 |
| <b>Figure 5.</b> Evolution du nombre de souches du sérotype Kentucky détectées au CNR-ESS .....                          | 39 |
| <b>Figure 6.</b> Répartition géographique des demandes par département .....                                             | 48 |
| <b>Figure 7.</b> Répartition des différents sérogroupes de EHEC isolés en 2013 .....                                     | 50 |
| <b>Figure 8.</b> Distribution des différents profils de virulence des souches EHEC isolées en 2013 .....                 | 51 |
| <b>Figure 9.</b> Evolution de l'activité du CNR-ESS pour <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> de 2006 à 2013.....           | 61 |
| <b>Figure 10.</b> Prévalence en fonction de l'âge et du sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive .....     | 63 |
| <b>Figure 11.</b> Répartition régionale des EHEC en 2013 .....                                                           | 65 |
| <b>Figure 12.</b> Répartition départementale des EHEC en 2013 .....                                                      | 65 |
| <b>Figure 13.</b> Répartition par département du nombre de sérologies <i>E. coli</i> en 2013.....                        | 66 |
| <b>Figure 14.</b> Electrophorèse en champ pulsé des EHEC O91.....                                                        | 69 |
| <b>Figure 15.</b> Electrophorèse en champ pulsé des EHEC O26 .....                                                       | 70 |
| <b>Figure 16.</b> Electrophorèse en champ pulsé des EHEC O157:H- .....                                                   | 72 |
| <b>Figure 17.</b> Electrophorèse en champ pulsé de <i>E. coli</i> responsables d'une IBTT .....                          | 73 |
| <b>Figure 18.</b> Répartition par département du nombre de <i>Shigella</i> reçues en 2013 .....                          | 80 |
| <b>Figure 19.</b> Distribution globale des sérogroupes de <i>Shigella</i> reçues au CNR-ESS depuis 2007 .....            | 81 |
| <b>Figure 20.</b> Evolution des résistances aux antibiotiques de <i>Shigella</i> spp de 2008 à 2013 .....                | 83 |
| <b>Figure 21.</b> Analyse des tendances des résistances à l'amoxicilline et au cotrimoxazole chez <i>S. sonnei</i> ..... | 84 |
| <b>Figure 22.</b> Evolution du nombre de <i>Shigella</i> CIP <sup>R</sup> au CNR-ECS entre 2005 et 2013 .....            | 86 |
| <b>Figure 23.</b> Electrophorèse en champ pulsé de <i>S. sonnei</i> (Ile de France, 2013-2014).....                      | 89 |

## Résumé analytique

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2012, le CNR des *Salmonella* et le CNR des *Escherichia coli* et *Shigella* ne forment plus qu'un seul CNR, celui des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS).

Le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Robert Debré, Paris (LA-RD) demeure le laboratoire associé au CNR pour les activités *E. coli*.

Dans le présent rapport, le terme CNR-ESS-LA sera utilisé pour décrire des activités ou des données communes aux deux laboratoires et les termes CNR-ESS et LA-RD seront utilisés séparément pour décrire les activités spécifiques de chacun des laboratoires.

---

### *Salmonella*

Au cours de l'année 2013, le CNR-ESS a enregistré 10867 isollements humains de *Salmonella* en France, dont 10273 en France métropolitaine et 594 dans les départements et territoires d'outre-mer et à Monaco. Parmi ces isollements, 9131 (contre 8870 en 2012) ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et 1736 (contre 1768 en 2012) provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

L'année 2013 a également été marquée par l'investigation microbiologique de 3 épidémies hospitalières, 6 épidémies régionales ou nationales entraînant le retrait-rappel d'aliments contaminés, d'une épidémie à *S. enterica* sérotype Paratyphi A chez les voyageurs de retour du Cambodge et pour la réponse aux sollicitations européennes dans le cadre d'augmentation de cas de salmonelloses à l'échelon de plusieurs états membres.

Le système de surveillance du CNR-ESS a permis de suivre l'émergence du clone de *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 résistant à la ciprofloxacine et la détection de *Salmonella* spp. résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ou aux carbapénèmes.

---

### *E. coli*

Avec 1124 souches reçues en 2013, le CNR-ESS a vu son activité augmenter de 7 % par rapport à 2012.

Le CNR-ESS a reçu moins de prélèvements de selles et de sérums mais plus de souches comme en témoignent les résultats ci-dessous :

- Souches : + 25,3 % (1124 en 2013 versus 897 en 2012)
- Selles : - 5,8 % (736 en 2013 versus 781 en 2012)
- Sérums : - 6,5 % (434 en 2013 versus 464 en 2012)

L'année 2013 a été marquée par une épidémie à *E. coli* entérohémorragique O157:H- liée à la consommation de camembert au lait cru survenue dans l'ouest de la France en mai ainsi que de l'augmentation du nombre de cas d'infections à EHEC O26.

## ***Shigella***

Durant l'année 2013, le CNR-ESS a reçu 769 souches de *Shigella* d'origine humaine dont 664 isolées en France métropolitaine et 105 souches des DOM-TOM soit une augmentation de 12% par rapport à 2012 (688 souches).

De plus, 183 fiches d'information correspondant à 178 patients ont été envoyées au CNR-ESS pour signaler une infection à *Shigella*. Parmi les 178 patients, 164 avaient eu un isolement de *S. sonnei* et 14 de *S. flexneri*.

En compilant les souches et les fiches d'informations, un total de 947 souches de *Shigella* a été répertorié au CNR-ESS en 2013.

Au niveau épidémiologique, l'année 2013 a été marquée par deux épidémies majeures toutes deux à *Shigella sonnei* biotype g, l'une dans le département de l'Ariège au cours d'un festival de musique, l'autre en Ile de France dans des écoles confessionnelles.

*Salmonella*

# **1/ *Salmonella***

## **1.1 Missions et organisation du CNR**

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

## **1.2 Activités d'expertise**

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

### **1.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2013**

#### **1.2.1.1 Liste des techniques développées et en développement**

Le **sérotypage classique par agglutination** reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2600 sérotypes. De nombreuses techniques moléculaires permettent de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique. Ces techniques prennent une place de plus en plus importante au CNR. Il s'agit de :

- **L'analyse MLST** (Multilocus sequence typing). Cette méthode est basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes conservés (dits gènes de ménage) après amplification génique. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 2317 souches de *Salmonella* (consultée le 25 mars 2014) appartenant aux sous-espèces I ou *enterica* (n=1765), II ou *salamae* (n=227), IIIa ou *arizonae* (n=51), IIIb ou *diarizonae* (n=165), IV ou *houtenae* (n=63) et VI ou *indica* (n=15) de l'espèce *enterica* et à l'espèce *bongori* (n=31), couvrant 654 sérotypes. Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute (ERI) de Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman et al. PloS Pathogens 2012).

- **Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB***. Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 1041 souches (consultée le 25 mars 2014) qui ont été analysées simultanément pour leur contenu allélique des gènes *fliC* et/ou *fliB* et pour leurs types MLST.

- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 7100 spacers différents ont été décrits par cette méthode ; ils sont accessibles sur le site web dédié (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Cette méthode originale a été mise au point au CNR-ESS (Fabre L et al. PloS One 2012). Au 25 mars 2014, le CNR-ESS avait inventorié les CRISPR types de 1465 souches appartenant à 208 sérotypes. Il existe une corrélation nette entre sérotype, CRISPR type, lysotype et MLST type.

Ces techniques moléculaires pré-citées sont corrélées au sérotypage classique, et de plus peuvent permettre de **sous-typer les souches**. Deux applications ont été développées au CNR :

- **L' analyse MLVA** (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour les sérotypes Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011). Des schémas MLVA pour les sérotypes Enteritidis, Derby, Dublin, Typhi, Paratyphi A et Newport existent et/ou sont en cours de validation et/ou d'harmonisation.
- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques basée sur le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein par le CNR-ESS en 2009, repose sur la détection de 68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes (68 spacers et 4 variants de spacers) fixées sur des microbilles grâce à la technologie xMAP de Luminex®. Cette technique est utilisée en temps réel pour le sérotype Typhimurium depuis le 01 janvier 2014 et en 1<sup>ère</sup> intention pour toute investigation de ce même sérotype ainsi qu'à ses variants monophasiques et immobiles. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 799 profils différents obtenus après analyse de 8793 souches (au 25 mars 2014).

#### 1.2.1.2 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- **L' analyse MLVA** pour le sérotype Typhimurium est standardisée et harmonisée depuis 2011. Le CNR-ESS aide à la mise en place et à l'harmonisation de cette technique pour les laboratoires français et étrangers sur demande.
- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques est utilisée en routine au CNR-ESS et au Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES, Maisons- Alfort). Cette technique a également été transférée à l'ERI de Cork dans le cadre d'une collaboration scientifique.

#### 1.2.2 Activités d'expertise *Salmonella* en 2013

Le CNR-ESS a réalisé le sérotypage systématique de la totalité des souches de *Salmonella* reçues des laboratoires collaborateurs de son réseau et a enregistré les informations envoyées par les laboratoires collaborateurs ayant sérotypé localement leurs souches.

En 2013, le CNR-ESS a enregistré **10867** isollements humains de *Salmonella* en France, dont 10273 en France métropolitaine et 594 dans les départements et territoires d'outre-mer et à Monaco. Parmi ces isollements, **9131** (contre 8870 en 2012) ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et 1736 (contre 1768 en 2012) provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

Le CNR-ESS a également réalisé le sérotypage de **441** souches de *Salmonella* dans le cadre de collaborations internationales (Côte d'Ivoire, Luxembourg, Niger, Nigeria et Nouvelle-Zélande). Il a également réalisé le sérotypage de **207** souches non humaines isolées chez l'animal, dans des aliments ou dans l'environnement, en France (majoritairement Institut Pasteur de Guadeloupe).

Il est à noter que 112 souches envoyées pour sérotypage de *Salmonella* se sont avérées être des bactéries autre que *Salmonella* (non comptabilisées).

### 1.2.2.1 Activité de sérotypage *Salmonella*, CNR-ESS, 2009-2013

|                                                                                               | <b>2009</b> | <b>2010</b> | <b>2011</b>  | <b>2012</b>  | <b>2013</b>  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Souches</b> d'origine humaine reçues au CNR et sérotypées                                  | 7464        | 7463        | 8849         | 8870         | 9131         |
| <b>Fiches d'information</b> sur les souches d'origine humaine sérotypées par les laboratoires | 2483        | 1942        | 2220         | 1768         | 1736         |
| <b>Total souches d'origine humaine</b>                                                        | <b>9947</b> | <b>9405</b> | <b>11069</b> | <b>10638</b> | <b>10867</b> |

### 1.2.2.2 Activité de typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), CNR-ESS, 2009-2013

| Année                                                  | <b>2009</b> | <b>2010</b> | <b>2011</b> | <b>2012</b> | <b>2013</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Nombre de souches de <i>Salmonella</i> typées par PFGE | 564         | 403         | 251         | 205         | 257         |

Cette activité, initiée en 2003, est variable d'une année sur l'autre en fonction des investigations d'épidémies et des travaux de recherche. Le CNR-ESS utilise les conditions de migration et le marqueur préconisés par le protocole PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) ce qui permet de comparer les profils entre les laboratoires sur le plan national (notamment avec l'ANSES dans le cadre de la comparaison des souches humaines et non humaines) et international.

### 1.2.2.3 Activité de typage par la méthode MLVA, CNR-ESS, 2009 à 2013

| Année                                                  | <b>2009</b> | <b>2010</b> | <b>2011</b> | <b>2012</b> | <b>2013</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Nombre de souches de <i>Salmonella</i> typées par MLVA | 138         | 280         | 869         | 113         | 43          |

Cette méthode a été mise en route au CNR-ESS pour le sérotype Typhimurium en 2005 et pour le sérotype Enteritidis en 2006. Elle a été validée sur une collection de souches représentatives de la biodiversité et bien caractérisées sur le plan épidémiologique. Cette méthode implique la caractérisation de 5 loci (par PCR et électrophorèse capillaire) par souche analysée. Le CNR-ESS est impliqué dans la standardisation et l'harmonisation de cette technique à l'échelle internationale. L'emploi de cette technique pour le sérotype Typhimurium est en constante diminution du fait de l'utilisation en premier lieu de la technique CRISPOL. Elle reste cependant indispensable lors d'investigation de populations homogènes en PFGE et CRISPOL.



#### 1.2.2.4 Activité de typage par la méthode MLST, CNR-ESS, 2006-2013

La technique de Multilocus Sequence Typing (MLST) qui consiste pour *Salmonella* en l'analyse de séquences de 7 gènes de ménage est utilisée en méthode alternative par le CCOMS dans la description du répertoire des sérotypes tels que décrits par le schéma de White-Kauffmann-Le Minor. Cette technique peut décrire plusieurs séquençotypes au sein même de certains sérotypes (dits alors polyphylétiques).

Le CNR et le CCOMS *Salmonella* ont ainsi effectué 2317 typages appartenant à 654 sérotypes différents depuis 2006.

#### 1.2.2.5 Activité de typage de *S. enterica* sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques par la méthode CRISPOL, 2010-2013

Un sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et des variants monophasiques ou immobiles de Typhimurium basée sur le polymorphisme des régions CRISPR à l'aide de la technologie xMAP de Luminex a été développée au CNR-ESS et dénommée CRISPOL. Depuis 2010, les souches humaines sont régulièrement testées dans le cadre de l'investigation et en routine.

| Année d'isolement                    | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| Nombre de souches typées par CRISPOL | 1403 | 4052 | 109  | 1152 |

Ainsi pour 2011, la totalité des 4052 souches ont été testées. Cette année 2011 servira de base épidémiologique pour la distribution des CRISPOL types (CT). Seules les souches de Typhimurium et variants nécessitant une investigation ont été testées en 2012. Une « crispolisation » en temps réel du premier semestre a été effectuée pour 2013. La base de donnée du CNR-ESS comprend un total de 799 profils CRISPOL (dont 628 confirmés et 171 en cours de confirmation par séquençage) pour 8793 souches, répartis en 680 CT pour 5142 Typhimurium et 119 CT pour 3651 variants monophasiques, principalement de sérotype 4,5,12:i:- et de rares souches immobiles de Typhimurium. Pour 2014, il est prévu de « crispoliser » en temps réel la totalité de souches de sérotype Typhimurium collectées au CNR-ESS.

## 1.3 Activités de surveillance des *Salmonella*

### 1.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *Salmonella*

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

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

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

- son ancienneté (depuis l'après-guerre),
- le nombre important et stable de LBM participants (autour de 1400),
- l'adhésion volontaire des LBM au système de surveillance des infections dues aux *Salmonella*, soit par l'envoi de souches pour sérotypage, soit par l'envoi de compte rendu de sérotypage si celui-ci a été fait dans le laboratoire expéditeur (fiche d'information).

La participation des LBM est essentielle à la surveillance des infections dues aux *Salmonella* survenant en France. Sa pérennité dans la durée est une préoccupation de tous les instants pour les biologistes du CNR-ESS: conseils techniques par téléphone ou réponse aux demandes précises des LABM (bibliographie, données épidémiologiques...). Le nombre de sérums nécessaires au sérotypage complet d'une souche de *Salmonella* (environ 200), le coût des sérums, la gestion difficile des stocks de sérums sur le plan de l'assurance-qualité et le renvoi des résultats le plus rapidement possible aux LBM fait que le CNR-ESS est une entité incontournable pour le sérotypage en routine.

**En 2013, 1280 LBM** de France métropolitaine et des départements et territoires d'outre-mer (contre 1396 en 2012) ont adressé des souches au CNR-ESS. Ils se répartissent en **328 laboratoires de centres hospitaliers** (contre 370 en 2012) envoyant 3016 souches et **952 LBM privés** (contre 1026 en 2012) envoyant 6115 souches. Le nombre de laboratoires du réseau est stable depuis 2003 (1411 laboratoires, 331 CH et 1080 LBM). Le regroupement d'activité des laboratoires qui s'est amplifié ces dernières années depuis l'ordonnance du 13 janvier 2010 (obligeant les laboratoires à être accrédité selon la norme NF EN ISO/CEI 15189) a pour conséquence une diminution des LBM en France. Cette diminution est confirmée au regard des inscriptions au CNQ en bactériologie générale (1364 laboratoires participants au CNQ *E. coli* de 2013). Ainsi en 2013, 1280 sur 1364 laboratoires ayant la capacité d'effectuer la bactériologie ont envoyé des souches au CNR-ESS (94%).

Le laboratoire spécialisé Biomnis centralise le plus grand nombre de souches transférées au CNR-ESS avec 696 souches en 2013 (contre 797 en 2012 et 999 en 2011).

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

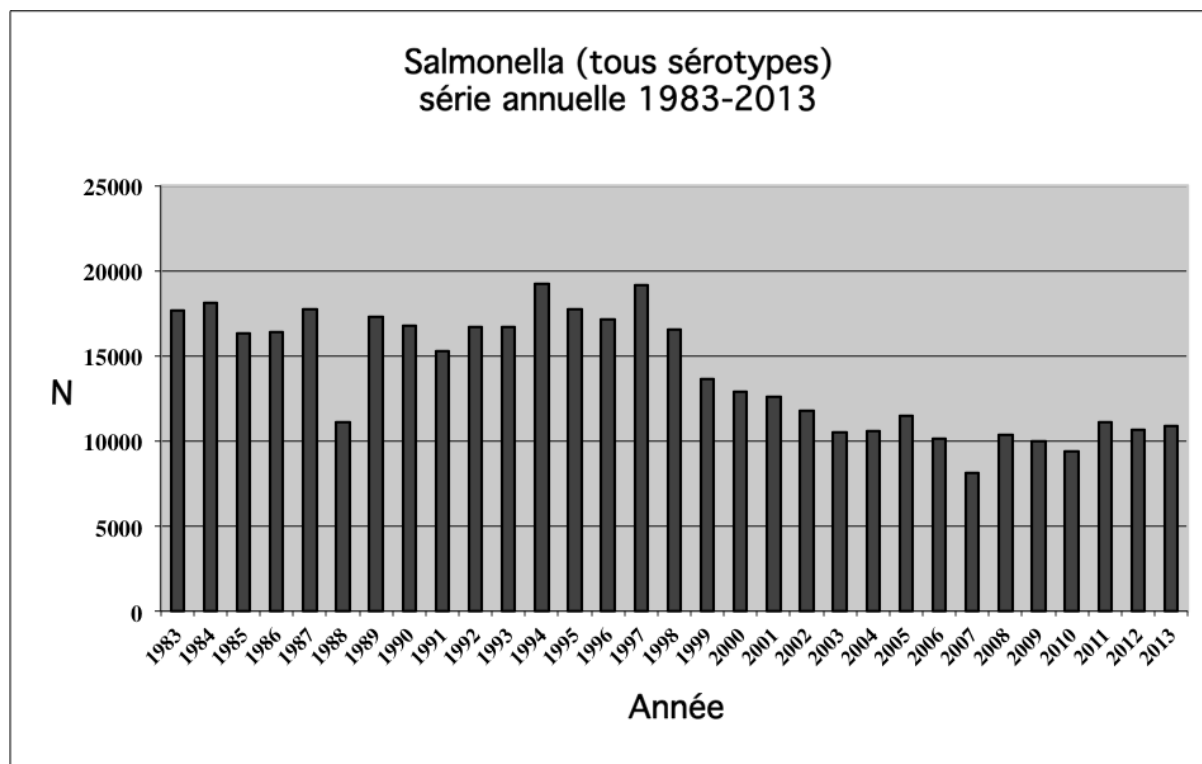
Le CNR-ESS participe à la surveillance des salmonelloses en **sérotypant toutes les souches** de *Salmonella* envoyées par les laboratoires collaborateurs et en collectant les informations sur les souches dont le sérotype a été déterminé par le laboratoire correspondant.

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

En **2013**, le CNR-ESS a enregistré **10867** isollements humains de *Salmonella* en France métropolitaine, dans les départements et territoires d'outre-mer et à Monaco. Parmi ces **10867** isollements, **9131** ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et **1736** provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

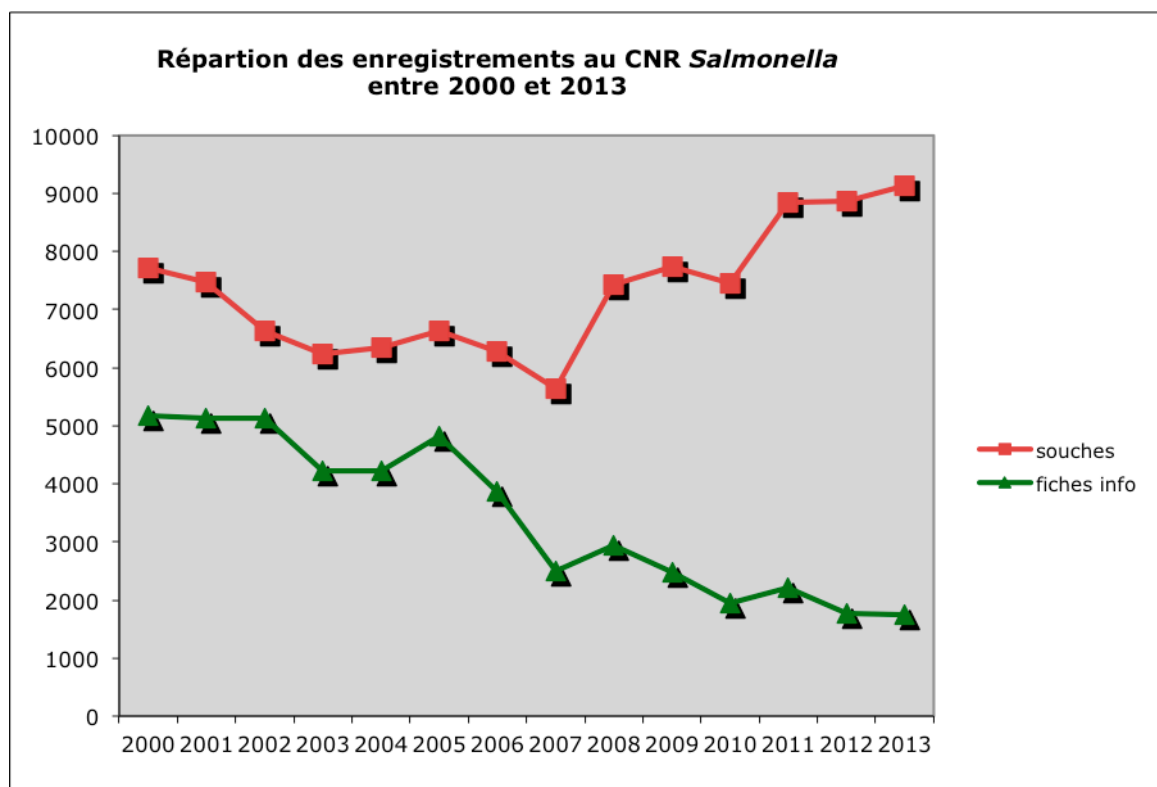
#### 1.3.1.3.1 Nombre annuel de souches de *Salmonella* d'origine humaine répertoriées au CNR-ESS, 1988-2013

**Figure 1.** Nombre annuel de souches de *Salmonella* d'origine humaine, CNR-ESS, 1983-2013



Depuis 2003, le nombre d'enregistrements de *Salmonella* au CNR-ESS est stable, autour de 10 000. Cependant, la proportion de souches reçues est en perpétuelle augmentation par rapport au nombre de fiches d'information.

**Figure 2.** Répartition des souches de *Salmonella* et des fiches d'information au CNR-ESS, 2000-2013



### 1.3.1.3.2 Répartition des 20 principaux sérotypes de *Salmonella*, 2000, 2005, 2010, 2012-2013

| Rang | Distribution des sérotypes (n) par année* |                              |                               |                               |                               |
|------|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|      | 2000                                      | 2005                         | 2010                          | 2012                          | 2013                          |
| 1    | Enteritidis (4656)                        | Typhimurium (3992)           | Typhimurium (3027)            | Typhimurium (3294)            | Typhimurium (3102)            |
| 2    | Typhimurium (3800)                        | Enteritidis (3638)           | Enteritidis (1711)            | <u>1</u> ,4,[5],12:i:- (1978) | <u>1</u> ,4,[5],12:i:- (2430) |
| 3    | Hadar (787)                               | Agona (274)                  | <u>1</u> ,4,[5],12:i:- (1098) | Enteritidis (1693)            | Enteritidis (1575)            |
| 4    | Virchow (321)                             | Infantis (210)               | Kentucky (208)                | Infantis (257)                | Infantis (206)                |
| 5    | Heidelberg (226)                          | Typhi (187)                  | Newport (191)                 | Kentucky (203)                | Derby (178)                   |
| 6    | Infantis (209)                            | Derby (158)                  | Typhi (181)                   | Derby (164)                   | Kentucky (176)                |
| 7    | Brandenburg (187)                         | Hadar (147)                  | Derby (167)                   | Panama (132)                  | Panama (137)                  |
| 8    | Derby (164)                               | Virchow (142)                | Panama (148)                  | Newport (124)                 | Typhi (134)                   |
| 9    | Typhi (152)                               | Newport (133)                | Infantis (128)                | Dublin (120)                  | Newport (130)                 |
| 10   | Newport (137)                             | Panama (124)                 | Napoli (100)                  | Oranienburg (119)             | Saintpaul (111)               |
| 11   | Panama (125)                              | <u>1</u> ,4,[5],12:i:- (101) | Dublin (81)                   | Typhi (119)                   | Bovismorbificans (104)        |
| 12   | Dublin (105)                              | Manhattan (95)               | Hadar (76)                    | Napoli (99)                   | Napoli (90)                   |
| 13   | Indiana (87)                              | Napoli (93)                  | Corvallis (70)                | Hadar (90)                    | Paratyphi A (66)              |
| 14   | Blockley (83)                             | Indiana (86)                 | Kottbus (66)                  | Virchow (73)                  | Agona (61)                    |
| 15   | <u>1</u> ,4,[5],12:i:- (75)               | Brandenburg (82)             | Virchow (66)                  | Poona (66)                    | Montevideo (61)               |
| 16   | Bredeney (63)                             | Dublin (73)                  | Saintpaul (64)                | Blockley (62)                 | Dublin (60)                   |
| 17   | Bovismorbificans (58)                     | Manhattan (62)               | Montevideo (61)               | Agona (60)                    | Virchow (60)                  |
| 18   | Livingstone (56)                          | Worthington (55)             | Rissen (60)                   | Saintpaul (60)                | Bredeney (58)                 |
| 19   | Montevideo (51)                           | Kentucky (48)                | Bovismorbificans (59)         | Rissen (56)                   | Hadar (53)                    |
| 20   | Agona (50)                                | Dublin (45)                  | Brandenburg (56)              | Muenster (53)                 | Weltevreden (51)              |

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

Depuis 2005, le sérotype prédominant est Typhimurium alors que le sérotype Enteritidis est en baisse constante pour n'occuper que la 3ème place depuis 2011. Le sérotype de formule antigénique 1,4,[5],12:i:- (variant monophasique de Typhimurium) prend une place prépondérante parmi les isoléments de salmonelles en France, en constante augmentation d'année en année depuis 2008 (principalement dû à la dissémination internationale du clone multi-résistant aux antibiotiques, 4,5,12:i:-). Le sérotype Kentucky est un sérotype émergent, associé à des souches hautement résistantes aux fluoroquinolones.

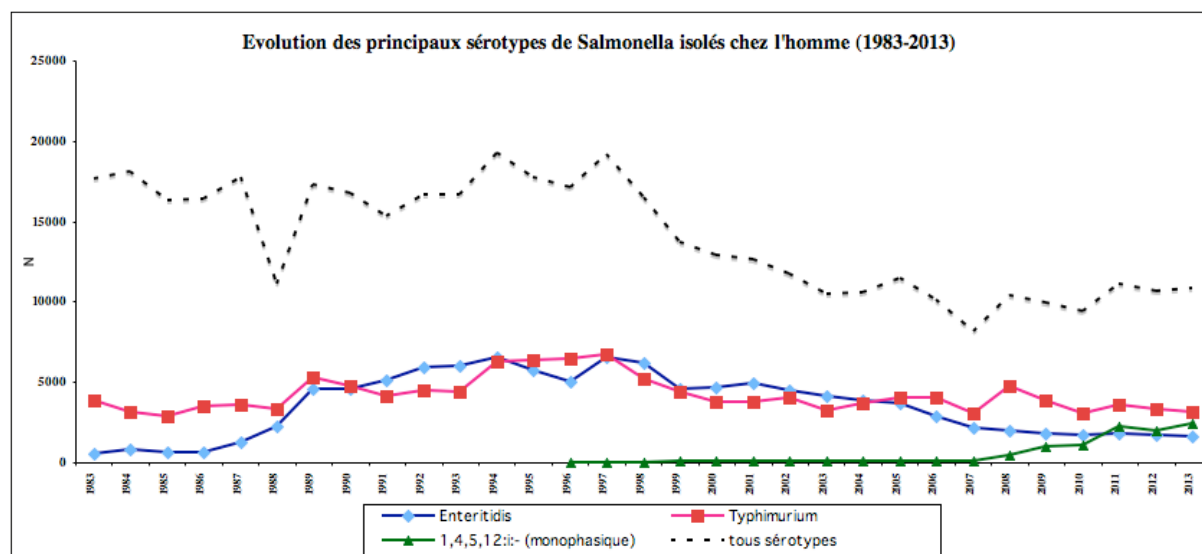
### 1.3.1.3.3 Proportion de souches de *Salmonella* par rapport aux fiches d'information

La part représentée par les fiches d'information (ou comptes-rendus de sérotypage) dans le total des isollements *Salmonella* enregistrés au CNR-ESS est en constante diminution depuis 2005. Elle ne représente en 2013 qu'un sixième des isollements enregistrés (tous sérotypes confondus) alors qu'elle était supérieure à 40% avant 2005. Les sérotypes Typhimurium et Enteritidis représentent à eux seuls 95% des fiches d'information reçues au CNR-ESS. Cette tendance est vraisemblablement liée aux coûts et à la gestion des antisérums dans le cadre d'une assurance-qualité engagée. En contrepartie, l'analyse épidémiologique en temps réel à partir des souches reçues au CNR-ESS permet d'augmenter la rapidité de détection des phénomènes anormaux.

|                                                           | Tous<br>sérotypes | Enteritidis | Typhimurium | 1,4,[5],12:i:- | Typhi |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|-------------|-------------|----------------|-------|
| Souches de <i>Salmonella</i> reçues en :                  |                   |             |             |                |       |
| 2007                                                      | 5628              | 1264        | 1632        | 122            | 120   |
| 2008                                                      | 7439              | 1183        | 2714        | 409            | 138   |
| 2009                                                      | 7464              | 1185        | 2101        | 996            | 165   |
| 2010                                                      | 7463              | 1175        | 1714        | 1098           | 162   |
| 2011                                                      | 8849              | 1265        | 2018        | 2232           | 146   |
| 2012                                                      | 8870              | 1278        | 2000        | 1969           | 118   |
| 2013                                                      | 9131              | 1227        | 1789        | 2408           | 130   |
| Compte-rendus reçus en:                                   |                   |             |             |                |       |
| 2007                                                      | 2496              | 923         | 1387        | 0              | 0     |
| 2008                                                      | 2939              | 758         | 2073        | 1              | 0     |
| 2009                                                      | 2483              | 592         | 1766        | 11             | 5     |
| 2010                                                      | 1942              | 536         | 1313        | 0              | 19    |
| 2011                                                      | 2220              | 544         | 1582        | 16             | 0     |
| 2012                                                      | 1768              | 415         | 1294        | 9              | 1     |
| 2013                                                      | 1736              | 348         | 1313        | 22             | 4     |
| Total :                                                   |                   |             |             |                |       |
| 2007                                                      | 8124              | 2187        | 3019        | 122            | 120   |
| 2008                                                      | 10378             | 1941        | 4787        | 410            | 138   |
| 2009                                                      | 9947              | 1777        | 3867        | 1011           | 170   |
| 2010                                                      | 9405              | 1711        | 3027        | 1098           | 181   |
| 2011                                                      | 11069             | 1809        | 3600        | 2248           | 146   |
| 2012                                                      | 10638             | 1693        | 3294        | 1978           | 119   |
| 2013                                                      | 10867             | 1575        | 3102        | 2430           | 134   |
| Proportion comptes-rendus de<br>sérotypage/total (%) en : |                   |             |             |                |       |
| 2007                                                      | 30,7              | 42,2        | 45,9        | 0              | 0     |
| 2008                                                      | 28,3              | 39          | 43,3        | 0,2            | 0     |
| 2009                                                      | 25                | 33,3        | 45,7        | 1,1            | 2,9   |
| 2010                                                      | 20,6              | 31,3        | 43,4        | 0              | 10,5  |
| 2011                                                      | 20                | 30,1        | 43,9        | 0,7            | 0     |
| 2012                                                      | 16,6              | 24,5        | 39,2        | 0,5            | 0,8   |
| 2013                                                      | 16,0              | 22,1        | 42,3        | 0,9            | 3,0   |

#### 1.3.1.3.4 Nombre d'isollements annuels des sérotypes Enteritidis, Typhimurium et variant monophasique 1,4,[5],12:i:- en France, 1983-2012

**Figure 3.** Evolution des principaux sérotypes de *Salmonella* isolés chez l'homme, 1983-2013



#### 1.3.1.3.5 Répartition par sites de prélèvement des souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2013

| Sites de<br>prélèvement | 2005                   | 2008                   | 2010                   | 2012                   | 2013                    |
|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                         | N (%)                  | N (%)                  | N (%)                  | N (%)                  | N (%)                   |
| Selles                  | 5659 (86,4)            | 6221 (83,6)            | 6285 (84,2)            | 7901 (89,1)            | 8127 (89,0)             |
| Sang                    | 435 (6,5) <sup>1</sup> | 453 (6,1) <sup>2</sup> | 503 (6,7) <sup>3</sup> | 480 (5,4) <sup>4</sup> | 476 (5,21) <sup>5</sup> |
| Urines                  | 204 (3,1)              | 209 (2,8)              | 285 (3,8)              | 317 (3,6)              | 368 (4,0)               |
| Pus                     | 16 (0,2)               | 10 (0,1)               | 11 (0,1)               | 10 (0,1)               | 12 (0,1)                |
| Bile                    | 5 (0,1)                | 1 (<0,1)               | 2 (<0,1)               | 3 (<0,1)               | 2 (<0,1)                |
| LCR                     | 1 (<0,1)               | 0                      | 1 (<0,1)               | 4 (<0,1)               | 4 (<0,1)                |
| Autres                  | 83 (1,2)               | 81 (1,1)               | 111 (1,5)              | 126 (1,4)              | 116 (1,3)               |
| Inconnu                 | 151 (2,3)              | 464 (6,2)              | 265 (3,6)              | 29 (0,3)               | 26 (0,3)                |

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

<sup>1</sup>Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, le pourcentage est de 4,1%.

<sup>2</sup>Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, le pourcentage est de 4,2%.

<sup>3</sup>Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 4,5%.

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

<sup>5</sup>Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,6%.

### 1.3.1.3.6 Distribution par tranches d'âge des patients dont les souches de *Salmonella* ont été reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2013

|               | <b>2005<sup>1</sup></b> | <b>2008<sup>2</sup></b> | <b>2010</b> | <b>2012</b> | <b>2013</b> |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Classes d'âge | N (%)                   | N (%)                   | N (%)       | N (%)       | N (%)       |
| <1 an*        | 586 (9)                 | 407 (5,5)               | 549 (7,4)   | 551 (6,2)   | 603 (6,6)   |
| 1-5 ans*      | 1616 (24,7)             | 1979 (26,6)             | 1928 (25,8) | 2262 (25,5) | 2349 (25,7) |
| 6-14 ans      | 913 (13,9)              | 1221 (16,4)             | 1042 (14,0) | 1240 (14,0) | 1274 (14,0) |
| 15-64 ans     | 2306 (34,7)             | 2711 (36,4)             | 2768 (37,1) | 3381 (38,1) | 3329 (36,5) |
| ≥65 ans       | 937 (14,3)              | 1005 (13,5)             | 1114 (14,9) | 1400 (15,8) | 1565 (17,1) |
| Inconnu       | 188 (2,9)               | 116 (1,6)               | 62 (0,8)    | 36 (0,4)    | 11 (0,1)    |

\*Les classes d'âge <1 an et 1-5 ans ont fait l'objet de reclassement en 2009. Ainsi, les données générées pour 2005-2009 pour ces classes d'âge annulent et remplacent les données des rapports précédents.

<sup>1</sup>Une épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Agona a été décrite en 2005 chez les enfants de moins de 1 an par consommation de poudre de lait infantile contaminée (154 cas).

<sup>2</sup>Une épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Give a été décrite en 2008 chez les enfants de moins de 1 an par consommation de poudre de lait infantile contaminée (58 cas).

### 1.3.1.3.7 Nombre de souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS par région, 2005-2013

|                             | <b>2005</b> | <b>2008*</b> | <b>2010*</b> | <b>2012*</b> | <b>2013*</b> |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Alsace</b>               | 135         | 179 (12)     | 248 (21)     | 260 (18)     | 262 (11)     |
| 67-68                       |             |              |              |              |              |
| <b>Aquitaine</b>            | 387         | 352 (2)      | 348 (2)      | 481 (5)      | 435 (2)      |
| 24-33-40-47-64              |             |              |              |              |              |
| <b>Auvergne</b>             | 135         | 149 (17)     | 152 (29)     | 214 (61)     | 206 (37)     |
| 03-15-43-63                 |             |              |              |              |              |
| <b>Bourgogne</b>            | 148         | 174 (38)     | 131 (33)     | 201 (34)     | 273 (41)     |
| 21-58-71-89                 |             |              |              |              |              |
| <b>Bretagne</b>             | 200         | 225 (16)     | 239 (22)     | 251 (14)     | 261 (19)     |
| 22-29-35-56                 |             |              |              |              |              |
| <b>Centre</b>               | 230         | 270 (0)      | 265 (31)     | 250 (0)      | 200 (2)      |
| 18-28-36-37-41-45           |             |              |              |              |              |
| <b>Champagne-Ardenne</b>    | 83          | 116 (4)      | 99 (2)       | 156 (5)      | 135 (2)      |
| 08-10-51-52                 |             |              |              |              |              |
| <b>Corse</b>                | 26          | 51 (13)      | 39 (10)      | 46 (4)       | 58 (1)       |
| 2A-2B                       |             |              |              |              |              |
| <b>Franche-Comté</b>        | 121         | 173 (21)     | 115 (15)     | 148 (29)     | 139 (20)     |
| 25-39-70-90                 |             |              |              |              |              |
| <b>Ile-de-France</b>        | 1702        | 1567 (5)     | 1422 (11)    | 1540 (10)    | 1665 (13)    |
| 75-77-78-91-92-93-94-95     |             |              |              |              |              |
| <b>Languedoc-Roussillon</b> | 248         | 421 (48)     | 372 (53)     | 613 (49)     | 663 (8)      |
| 11-30-34-48-66              |             |              |              |              |              |
| <b>Limousin</b>             | 71          | 90 (1)       | 59 (0)       | 101 (0)      | 78 (0)       |
| 19-23-87                    |             |              |              |              |              |
| <b>Lorraine</b>             | 146         | 188 (5)      | 176 (3)      | 278 (18)     | 262 (10)     |
| 54-55-57-88                 |             |              |              |              |              |
| <b>Midi-Pyrénées</b>        | 428         | 412 (7)      | 379 (13)     | 527 (8)      | 511 (3)      |
| 09-12-31-32-46-65-81-82     |             |              |              |              |              |
| <b>Nord-Pas-de-Calais</b>   | 238         | 309 (5)      | 379 (4)      | 416 (2)      | 371 (1)      |
| 59-62                       |             |              |              |              |              |
| <b>Basse-Normandie</b>      | 123         | 132 (0)      | 176 (0)      | 237 (1)      | 214 (0)      |
| 14-50-61                    |             |              |              |              |              |
| <b>Haute-Normandie</b>      | 184         | 159 (0)      | 96 (0)       | 135 (6)      | 158 (4)      |
| 27-76                       |             |              |              |              |              |
| <b>Pays de la Loire</b>     | 270         | 412 (41)     | 438 (64)     | 464 (48)     | 574 (51)     |
| 44-49-53-72-85              |             |              |              |              |              |



|                                                        |             |             |             |             |             |
|--------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Picardie</b><br>02-60-80                            | 130         | 189 (0)     | 118 (3)     | 206 (1)     | 182 (7)     |
| <b>Poitou-Charentes</b><br>16-17-79-86                 | 209         | 187 (0)     | 307 (3)     | 230 (2)     | 258 (2)     |
| <b>Provence-Alpes-Côte d'Azur</b><br>04-05-06-13-83-84 | 360         | 481 (100)   | 420 (93)    | 580 (78)    | 603 (61)    |
| <b>Rhône-Alpes</b><br>01-07-26-38-42-69-73-74          | 562         | 809 (371)   | 920 (478)   | 1005 (394)  | 1032 (360)  |
| <b>TOTAL Métropole</b>                                 | <b>6136</b> | <b>7045</b> | <b>6898</b> | <b>8339</b> | <b>8540</b> |
| Monaco                                                 | 7           | 6 (0)       | 15 (0)      | 6 (0)       | 11 (0)      |
| Guadeloupe                                             | 75          | 50 (10)     | 143 (15)    | 91 (1)      | 110 (6)     |
| Martinique                                             | 91          | 63 (4)      | 85 (10)     | 88 (11)     | 55 (7)      |
| Guyane                                                 | 116         | 123 (0)     | 175 (0)     | 164 (0)     | 242 (0)     |
| La Réunion                                             | 65          | 42 (5)      | 64 (0)      | 81 (0)      | 86 (1)      |
| Mayotte                                                | 62          | 45 (0)      | 43 (0)      | 32 (0)      | 58 (0)      |
| Polynésie Française                                    | 0           | 21 (0)      | 31 (0)      | 62 (0)      | 20 (0)      |
| St Pierre et Miquelon                                  | 0           | 0           | 1 (0)       | 1 (0)       | 1 (0)       |
| Nouvelle Calédonie                                     | 0           | 5 (0)       | 3 (0)       | 6 (0)       | 8 (0)       |

\*total des souches reçues (souches envoyées par Biomnis)

La donnée « code postal du patient » est présente pour 6884 souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS en 2013 (75,4%). Pour les 2247 souches non renseignées, le code postal du laboratoire a été pris par défaut. Depuis juillet 2008, le laboratoire Biomnis envoie systématiquement toutes les souches de salmonelles au CNR-ESS (696 souches envoyées en 2013). Ce laboratoire spécialisé collecte les souches sur le plan national et dans les DOM-TOM avec toutefois une dominance forte pour la Région Rhône-Alpes (34% des isollements de cette région), Auvergne (18%) et Provence-Alpes-Côte d'Azur (10%).

#### 1.3.1.3.8 Évaluation de la représentativité et l'exhaustivité du système de surveillance de *Salmonella* en France, 2008

En 2009, une étude collaborative entre le CNR-ESS, le Contrôle National de Qualité (CNQ) de l'ANSM (ex-Afssaps) et l'InVS a été réalisée dans le but d'évaluer la représentativité et l'exhaustivité du CNR. Un questionnaire a été adressé le 8 avril 2009 à 3375 LBM de métropole et des DOM-TOM ayant déclaré pratiquer des analyses de bactériologie générale afin de recenser les cas de salmonelloses confirmées en 2008. Les résultats majeurs qu'il faut retenir :

- Nombre total déclaré d'isolement de *Salmonella* (une souche par patient)

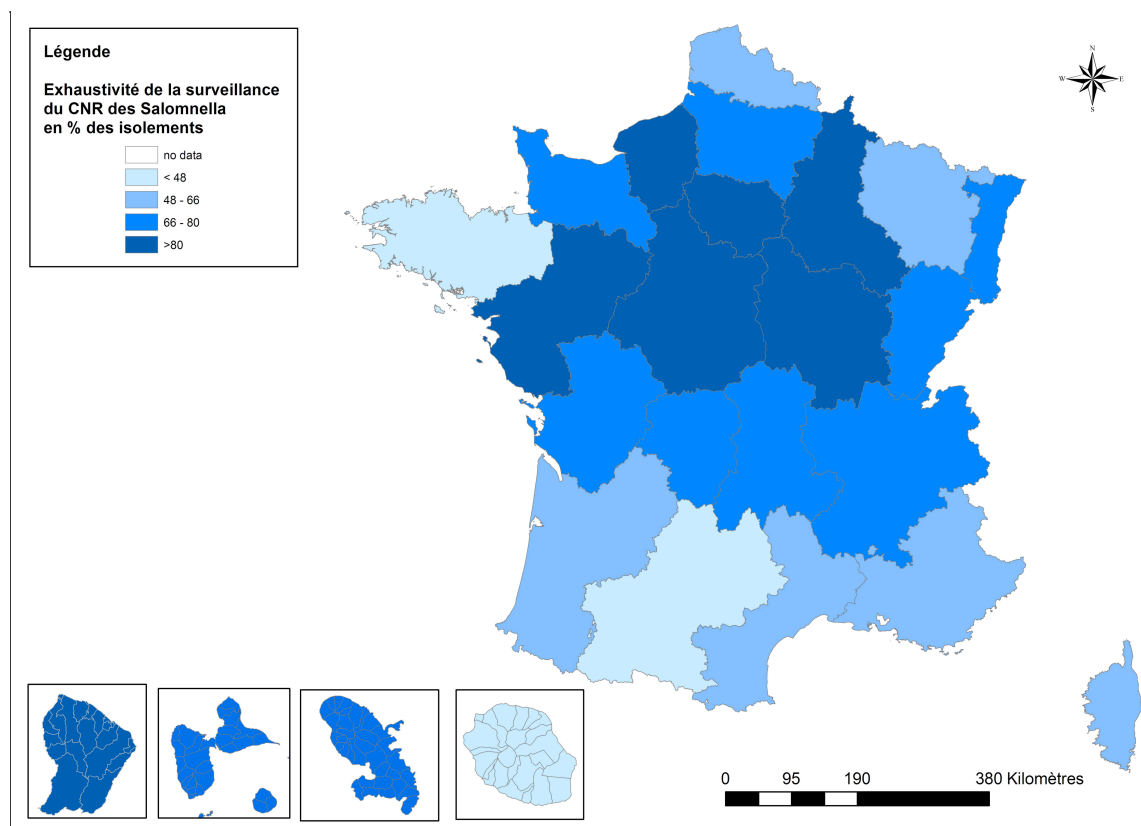
Parmi les 3217 laboratoires répondants (95,3%), 2282 ont déclaré avoir isolé au moins une souche de *Salmonella* en 2008. Au total, ces 2282 laboratoires ont déclaré avoir isolé **15665 souches de *Salmonella***, **60%** de ces souches provenant de **laboratoires privés** et près de **40%** de **laboratoires hospitaliers**.

- Exhaustivité et représentativité du CNR-ESS pour les salmonelles

Globalement, près d'une souche sur 2 (48%) isolée en France a fait objet d'un envoi au CNR et près d'une souche sur 5 (19%) isolée en France a fait objet d'une fiche reçue au CNR. Au total, **près des 2/3 des souches (66%) de *Salmonella* isolées en France ont fait l'objet d'un envoi au CNR**, soit sous forme de souches soit sous forme de fiches d'information.

| Statut<br>laboratoire | Laboratoires<br>n | Données CNQ-AFSSAPS                 |                      | Données CNR<br>souches + fiches<br>infos | Exhaustivité<br>du CNR |
|-----------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------------------|
|                       |                   | Laboratoires<br>répondants<br>n (%) | Salmonella<br>n (%)  | Salmonella<br>n (%)                      | Salmonella<br>%        |
| Hospitalier           | 389               | 376 (15,0)                          | 6138 (39,2)          | 4858 (46,7)                              | 79,1%                  |
| Privé                 | 2814              | 2117 (84,4)                         | 9467 (60,4)          | 5534 (53,3)                              | 58,5%                  |
| Autres                | 14                | 14 (0,6)                            | 60 (0,4)             | 0 (0,0)                                  | 0%                     |
| <b>TOTAL</b>          | <b>3217</b>       | <b>2507 (100,0)</b>                 | <b>15665 (100,0)</b> | <b>10392 (100,0)</b>                     | <b>66,3%</b>           |

**Figure 4.** Exhaustivité/représentativité régionale du réseau du CNR-ESS



Ces données comprennent les souches et les fiches d'information.

### 1.3.1.3.9 Le sérotype Typhi en 2013

En 2013, 134 souches de *S. enterica* sérotype Typhi isolées chez 124 patients ont été répertoriées au CNR-ESS. Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination probable de 2008 à 2013.

| Pays de contamination    | Nombre de souches |           |           |           |           |           |
|--------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                          | 2008              | 2009      | 2010      | 2011      | 2012      | 2013      |
| <i>Afrique</i>           | <i>30</i>         | <i>26</i> | <i>40</i> | <i>31</i> | <i>18</i> | <i>25</i> |
| Afrique (sans précision) | 1                 | 1         |           | 2         | 1         |           |
| Algérie                  | 3                 | 2         | 3         | 1         | 1         |           |
| Angola                   |                   | 1         |           |           |           | 1         |
| Benin                    | 1                 | 1         |           | 1         |           |           |
| Burkina Faso             |                   |           | 4         | 1         |           | 1         |
| Burundi                  |                   |           |           |           |           | 1         |
| Cameroun                 | 1                 | 1         | 3         | 2         | 2         | 2         |
| Cap Vert                 |                   |           |           |           |           | 1         |
| Centrafrique             |                   | 1         |           | 1         |           |           |
| Comores                  |                   | 2         |           | 1         | 1         |           |
| Congo                    | 1                 | 3         |           |           |           |           |
| Côte d'Ivoire            | 1                 |           | 5         | 1         | 1         | 3         |
| Egypte                   | 1                 | 1         | 1         |           |           |           |
| Guinée                   |                   |           | 7         | 1         |           | 1         |
| Kenya                    |                   |           | 1         |           |           |           |
| Madagascar               |                   |           | 3         | 5         | 6         |           |
| Mali                     | 3                 | 1         | 3         | 4         | 3         | 3         |
| Maroc                    | 10                | 9         | 5         | 5         | 2         | 7         |
| Mauritanie               |                   |           | 1         |           |           |           |
| Mozambique               |                   |           |           |           |           | 1         |
| Niger                    |                   |           |           |           |           | 1         |
| Nigeria                  |                   | 1         |           |           |           | 1         |
| Sénégal                  | 8                 | 1         |           | 6         |           |           |
| Soudan                   |                   |           |           |           | 1         |           |
| Tchad                    |                   | 1         | 1         |           |           |           |
| Togo                     |                   |           | 1         |           |           | 1         |
| Tunisie                  |                   |           | 2         |           |           | 1         |
| <i>Asie</i>              | <i>17</i>         | <i>24</i> | <i>41</i> | <i>32</i> | <i>25</i> | <i>23</i> |
| Asie (sans précision)    |                   | 1         |           |           |           |           |
| Afghanistan              |                   |           |           |           |           | 1         |
| Bangladesh               | 1                 | 2         | 2         | 7         | 1         | 1         |
| Cambodge                 | 1                 | 1         | 1         | 1         | 1         | 1         |
| Chine                    |                   |           |           |           |           | 1         |
| Inde                     | 13                | 9         | 24        | 18        | 11        | 15        |
| Indonésie                |                   | 2         |           |           | 2         |           |
| Liban                    |                   |           | 1         |           |           |           |
| Myanmar                  |                   |           |           |           | 1         |           |
| Népal                    |                   |           |           | 1         |           | 2         |
| Pakistan                 | 1                 | 9         | 11        | 4         | 5         |           |

|                        |           |            |            |            |           |           |
|------------------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Palestine              | 1         |            |            |            |           |           |
| Philippines            |           |            |            |            |           | 1         |
| Sri Lanka              |           |            | 1          | 1          | 1         |           |
| Thaïlande              |           |            |            |            | 3         |           |
| Vietnam                |           |            | 1          |            |           |           |
| <i>Amérique</i>        | <i>3</i>  | <i>4</i>   | <i>3</i>   | <i>5</i>   | <i>1</i>  |           |
| Chili                  | 1         |            |            |            |           |           |
| Guatemala              |           |            |            | 1          |           |           |
| Haïti                  | 1         | 1          |            |            |           | 1         |
| Mexique                |           | 3          | 3          | 4          | 1         | 2         |
| République dominicaine | 1         |            |            |            |           |           |
| <i>Europe</i>          |           | <i>23</i>  | <i>4</i>   | <i>1</i>   | <i>0</i>  | <i>0</i>  |
| Espagne                |           |            |            | 1          |           |           |
| France <sup>1</sup>    |           | 23         | 3          |            |           |           |
| Italie                 |           |            | 1          |            |           |           |
| <i>DOM-TOM</i>         | <i>47</i> | <i>49</i>  | <i>36</i>  | <i>40</i>  | <i>38</i> | <i>42</i> |
| Guadeloupe             | 1         | 5          | 1          | 2          | 1         | 1         |
| Guyane                 | 9         | 14         | 12         | 4          | 6         | 11        |
| Martinique             |           | 1          |            |            | 1         |           |
| Mayotte                | 34        | 26         | 22         | 30         | 25        | 30        |
| Polynésie française    |           |            |            |            | 1         |           |
| Réunion                | 3         | 3          | 1          | 4          | 4         |           |
| <b>TOTAL</b>           | <b>97</b> | <b>126</b> | <b>124</b> | <b>109</b> | <b>82</b> | <b>90</b> |

<sup>1</sup> En 2009, deux épidémies à *S. enterica* sérotype Typhi sont survenues dans les départements du Nord et du Rhône lors de repas familiaux préparés par un porteur du bacille et qui ont nécessité l'hospitalisation de 18 et 5 personnes, respectivement. A noter que lors du repas du Rhône, il y avait une co-infection à sérotypes Typhi et Paratyphi A. En 2010, Un cuisinier d'un restaurant du XIXème arrondissement de Paris, porteur asymptomatique de *S. enterica* sérotype Typhi, a été la cause de 2 cas de fièvre typhoïde chez le personnel de ce même restaurant (serveuse et vigile).

### 1.3.1.3.10 Le sérotype Paratyphi A en 2013

En 2013, 66 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi A ont été répertoriées au CNR-ESS pour 63 patients. Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination.

| Pays de contamination | Nombre de souches |           |           |           |           |           |
|-----------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                       | 2008              | 2009      | 2010      | 2011      | 2012      | 2013      |
| <i>Afrique</i>        | <i>11</i>         | <i>7</i>  | <i>2</i>  | <i>3</i>  | <i>3</i>  | <i>3</i>  |
| Algérie               |                   |           | 1         |           |           |           |
| Benin                 |                   | 1         |           |           |           |           |
| Côte d'Ivoire         |                   |           |           |           |           | 1         |
| Egypte                | 1                 |           |           |           |           |           |
| Guinée                | 1                 |           |           |           |           |           |
| Maroc                 |                   |           |           |           |           |           |
| Mali                  |                   |           |           |           | 1         |           |
| Mauritanie            |                   |           |           |           | 1         |           |
| Sénégal <sup>1</sup>  | 8                 | 6         | 1         | 3         | 1         | 2         |
| Tchad                 | 1                 |           |           |           |           |           |
| <i>Asie</i>           | <i>17</i>         | <i>17</i> | <i>24</i> | <i>21</i> | <i>25</i> | <i>40</i> |
| Asie (sans précision) |                   |           |           |           | 4         | 2         |
| Afghanistan           |                   |           |           | 1         |           |           |
| Bengladesh            | 1                 | 2         | 2         |           |           |           |
| Cambodge <sup>3</sup> |                   |           |           |           |           | 23        |
| Chine                 |                   |           | 1         |           |           | 1         |
| Inde                  | 11                | 13        | 10        | 16        | 14        | 8         |
| Indonésie             |                   | 1         |           | 1         | 2         |           |
| Laos                  |                   |           |           | 1         |           |           |
| Myanmar               |                   |           |           |           | 1         | 2         |
| Népal                 | 1                 |           | 6         |           |           | 2         |
| Pakistan              | 4                 | 1         | 3         | 1         | 2         | 1         |
| Sri Lanka             |                   |           | 1         |           |           |           |
| Thaïlande             |                   |           | 1         |           | 1         | 1         |
| Vietnam               |                   |           |           | 1         | 1         | 2         |
| <i>Amérique</i>       |                   |           | <i>2</i>  |           | <i>0</i>  | <i>0</i>  |
| Brésil                |                   |           | 2         |           |           |           |
| <i>Europe</i>         |                   | <i>5</i>  |           |           |           | <i>0</i>  |
| France <sup>2</sup>   |                   | 5         |           |           |           |           |
| <b>TOTAL</b>          | <b>28</b>         | <b>29</b> | <b>28</b> | <b>24</b> | <b>28</b> | <b>45</b> |

<sup>1</sup> Une épidémie de *S. enterica* sérotype Paratyphi A a été notifiée en Bretagne dans une équipe de coureurs cyclistes (5 cas) ayant participé au Tour du Sénégal 2009.

<sup>2</sup> Un repas contaminant est survenu chez 5 personnes dans le département du Rhone (co-infection avec *S. enterica* sérotype Typhi).

<sup>3</sup> Une augmentation importante de cas de fièvres paratyphoïdes à *S. enterica* sérotype Paratyphi A a été notée chez des touristes français de retour du Cambodge. Cette épidémie a été confirmée localement et sévit toujours en 2014 (Tourdjman et al. Euro Suveill 2013 et Vlieghe et al. Euro Suveill 2013).

### 1.3.1.3.11 Le sérotype Paratyphi B en 2013

Le sérotype Paratyphi B est associé à des fièvres paratyphoïdes ou à des diarrhées fébriles. Historiquement, les souches se différencient en fonction de leur capacité à fermenter le d-tartrate (dt). Ainsi d'un point de vue phénotypique, on peut subdiviser les souches de sérotype Paratyphi B en biotype dt- associées à une pathologie de type fièvre paratyphoïde et en biotype dt+ (ou Java) associées à de simples diarrhées. Actuellement, nous utilisons une PCR afin de confirmer les souches dt- des souches dt+ (Malorny et al. J Clin Microbiol 2003).

En 2013, 10 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi B de biotype dt- ont été répertoriées au CNR-ESS pour 8 patients.

Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination.

| Pays de contamination      | Nombre de souches |           |           |          |          |          |
|----------------------------|-------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
|                            | 2008              | 2009      | 2010      | 2011     | 2012     | 2013     |
| <i>Afrique</i>             | <i>1</i>          | <i>3</i>  | <i>1</i>  | <i>2</i> |          | <i>1</i> |
| Algérie                    |                   |           |           | 1        |          |          |
| Egypte                     |                   | 1         |           |          |          |          |
| Maroc                      | 1                 | 1         | 1         | 1        | 1        | 1        |
| Tunisie                    |                   | 1         |           |          |          |          |
| <i>Asie</i>                | <i>3</i>          | <i>10</i> | <i>8</i>  | <i>2</i> |          | <i>2</i> |
| Inde                       |                   |           | 1         |          |          | 1        |
| Turquie                    | 3                 | 10        | 7         | 2        |          | 1        |
| <i>Amérique</i>            | <i>1</i>          | <i>1</i>  | <i>3</i>  |          |          |          |
| Amériques (sans précision) | 1                 |           |           |          |          |          |
| Chili                      |                   |           | 2         |          |          |          |
| Pérou                      |                   | 1         | 1         |          |          |          |
| <b>TOTAL</b>               | <b>5</b>          | <b>14</b> | <b>12</b> | <b>4</b> | <b>1</b> | <b>3</b> |

### 1.3.1.4 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

#### 1.3.1.4.1 Relevés périodiques envoyés à l'InVS :

#### Relevés hebdomadaires et déclaration obligatoire:

- **foyers de cas groupés** d'infections à *Salmonella* signalés par les laboratoires correspondants (203 messages en 2013),
- informations épidémiologiques diverses sur les souches étudiées au laboratoire pour les sérotypes de ***Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes** ou sur les souches impliquées dans des épidémies,
- compte-rendus de l'analyse d'un algorithme R aidant à la détection d'événements épidémiques.

## Relevés annuels :

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

## Relevés ponctuels :

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

1.3.1.4.2 Notifications de foyers de cas groupés à *Salmonella* signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS entre 2005 et 2013

En 2013, le CNR-ESS a retransmis à l'InVS par télécopie ou par courrier électronique **203** notifications de foyers de cas groupés à *Salmonella*.

| Foyers de cas groupés signalés à <i>Salmonella</i><br>au CNR-ESS en : |            |            |            |            |            |            |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                                                       | 2005       | 2008       | 2010       | 2011       | 2012       | 2013       |
| Nombre total de foyers                                                | <b>311</b> | <b>304</b> | <b>194</b> | <b>229</b> | <b>233</b> | <b>203</b> |
| Causés par : le sérotype                                              |            |            |            |            |            |            |
| Enteritidis                                                           | 104        | 69         | 48         | 41         | 55         | 46         |
| Typhimurium                                                           | 124        | 125        | 50         | 60         | 61         | 50         |
| 1,4,[5],12:i:-                                                        |            |            | 35         | 68         | 52         | 52         |

1.3.1.4.3 Les différents foyers de cas groupés à *Salmonella* signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS en 2013

203 épisodes de cas groupés déclarant 939 cas

Nombre de sérotypes de *Salmonella* impliqués: 38

Foyers hospitaliers : 3 (14 cas)

Collectivité : 1 (2 cas)

Crèches : 6 (19 cas)

Autre (sans précision) : 26 (197 cas)

Foyers familiaux : 162 (655 cas)

Travail : 2 (4 cas)

Ecoles : 5 (52 cas)

Les sources de contamination incriminées ont été déclarées pour 30 épisodes de cas groupés (**en gras les plus importants en 2013**): bacon (1 épisode avec 4 cas), glace (1 épisode avec 5 cas), jambon artisanal (1 épisode avec 4 cas), lait (2 épisodes avec 4 cas), **mayonnaise (1 épisode avec 27 cas)**, **mousse au chocolat (1 épisode avec 20 cas)**, **œufs (10 épisodes avec 253 cas)**, pâtes (1 épisode avec 5 cas), pizza (1 épisode avec 2 cas), poulet (1 épisode avec 20 cas), sandwich (1 épisodes avec 2 cas), sanglier (1 épisode avec 3 cas), saucisson (2 épisode avec 6 cas), tiramisu (1 épisode avec 2 cas).

### 1.3.2 Contribution à la surveillance de la résistance aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques est réalisée annuellement sur un échantillon représentatif des principaux sérotypes de *Salmonella*. La technique utilisée est l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (*Enterobacteriaceae*) en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM; communiqué 2012). De 16 à 32 antibiotiques sont testés. Les résultats dans ce rapport ne mentionnent que les principaux antibiotiques.

Abréviations utilisées: A, amoxicilline; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine; Azi, azithromycine; Imp, imipénème.

#### 1.3.2.1 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhimurium de 1993 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                         | 1993                          | 1997                | 2002                | 2005                | 2008                | 2010                | 2012                | 2013                |
|                         | (n=297)<br>(N=1593)           | (n=250)<br>(N=2801) | (n=320)<br>(N=1756) | (n=100)<br>(N=1767) | (n=102)<br>(N=2714) | (n=100)<br>(N=1714) | (n=103)<br>(N=1892) | (n=107)<br>(N=1698) |
| Amoxicilline            | 55,2                          | 68,4                | 64,5                | 60                  | 61,8                | 70                  | 59                  | 60,7                |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                   | <b>0,3</b>          | <b>1</b>            | <b>2</b>            | <b>6</b>            | <b>1</b>            | <b>3,7</b>          |
| Gentamicine             | 0,3                           | 0,7                 | 0,3                 | 0                   | 1                   | 4                   | 0                   | 0,9                 |
| Acide nalidixique       | 3                             | 3,6                 | 4                   | 8                   | 0                   | 15                  | 5                   | 4,7                 |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                   | <b>0,3</b>          | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| Sulfamides              | 58,9                          | 70                  | 68                  | 61                  | 57,8                | 71                  | 65                  | 62,6                |
| Triméthoprim            | 0                             | 6                   | 5,3                 | 10                  | 7,8                 | 11                  | 6                   | 5,6                 |
| Chloramphénicol         | 44,1                          | 61,2                | 57                  | 42                  | 39,2                | 54                  | 42                  | 43,9                |
| Tétracycline            | 69,6                          | 83,2                | 71                  | 65                  | 60,8                | 75                  | 64                  | 70,1                |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

| Principaux profils de résistance | % de souches possédant ce profil en : |               |               |               |               |               |               |               |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                  | 1993<br>n=297                         | 1997<br>n=250 | 2002<br>n=320 | 2005<br>n=100 | 2008<br>n=102 | 2010<br>n=100 | 2012<br>n=103 | 2013<br>n=107 |
| AS[Sp]SuCTe*                     | 34,3                                  | 54,6          | 48,8          | 32            | 30,4          | 30            | 37            | 35,5          |
| AS[Sp]SuCTeNal*                  | 0                                     | 1,5           | 3,8           | 5             | 0             | 15            | 1             | 1,9           |
| AS[Sp]SuTmpCTe*                  | 2,5                                   | 1,5           | 3             | 4             | 4,9           | 3             | 0             | 0,9           |
| S[Sp]Su*                         | 1,1                                   | 0,5           | 2,2           | 0             | 2,9           | 1             | 5             | 4,7           |
| ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe           | 0                                     | 0             | 0             | 0             | 0             | <b>4</b>      | 0             | 0             |
| ACroTe                           | 0                                     | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | <b>1</b>      | 0             |
| ACroSSpSuTmpCTe*                 | 0                                     | 0             | 0             | 0             | 0             | <b>1</b>      | 0             | <b>1,9</b>    |
| ASSuTe                           | 8,9                                   | 4,4           | 3,8           | 9             | 11,8          | 11            | 7             | 5,6           |
| Te                               | 11,8                                  | 13,7          | 3,8           | 5             | 3,9           | 7             | 6             | 9,3           |
| Multi-sensibles                  | 28,6                                  | 14,1          | 21,5          | 28            | 29,4          | 19            | 24            | 19,6          |

[Sp] La spectinomycine n'était pas testée avant 2003

\* phénotype associé au clone multirésistant DT104

Depuis ces dernières années, la prévalence du clone DT104, classiquement penta-résistant avec le profil AS[Sp]SuCTe, diminue en France. Environ 60% de souches de Typhimurium



avaient un profil de résistance évocateur du lysotype DT104 entre 1997 et 2002, 51% en 2003, 41% en 2005 et autour des 38% depuis 2006. On note une ré-ascension de ce clone en 2010 et 2011, avec respectivement 50% et 46% des Typhimurium, et ce principalement dû à l'augmentation du phénotype penta-résistant + résistance à l'acide nalidixique. En 2012 et 2013, avec 43% et 45% des Typhimurium présentant les profils de résistance associés au clone DT104, on note un retour vers les taux existants entre 2006 et 2010.

Une des caractéristiques de l'année 2010 est l'avènement de souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G), et notamment avec le profil « ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe » associé à une épidémie nationale (42 cas). L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance ont permis d'identifier la production concomitante de la BLSE CTX-M-1 et de la céphalosporinase CMY-2 chez ces souches (<http://www.infectiologie.com/site/jni11-com.php>).

L'estimation annuelle des souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium résistantes aux C3G peut se faire à partir des enquêtes de prévalence sus-citées ainsi qu'à partir des résultats d'antibiogramme accompagnant les souches après vérification par le CNR-ESS. L'évolution de ces souches entre 2007 et 2013 est présentée dans le tableau ci-dessous.

| Principaux profils de résistance des souches résistantes aux C3G | Nombre de souches possédant ce profil en : |          |           |           |          |          |                |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------------|
|                                                                  | 2007                                       | 2008     | 2009      | 2010      | 2011     | 2012     | 2013           |
| ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe                                           |                                            |          | 2         | 42        |          |          |                |
| ACroCazTG                                                        |                                            |          | 1         |           |          |          |                |
| ACroCazSSulCTeNal                                                |                                            |          | 1         |           |          |          |                |
| ACroCazSTGSuCTeNal                                               |                                            |          |           | 1         | 1        |          |                |
| ACroCazSKTGSuTmpCTeNal                                           | 2                                          |          |           |           |          |          |                |
| ACroSuTe                                                         |                                            |          |           | 1         |          | 1        | 1 <sup>a</sup> |
| ACroSSpSuTmpCTeNal                                               |                                            |          |           |           |          |          | 1              |
| ACroSSpSuTmpCTe                                                  |                                            | 1        | 1         | 3         | 1        |          | 2 <sup>b</sup> |
| ACroSSpSuTmp                                                     |                                            | 1        |           | 1         |          |          |                |
| ACroSSpSuCTe                                                     |                                            | 1        |           | 1         |          | 2        |                |
| ACroSTGSuCTe                                                     |                                            |          |           |           |          |          | 1 <sup>c</sup> |
| ACroSuTmpTe                                                      |                                            |          |           | 1         |          |          | 1 <sup>d</sup> |
| ACroSuTmp                                                        |                                            | 3        |           |           |          |          |                |
| ACro                                                             |                                            | 1        |           |           | 2        |          |                |
| ACroTe                                                           |                                            |          |           |           |          | 1        |                |
| ACazTe                                                           |                                            |          | 1         |           |          |          |                |
| ACazSSpKSulCTe                                                   |                                            |          | 1         |           |          |          |                |
| ACazSSpSulCTe                                                    | 1                                          |          | 3         |           |          |          |                |
| ACazSSulTe                                                       |                                            |          | 1         |           |          |          |                |
| ACazFoxSKTGSuTmpCTe                                              |                                            |          |           | 1         |          |          |                |
| ACazFoxSKSuCTe                                                   |                                            |          |           | 1         |          |          |                |
| ACazFoxSuTe                                                      |                                            |          |           |           |          |          | 1 <sup>e</sup> |
| ACazFox                                                          |                                            | 1        |           |           |          |          |                |
| <b>TOTAL</b>                                                     | <b>3</b>                                   | <b>8</b> | <b>11</b> | <b>52</b> | <b>4</b> | <b>4</b> | <b>7</b>       |

<sup>a</sup> souche porteuse de gène *bla*<sub>CTX-M-1</sub>

<sup>b</sup> souches porteuses de gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub>

<sup>c</sup> souche porteuse de gène *bla*<sub>CTX-M-55</sub>

<sup>d</sup> souche porteuse de gène *bla*<sub>CTX-M</sub>

<sup>e</sup> souche porteuse de gène *bla*<sub>CMY-2</sub>

### 1.3.2.2 Résistance aux antibiotiques du sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) de 2007 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                   |                     |                     |                     |                     |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                         | 2007                          | 2008              | 2010                | 2011                | 2012                | 2013                |
|                         | (n=50)<br>(N=121)             | (n=55)<br>(N=410) | (n=101)<br>(N=1098) | (n=110)<br>(N=2143) | (n=105)<br>(N=1852) | (n=109)<br>(N=2271) |
| Amoxicilline            | 64                            | 83,6              | 89,1                | 94,5                | 89,5                | 89,9                |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 1,8               | 3                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| Gentamicine             | 2                             | 3,6               | 7,9                 | 0,9                 | 0                   | 0                   |
| Acide nalidixique       | 0                             | 1,8               | 1                   | 1,8                 | 0                   | 0,9                 |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                 | 1                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| Sulfamides              | 40                            | 81,8              | 87,1                | 95,5                | 91,4                | 89,9                |
| Triméthoprim            | 16                            | 25,5              | 19,8                | 4,5                 | 3,8                 | 2,7                 |
| Chloramphénicol         | 20                            | 10,9              | 8,9                 | 1,8                 | 2,9                 | 0,9                 |
| Tétracycline            | 90                            | 90,9              | 92,1                | 97,8                | 93,4                | 95,4                |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Le sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) est un sérotype qui est en très nette augmentation ces dernières années, passant de 113 isollements en 2006 à plus de 1500 depuis 2010 (du 9ème au 2ème sérotype le plus fréquemment isolé). Cette augmentation est due à l'émergence d'un variant monophasique de *S. enterica* sérotype Typhimurium multi-résistant aux antibiotiques de profil majoritaire « ASSuTe », de PFGE-type XTYM-159, de lysotype DT193 (ou DT120) et de CRISPOL type (CT) 1.

| Principaux profils de résistance | % de souches résistantes en : |              |               |               |               |               |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                  | 2007<br>n=50                  | 2008<br>n=55 | 2010<br>n=101 | 2011<br>n=110 | 2012<br>n=105 | 2013<br>n=109 |
| ASSpSuCTe                        | 0                             | 0            | 0             | 0,9           | 0             | 0,9           |
| Multi-sensibles                  | 8                             | 3,6          | 4             | 0,9           | 5,7           | 2,7           |
| Te                               | 20                            | 9,1          | 2             | 2,7           | 2,9           | 5,5           |
| ASSuTe                           | 62                            | 49,1         | 68,3          | 89,1          | 86,7          | 83,5          |
| SSuTmpCTe                        | 16                            | 0            | 0             | 0             | 1,9           | 0             |
| ATmpTe                           | 0                             | 0            | 5,9           | 0             | 0             | 0             |
| SpSulTmp                         | 0                             | 0            | 0             | 1,8           | 0             | 0             |
| ASSpKToNGSuTmpCTeNal             | 0                             | 0            | 0             | 0,9           | 0             | 0             |

Depuis ces dernières années, la multirésistance du sérotype Typhimurium est liée à la prévalence du clone DT104 (45% en 2013). Ce profil « ASSpSuCTe » (avec un gène *bla*<sub>PSE-1</sub> de résistance à l'amoxicilline) est quasi-inexistant chez le « variant » monophasique 1,4,[5],12:i:- qui présente majoritairement (83,5%) un profil « ASSuTe » (avec un gène *bla*<sub>TEM</sub> de résistance à l'amoxicilline).

La présence de souches monophasiques résistantes aux C3G a été également décrite entre 2008 et 2012 (21 souches dont 2 exprimant une enzyme CTX-M-1, 8 souches produisant CTX-M-9 et une SHV-12). A noter qu'en 2012, 5 souches produisaient de façon concomitante CTX-M-9 et QnrA1 et contenaient un intégron de classe I (avec une cassette *df**rA16-aadA2*) mais ce type de souches n'a pas été retrouvée en 2013.

### 1.3.2.3 Résistance aux antibiotiques du sérotype Enteritidis de 1993 à 2012

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                             |                            |                             |                             |                            |                             |                             |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                         | 1993<br>(n=70)<br>(N=2345)    | 1997<br>(n=380)<br>(N=2585) | 2002<br>(n=99)<br>(N=2054) | 2005<br>(n=100)<br>(N=1495) | 2008<br>(n=102)<br>(N=1183) | 2010<br>(n=97)<br>(N=1175) | 2012<br>(n=100)<br>(N=1247) | 2013<br>(n=105)<br>(N=1149) |
| Amoxicilline            | 0                             | 6,8                         | 6,1                        | 12                          | 2                           | 6,2                        | 3                           | 8,6                         |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                           | 0                          | 0                           | 0                           | 1                          | 0                           | 0                           |
| Gentamicine             | 0                             | 0,5                         | 0                          | 2                           | 0                           | 0                          | 0                           | 0                           |
| Acide nalidixique       | 0                             | 2                           | 11,1                       | 21                          | 24,5                        | 21,6                       | 32                          | 33,3                        |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                           | 0                          | 0                           | 0                           | 0                          | 0                           | 0                           |
| Sulfamides              | 0                             | 3,9                         | 0                          | 2                           | 1                           | 0                          | 2                           | 8,6                         |
| Triméthoprim            | 0                             | 2,3                         | 0                          | 2                           | 0                           | 0                          | 1                           | 1,9                         |
| Chloramphénicol         | 0                             | 0,7                         | 0                          | 0                           | 0                           | 0                          | 1                           | 1,9                         |
| Tétracycline            | 2,8                           | 3,4                         | 3                          | 1                           | 0                           | 2,1                        | 3                           | 6,7                         |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Le sérotype Enteritidis reste globalement sensible aux antibiotiques. Cependant la résistance à l'acide nalidixique est en nette augmentation depuis 1993. La CMI à la ciprofloxacine reste toutefois assez basse (0,125 mg/L). Entre 2009 et 2013, les souches résistantes aux C3G apparaissent mais restent rares avec une en 2009 (CTX-M de phénotype ACroSuTnp) et une en 2010 et 2011 (CTX-M-9 de phénotype ACro et ACroSSpSuTnp, respectivement).

### 1.3.2.4 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhi de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                           |                            |                           |                             |                           |                           |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                         | 1997<br>(n=40)<br>(N=170)     | 2002<br>(n=40)<br>(N=133) | 2005*<br>(n=63)<br>(N=116) | 2008*<br>(n=85)<br>(N=85) | 2010*<br>(n=108)<br>(N=109) | 2012*<br>(n=74)<br>(N=74) | 2013*<br>(n=79)<br>(N=80) |
| Amoxicilline            | 0                             | 2,5                       | 8,1                        | 11,8                      | 15,7                        | 14,9                      | 16,4                      |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                         | 0                          | 0                         | 0                           | 0                         | 0                         |
| Acide nalidixique       | 0                             | 7,5                       | 17,8                       | 30,6                      | 38,9                        | 41,9                      | 35,4                      |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                         | 0                          | 0                         | <b>2,7</b>                  | <b>5,4</b>                | <b>7,6</b>                |
| Cotrimoxazole           | 5                             | 7,5                       | 7,9                        | 11,8                      | 20,4                        | 16,2                      | 17,7                      |
| Chloramphénicol         | 7,5                           | 7,5                       | 5,9                        | 10,6                      | 16,7                        | 14,9                      | 19,0                      |
| Tétracycline            | 5                             | 7,5                       | 5,9                        | 8,2                       | 10,2                        | 8,1                       | 11,4                      |
| Azithromycine           | NT                            | NT                        | NT                         | NT                        | 0                           | 0                         | 0                         |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une seule par patient) reçues au CNR-ESS

\*Souches isolées en France métropolitaine excluant les souches provenant de Mayotte et des Antilles-Guyane.

NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

En 2010-2013, la résistance à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>) était observée chez près de 40% des souches de **sérotype Typhi** (avec une CMI > 256 mg/L). Il est important de noter l'évolution vers la résistance de haut niveau à la ciprofloxacine (CMI ciprofloxacine de 6 à 32 mg/L) : 3 souches en 2010, 4 en 2011, 4 en 2012 et 6 en 2013 isolées chez des patients revenant d'Inde, du Népal ou du Sri-Lanka.

Les souches Nal<sup>R</sup> étaient acquises en 2013 suite à des séjours en Inde (n=14), au Népal (n=2), en Afghanistan (n=1), au Bangladesh (n=1), au Cambodge (n=1), en Chine (n=1), au Mexique (n=1) et en Côte d'Ivoire (n=1). Ces dernières souches sont notables car les souches résistantes aux quinolones étaient jusqu'alors presque exclusivement issues du sous-continent indien. Elle confirme les premières souches de 2010 isolées de 2 patients déclarant un retour d'Afrique (Burkina Faso et Côte d'Ivoire).

Depuis ces dernières années de plus en plus de souches multirésistantes mais Nal<sup>S</sup> sont acquises en Afrique. Entre 2010 et 2013, lorsque le lieu de contamination est indiqué, les souches multirésistantes de profil ASSu[TmpC]Te provenaient d'Algérie, du Burkina Faso, du Cameroun, de Côte d'Ivoire, de Guinée, du Mali, du Nigeria et de République Centrafricaine.

En 2013, les souches de Typhi contractées dans les DOM-TOM, c'est à dire Mayotte (n=30), Guyane Française (n=9) et Guadeloupe (n=1) étaient toutes sensibles à l'amoxicilline, à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole, exceptée pour une souche Nal<sup>R</sup> d'un cas isolé en Guyane Française (sans notion de voyage).

### 1.3.2.5 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi A de 2005 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | 2005<br>(n=21)<br>(N=33)      | 2008<br>(n=41)<br>(N=41) | 2010<br>(n=30)<br>(N=30) | 2011<br>(n=31)<br>(N=32) | 2012<br>(n=39)<br>(N=39) | 2013<br>(n=59)<br>(N=60) |
| Amoxicilline            | 0                             | 2,4                      | 0                        | 0                        | 0                        | 1,7                      |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Acide nalidixique       | 71,4                          | 61,9                     | 76,7                     | 90,3                     | 64,1                     | 39,0                     |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                        | 3,3                      | 0                        | 0                        | 0                        |
| Cotrimoxazole           | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Chloramphénicol         | 0                             | 2,4                      | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Tétracycline            | 0                             | 2,4                      | 3,3                      | 0                        | 0                        | 1,7                      |
| Azithromycine           | 0                             | NT                       | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype isolées en France métropolitaine (une par patient) reçues au CNR-ESS

NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

Le pourcentage de résistance à l'acide nalidixique (CMI >256 mg/L) des souches **de sérotype Paratyphi A** est élevé. En 2013, ces souches ont été contractées en Inde (n=7), au Myanmar (n=2), en Chine (n=1), au Pakistan (n=1) et au Sénégal (n=1). Cette dernière souche confirme les quatre souches Nal<sup>R</sup> de 2011 et 2012 isolées de patients déclarant un retour du Sénégal alors qu'habituellement les souches d'origine africaine restaient sensibles à tous les antibiotiques testés. Cette année 2013 a été marquée par une augmentation de cas infectés par une souche de Paratyphi A sensible aux antibiotiques après un séjour au Cambodge (Tourdjman et al. Euro Suveill 2013).

### 1.3.2.6 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi B de 2000 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | 2000<br>(n=68)<br>(N=75)      | 2002<br>(n=78)<br>(N=78) | 2006<br>(n=35)<br>(N=51) | 2008<br>(n=47)<br>(N=51) | 2009<br>(n=55)<br>(N=55) | 2012<br>(n=37)<br>(N=37) | 2013<br>(n=40)<br>(N=40) |
| Amoxicilline            | 5,1                           | 28,2                     | 8,6                      | 8,5                      | 5,5                      | 16,2                     | 22,5                     |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 2,7                      | 5                        |
| Gentamicine             | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Acide nalidixique       | 1,5                           | 0                        | 2,9                      | 4,3                      | 10,9                     | 10,8                     | 12,5                     |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Sulfamides              | 5,1                           | 29,5                     | 8,6                      | 8,5                      | 5,5                      | 16,2                     | 15                       |
| Triméthoprim            | 0                             | 7,7                      | 0                        | 2,1                      | 0                        | 2,7                      | 7,5                      |
| Chloramphénicol         | 5,1                           | 24,4                     | 8,6                      | 8,5                      | 7,3                      | 10,8                     | 10                       |
| Tétracycline            | 7,4                           | 25,6                     | 8,6                      | 12,7                     | 3,6                      | 18,9                     | 10                       |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

En 2010-2013 aucune souche de **Paratyphi B dt-** (n=36, 15, 9 et 9) n'était résistante à l'amoxicilline mais huit présentaient une résistance à l'acide nalidixique avec CMI > 256 mg/L et une avec une CMI à 12 mg/L. Cette dernière, isolée en 2013, possédait une substitution isolée en GyrB (Ser464Phe) comme ce qui a déjà été décrit pour certaines populations de Typhi (Accou-Demartin et al. Emerg Infect Dis 2011). En 2012, une souche Paratyphi B dt+ (biotype Java) produisait une céphalosporinase de type CMY et en 2013, deux souches produisaient une BLSE de type CTX-M-1.

### 1.3.2.7 Résistance aux antibiotiques du sérotype Agona de 2009 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en: |                          |                          |                          |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | 2009<br>(n=53)<br>(N=55)     | 2011<br>(n=46)<br>(N=51) | 2012<br>(n=54)<br>(N=55) | 2013<br>(n=59)<br>(N=60) |
| Amoxicilline            | 13,2                         | 8,7                      | 0                        | 8,5                      |
| Ceftriaxone/ceftazidime | <b>1,9</b>                   | <b>2,2</b>               | 0                        | 0                        |
| Gentamicine             | 1,9                          | 2,2                      | 0                        | 3,4                      |
| Acide nalidixique       | 3,8                          | 2,2                      | 1,9                      | 6,8                      |
| Ciprofloxacine          | 0                            | 2,2                      | 0                        | <b>1,7</b>               |
| Sulfamides              | 18,9                         | 17,4                     | 0                        | 13,6                     |
| Triméthoprine           | 15,1                         | 8,7                      | 0                        | 6,8                      |
| Chloramphénicol         | 1,9                          | 2,2                      | 0                        | 1,7                      |
| Tétracycline            | 11,3                         | 13                       | 1,9                      | 8,5                      |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR *Salmonella*

Une souche de sérotype Agona résistante aux C3G de profil « ACazFoxSSpGTCSuTmpTe » a été isolée en 2009. Cette souche productrice d'une céphalosporinase plasmidique de type CMY-2 a été isolée d'un enfant adopté originaire d'Haïti. En 2011, une autre souche de profil « ACroCazSKTGSuTmpCTeNalCip » exprimant une BLSE de type CTX-M a été isolée chez une jeune patiente de retour d'Inde. En 2013, a été identifiée une souche résistante à haut-niveau à la ciprofloxacine.

### 1.3.2.8 Résistance aux antibiotiques du sérotype Blockley en 2010-2013

| Profils de résistance | Nombre de souches possédant ce profil en : |                          |                          |                          |
|-----------------------|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | 2010<br>(n=11)<br>(N=11)                   | 2011<br>(n=11)<br>(N=11) | 2012<br>(n=60)<br>(N=60) | 2013<br>(n=12)<br>(N=12) |
| SKTeNal               | 1                                          | 0                        | 1                        | 0                        |
| SKTeNalAzi            | 3                                          | 3                        | 4                        | 1                        |
| SKTeNalCipAzi         | 2                                          | 0                        | 1                        | 1                        |
| sensible              | 5                                          | 8                        | 54                       | 10                       |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR *Salmonella*

La particularité de ce sérotype est l'existence de souches résistantes à l'azithromycine associées à un profil de résistance SKTeNal. Des souches de même profil avec une résistance additionnelle de haut niveau à la ciprofloxacine sont apparues depuis 2010. Le nombre de souches élevées en 2012 est du à une épidémie de salmonelloses humaines à *S. enterica* sérotype Blockley multisensible aux antibiotiques.

### 1.3.2.9 Résistance aux antibiotiques du sérotype Brandenburg de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                           |                           |                          |                          |                          |                          |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | 1997<br>(n=40)<br>(N=170)     | 2000<br>(n=45)<br>(N=148) | 2002<br>(n=41)<br>(N=110) | 2008<br>(n=50)<br>(N=98) | 2010<br>(n=50)<br>(N=52) | 2012<br>(n=46)<br>(N=46) | 2013<br>(n=46)<br>(N=46) |
| Amoxicilline            | 15                            | 8,9                       | 9,7                       | 24                       | 22                       | 26                       | 21,7                     |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                         | 0                         | 0                        | 0                        | 0                        | <b>2,2</b>               |
| Gentamicine             | NT                            | 4,5                       | 4,9                       | 18                       | 14                       | 23,9                     | 13,0                     |
| Acide nalidixique       | 12                            | 4,5                       | 12,2                      | 0                        | 12                       | 17,4                     | 10,9                     |
| Ciprofloxacine          | 0                             | <b>4,5</b>                | <b>2,4</b>                | 0                        | <b>12</b>                | <b>17,4</b>              | <b>10,9</b>              |
| Sulfamides              | 17,5                          | 8,9                       | 17                        | 46                       | 38                       | 28,3                     | 23,9                     |
| Triméthoprim            | 20                            | 8,9                       | 17                        | 28                       | 24                       | 28,3                     | 21,7                     |
| Chloramphénicol         | 10                            | 4,5                       | 12,2                      | 22                       | 16                       | 15,2                     | 6,5                      |
| Tétracycline            | 75                            | 66,7                      | 73,2                      | 72                       | 46                       | 30,4                     | 28,3                     |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Des souches de sérotype Brandenburg de profil étendu « A (*bla*<sub>TEM</sub>) SS<sub>p</sub>KTNGSuT<sub>mp</sub>CTeNa<sub>l</sub>C<sub>ip</sub> » hautement résistantes à la ciprofloxacine, persistent depuis 2000 dans un clinique du département de l'Allier (investigation en cours). En 2013, une souche CIP<sup>R</sup> produisait également une BLSE de type CTX-M-32.

### 1.3.2.10 Résistance aux antibiotiques du sérotype Corvallis de 2010 à 2013

| Principaux profils de résistance             | Nombre de souches possédant ce profil en : |                      |                      |                      |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                              | 2010<br>n=69<br>N=69                       | 2011<br>n=43<br>N=44 | 2012<br>n=40<br>N=40 | 2013<br>n=37<br>N=37 |
| ACroSSpGSuT <sub>mp</sub> CTeNa <sub>l</sub> | 0                                          | 0                    | 0                    | 1                    |
| ASTNGSuCTeNa <sub>l</sub>                    | 1                                          | 0                    | 1                    | 0                    |
| ASuTeNa <sub>l</sub>                         | 0                                          | 1                    | 0                    | 0                    |
| ASuTe                                        | 1                                          | 1                    | 0                    | 1                    |
| SpSuT <sub>mp</sub> TeNa <sub>l</sub> Azi    | 0                                          | 0                    | 0                    | 0                    |
| SSuTe                                        | 2                                          | 2                    | 1                    | 0                    |
| SSuTeNa <sub>l</sub>                         | 0                                          | 3                    | 5                    | 3                    |
| Na <sub>l</sub>                              | 8                                          | 11                   | 5                    | 7                    |
| SuNa <sub>l</sub>                            | 0                                          | 0                    | 1                    | 0                    |
| Te                                           | 0                                          | 0                    | 1                    | 1                    |
| sensible                                     | 54                                         | 23                   | 26                   | 21                   |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2010 à 2013, toutes les souches de *S. enterica* sérotype Corvallis de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (n= 8, 15, 12 et 13, respectivement) possédaient le gène *qnrS1* et avaient été contractées en Asie (Thaïlande, Indonésie, Inde, Laos), lorsque la notion de voyage était renseignée. En 2013, une souche Corvallis produisait CTX-M et QnrS1.



### 1.3.2.11 Résistance aux antibiotiques du sérotype Derby de 2000 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                           |                           |                            |                            |                           |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                         | 2000<br>(n=40)<br>(N=142)     | 2006<br>(n=50)<br>(N=137) | 2009<br>(n=53)<br>(N=158) | 2010<br>(n=132)<br>(N=166) | 2012<br>(n=156)<br>(N=158) | 2013<br>(n=81)<br>(N=168) |
| Amoxicilline            | 2,5                           | 2                         | 13,2                      | 3,8                        | 3,2                        | 9,9                       |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                         | <b>11,3</b>               | <b>0,8</b>                 | <b>0,6</b>                 | <b>1,2</b>                |
| Gentamicine             | 0                             | 2                         | 3,8                       | 0,8                        | 0,6                        | 0                         |
| Acide nalidixique       | 0                             | 2                         | 3,8                       | 6,8                        | 2,6                        | 2,5                       |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                         | 0                         | 0                          | 0                          | 0                         |
| Sulfamides              | 57,5                          | 76                        | 58,5                      | 56,8                       | 66                         | 61,7                      |
| Triméthoprim            | 5                             | 8                         | 22,6                      | 3,8                        | 4,5                        | 7,4                       |
| Chloramphénicol         | 2,5                           | 0                         | 5,7                       | 2,3                        | 0,6                        | 1,2                       |
| Tétracycline            | 55                            | 80                        | 58,5                      | 62,9                       | 62,8                       | 61,7                      |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

| Principaux profils de résistance (%) | 2009<br>n=53 | 2010<br>N=132 | 2011<br>N=137 | 2012<br>N=156 | 2013<br>N=81 |
|--------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
|                                      |              |               |               |               |              |
| SSpSuTe                              | 34           | 45,5          | 55,5          | 55,1          | 44,4         |
| Multi-sensibles                      | 30,2         | 34,1          | 26,3          | 28,8          | 29,6         |
| ACroCazSSpKTNGAISuTmpCTe             | <b>5,7</b>   | 0             | <b>0,7</b>    | 0             | 0            |
| ACroCazSSuTmpCTe                     | 0            | <b>0,7</b>    | 0             | 0             | 0            |
| ACroCazSSpSuCTe                      | 0            | 0             | <b>0,8</b>    | 0             | 0            |
| ACroSuTmpTeNal                       | 1,9          | 0             | 0             | 0             | 0            |
| ACroSSpSuTe                          | 0            | 0             | 0             | 0             | <b>1,2</b>   |
| ACroSuTmp                            | 1,9          | 0             | 0             | <b>0,6</b>    | 0            |
| ACro                                 | 1,9          | 0             | 0             | 0             | 0            |

En 2009, six souches résistantes aux C3G par production de BLSE ont été décrites chez le sérotype Derby. L'analyse des mécanismes moléculaires de 3 souches ayant le profil ACroCazSSpKTNGAISuTmpCTe a mis en évidence la présence concomitante des BLSE CTX-M-3 et CTX-M-15 et d'une méthyltransférase, RmtB. Ce profil a été retrouvé chez deux enfants adoptés revenant du Vietnam et chez un enfant contaminé à l'hôpital à partir d'un cas importé. En 2010 et 2011, deux souches supplémentaires avec les mêmes BLSE ont été isolées d'enfants adoptés du Vietnam. Depuis 2012, les souches BLSE ne sont plus en lien avec le Vietnam mais correspondent à des acquisitions métropolitaines et sporadiques (CTX-M-1 et CTX-M-9, respectivement pour 2012 et 2013).

### 1.3.2.12 Résistance aux antibiotiques du sérotype Heidelberg de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | 1997<br>(n=50)<br>(N=269)     | 2002<br>(n=67)<br>(N=84) | 2008<br>(n=28)<br>(N=28) | 2009<br>(n=20)<br>(N=21) | 2010<br>(n=26)<br>(N=31) | 2012<br>(n=31)<br>(N=35) | 2013<br>(n=21)<br>(N=22) |
| Amoxicilline            | 26                            | 31,5                     | 28,6                     | 20                       | 11,5                     | 22,6                     | 9,5                      |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                        | <b>10,7</b>              | <b>15</b>                | <b>7,7</b>               | <b>16,1</b>              | <b>4,8</b>               |
| Acide nalidixique       | 0                             | 13,5                     | 50                       | 55                       | 65,4                     | 71                       | 57,1                     |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| Sulfamides              | 20                            | 27                       | 10,7                     | 20                       | 15,4                     | 19,3                     | 4,8                      |
| Triméthoprim            | 18                            | 28,5                     | 7,1                      | 5                        | 3,8                      | 9,7                      | 0                        |
| Chloramphénicol         | 6                             | 0                        | 7,1                      | 0                        | 3,8                      | 3,2                      | 0                        |
| Tétracycline            | 22                            | 27                       | 14,2                     | 30                       | 7,7                      | 16,1                     | 4,8                      |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Depuis 2008, on note une augmentation de souches résistantes au C3G (CTX-M ou CMY) qui ont été identifiées le plus souvent suite à un séjour en Algérie.

| Profils de résistance | Nombre de souches ayant un profil de multirésistance en : |              |              |              |              |            |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
|                       | 2008<br>n=28                                              | 2009<br>n=20 | 2010<br>n=26 | 2011<br>n=20 | 2012<br>n=31 | 2013<br>n= |
| Multi sensibles       | 9                                                         | 6            | 6            | 8            | 8            | 8          |
| Nal                   | 9                                                         | 6            | 15           | 8            | 16           | 12         |
| ACro                  | 0                                                         | 1            | 0            | 0            | 0            | 0          |
| ACroCazFox            | 0                                                         | 0            | 0            | 0            | <b>1</b>     | 0          |
| ACroCazFoxNal         | 0                                                         | 0            | 0            | 0            | 0            | <b>1</b>   |
| ACroNal               | <b>2</b>                                                  | 0            | <b>1</b>     | 0            | 0            | 0          |
| ACroSuTeNal           | 0                                                         | <b>2</b>     | 0            | <b>1</b>     | <b>3</b>     | 0          |
| ACroSSpGTSuTeNal      | 1                                                         | 0            | 0            | 0            | 0            | 0          |
| ACroSSpSuTmNal        | 0                                                         | 0            | <b>1</b>     | 0            | 0            | 0          |
| ACroKSuTmCTeNal       | 0                                                         | 0            | 0            | <b>1</b>     | <b>1</b>     | 0          |

n : nombre de souches étudiées

### 1.3.2.13 Résistance aux antibiotiques du sérotype Indiana de 2010 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en :   |                                 |                                 |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                         | <b>2010</b><br>(n=26)<br>(N=28) | <b>2011</b><br>(n=18)<br>(N=19) | <b>2012</b><br>(n=31)<br>(N=32) | <b>2013</b><br>(n=22)<br>(N=24) |
| Amoxicilline            | 38,5                            | 5,5                             | 19,4                            | 13,6                            |
| Ceftriaxone/ceftazidime | <b>26,9</b>                     | <b>5,5</b>                      | <b>3,2</b>                      | 0                               |
| Acide nalidixique       | 26,9                            | 22,2                            | 3,2                             | 4,5                             |
| Ciprofloxacine          | 0                               | 0                               | <b>3,2</b>                      | 0                               |
| Sulfamides              | 46,2                            | 11                              | 19,4                            | 13,6                            |
| Triméthoprim            | 15,4                            | 0                               | 19,4                            | 13,6                            |
| Chloramphénicol         | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               |
| Tétracycline            | 46,2                            | 11                              | 19,4                            | 18,1                            |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2010 et 2012, les souches productrices de BLSE (CTX-M-1, n=9) ont été prévalentes pour ce sérotype. A noter que la souche qui produisait une BLSE en 2012 présentait également une résistance à haut-niveau pour la ciprofloxacine. Ces souches n'ont pas été retrouvées en 2013.

### 1.3.2.14 Résistance aux antibiotiques du sérotype Infantis de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en :    |                                  |                                  |                                 |                                  |                                  |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                         | <b>1997</b><br>(n=40)<br>(N=179) | <b>2000</b><br>(n=40)<br>(N=151) | <b>2006</b><br>(n=58)<br>(N=105) | <b>2008</b><br>(n=50)<br>(N=92) | <b>2011</b><br>(n=58)<br>(N=165) | <b>2012</b><br>(n=77)<br>(N=228) | <b>2013</b><br>(n=63)<br>(N=182) |
| Amoxicilline            | 2,5                              | 2,5                              | 0                                | 10                              | 3,4                              | 0                                | 1,6                              |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                                | 0                                | 0                                | 0                               | 0                                | 0                                | 0                                |
| Acide nalidixique       | 0                                | 2,5                              | 1,7                              | 8                               | 6,9                              | 9,1                              | 7,9                              |
| Ciprofloxacine          | 0                                | 0                                | 0                                | <b>2</b>                        | 0                                | 0                                | 0                                |
| Sulfamides              | 5                                | 5                                | 0                                | 12                              | 8,6                              | 9,1                              | 7,9                              |
| Triméthoprim            | 5                                | 2,5                              | 0                                | 14                              | 5,2                              | 1,3                              | 1,5                              |
| Chloramphénicol         | 2,5                              | 2,5                              | 1,7                              | 2                               | 0                                | 3,9                              | 3,2                              |
| Tétracycline            | 35                               | 2,5                              | 5,2                              | 20                              | 6,9                              | 7,8                              | 7,9                              |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2009 et 2013, les souches résistantes à l'acide nalidixique présentaient une CMI modale à la ciprofloxacine de 0,38 mg/L.

### 1.3.2.15 Résistance aux antibiotiques du sérotype Kentucky de 2001 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                  |                  |                  |                    |                    |                    |                    |                    |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                         | 2001                          | 2002             | 2004             | 2006             | 2008               | 2010               | 2011               | 2012               | 2013               |
|                         | (n=28)<br>(N=29)              | (n=31)<br>(N=31) | (n=32)<br>(N=34) | (n=55)<br>(N=56) | (n=126)<br>(N=126) | (n=188)<br>(N=207) | (n=144)<br>(N=145) | (n=185)<br>(N=185) | (n=167)<br>(N=169) |
| Amoxicilline            | 21,4                          | 22,6             | 21,9             | 25,5             | 57,1               | 69,4               | 72,9               | 66                 | 71,3               |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                | 0                | 0                | 0                  | <b>4,2</b>         | <b>3,5</b>         | <b>1,6</b>         | <b>3,6</b>         |
| Gentamicine             | 21,4                          | 25,8             | 18,8             | 16,4             | 47,3               | 59,6               | 56,3               | 49,7               | 55,7               |
| Acide nalidixique       | 21,4                          | 25,8             | 25               | 32,7             | 77,7               | 84,5               | 81,2               | 83,7               | 83,8               |
| Ciprofloxacine          | 0                             | <b>3,2</b>       | <b>15,6</b>      | <b>30,9</b>      | <b>74,6</b>        | <b>85,1</b>        | <b>81,2</b>        | <b>82,7</b>        | <b>83,8</b>        |
| Sulfamides              | 31,8                          | 29               | 28,1             | 20               | 51,6               | 68,4               | 63,9               | 54,6               | 58,1               |
| Triméthoprime           | 3,6                           | 3,2              | 15,6             | 3,6              | 4                  | 9,8                | 2,1                | 8,1                | 6,0                |
| Chloramphénicol         | 0                             | 3,2              | 9,4              | 1,8              | 9,5                | 5,7                | 1,4                | 2,1                | 3,0                |
| Tétracycline            | 31,8                          | 35,5             | 25               | 23,6             | 53,2               | 68,4               | 68,1               | 62,7               | 68,9               |
| Azithromycine           | NT                            | NT               | NT               | NT               | NT                 | <b>1,1</b>         | <b>1,4</b>         | <b>3,2</b>         | <b>2,4</b>         |

n : nombre de souches étudiées, N : nombre de souches du sérotype (une seule par patient) reçues au CNR-ESS  
NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

| Profils de résistance<br>%       | 2007<br>n=112 | 2008<br>n=126 | 2009<br>n=131 | 2010<br>n=188 | 2011<br>n=144 | 2012<br>n=185 | 2013<br>n=167          |
|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------------|
| Multi-sensible                   | 26,8          | 19,8          | 9,1           | 11,9          | 13,2          | 14,6          | 12,0                   |
| ASSpGSuTeNalCip*                 | <b>38,4</b>   | <b>27,8</b>   | <b>43,5</b>   | <b>47,2</b>   | <b>48,6</b>   | <b>33,5</b>   | <b>40,7</b>            |
| NalCip*                          | 11,6          | 8,7           | 6,1           | 8,3           | 3,5           | 7             | 6,6                    |
| ANalCip*                         | 4,5           | 14,3          | 13,7          | 6,7           | 4,9           | 12,4          | 8,4                    |
| ASSpGSuCTeNalCip*                |               | 5,6           | 4,6           | 0,5           |               | 1,1           | 1,2                    |
| SSpGSuTeNalCip*                  | 1,8           | 4,7           | 1,5           | 2,1           | 2,8           | 4,3           | 2,4                    |
| ASSuTeNalCip*                    | 1,8           | 4,7           |               | 0,5           | 2,7           |               |                        |
| ATeNalCip*                       | 1,8           | 0,8           | 0,8           | 1,6           | 3,5           | 5,9           | 1,8                    |
| ASSpKGSuTeNalCip*                |               | 1,6           | 3,8           | 0,5           |               |               | 2,4                    |
| TeNalCip*                        |               | 4             | 4,6           | 1             | 0,9           | 2,7           | 3,0                    |
| ACroSuTeNalCip*                  |               |               |               |               |               |               | <b>1,2<sup>a</sup></b> |
| ACroCazFoxNalCip*                |               |               | <b>0,8</b>    |               |               |               |                        |
| ACroCazSSpKTNGSuTmptCTeNalCip*   |               |               | <b>0,8</b>    |               |               |               | <b>0,6<sup>b</sup></b> |
| ACroSSpGSuTeNalCip*              |               |               |               | <b>0,5</b>    |               |               |                        |
| ACroCazSSpKTGNAlSuTmptNalCipAzi* |               |               | <b>0,5</b>    |               |               |               |                        |
| ACroCazFox                       |               |               |               |               | <b>2,7</b>    |               |                        |
| ACazSSpKTNGSuTeNalCip*           |               |               |               |               |               | <b>0,5</b>    |                        |
| ACroCazFoxSSpGSuTeNalCip*        |               |               |               |               |               | <b>1,1</b>    | <b>1,2<sup>a</sup></b> |
| AImpSSpGSuTmptTeNalCipAzi*       |               |               |               |               |               |               | <b>0,6<sup>c</sup></b> |

\* en rapport avec le clone ST198

<sup>a</sup> souche porteuse du gène *bla<sub>CMY-2</sub>*

<sup>b</sup> souche porteuse de gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>*

<sup>c</sup> souche porteuse du gène *bla<sub>OXA-48</sub>*

Depuis 2002, nous assistons à l'émergence de souches hautement résistantes à la ciprofloxacine au sein du sérotype Kentucky lié au clone X1-ST198 (Le Hello et al. J Infect Dis 2011). Les profils majoritaires rencontrés sont « ASSpGSuTeCip », « ACip » et « Cip ». A noter que des souches Cip<sup>R</sup> avec une résistance additionnelle aux C3G et à l'imipénème (souches marocaines produisant VIM-2, souches algériennes et égyptiennes produisant OXA-48) ou à l'azithromycine isolées depuis 2009 ont été décrites par le CNR-ESS (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013).

### 1.3.2.16 Résistance aux antibiotiques du sérotype Montevideo entre 2011 et 2013

| Profils de résistance    | Nombre de souches possédant ce profil en : |              |              |
|--------------------------|--------------------------------------------|--------------|--------------|
|                          | 2011                                       | 2012         | 2013         |
|                          | n=56<br>N=62                               | n=39<br>N=39 | n=56<br>N=56 |
| ASulTmp                  | 1                                          | 0            | 0            |
| A                        | 0                                          | 2            | 1            |
| ACroSSpKTGSuTmpCTeNal*   | 0                                          | 3            | 1            |
| ACroSSpKTGSuTe*          | 0                                          | 1            | 0            |
| ACroSSpKTSuTmpCTe*       | 0                                          | 0            | 1            |
| ACroSSpKTSuTmp*          | 0                                          | 0            | 1            |
| ACroSSpKTSu*             | 1                                          | 0            | 0            |
| ACroSSpKTSuTmpC*         | 1                                          | 0            | 0            |
| ACazFoxSKTNGSuTmpCTeNal* | 0                                          | 0            | 1            |
| SSpSuTmpTe               | 1                                          | 1            | 0            |
| Nal                      | 5                                          | 1            | 1            |
| Tmp                      | 0                                          | 0            | 2            |
| sensible                 | 47                                         | 31           | 48           |

\* souches en lien avec une épidémie hospitalière

En 2011, les 5 souches de *S. enterica* sérotype Montevideo ayant une résistance isolée à l'acide nalidixique possédaient le gène *qnrS1*. Toutes les souches résistantes aux C3G (2011-2013) étaient associées à une épidémie hospitalière (cf paragraphe 1.3.4). Ces souches étaient majoritairement productrices de CTX-M-9 et/ou QnrA1 à l'exception d'une qui produisait DHA-1 et QnrS. Elles possédaient toutes un intégron complexe de classe I.

### 1.3.2.17 Résistance aux antibiotiques du sérotype Newport de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                    |                    |                  |                    |                    |                   |                   |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|                         | 1997                          | 2000               | 2003               | 2006             | 2008               | 2009               | 2012              | 2013              |
|                         | (n=40)<br>(N=170)             | (n=100)<br>(N=109) | (n=126)<br>(N=138) | (n=88)<br>(N=91) | (n=118)<br>(N=120) | (n=137)<br>(N=137) | (n=40)<br>(N=118) | (n=42)<br>(N=120) |
| Amoxicilline            | 27,5                          | 27                 | 19,8               | 10,2             | 6,8                | 3,6                | 5                 | 16,7              |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 15                 | 17,5               | 8                | 4,2                | 0,7                | 5                 | 2,4               |
| Gentamicine             | 2,5                           | 4                  | 1,6                | 0                | 0,8                | 0                  | 0                 | 0                 |
| Acide nalidixique       | 15                            | 23                 | 1,6                | 1,1              | 3,4                | 2,9                | 2,5               | 4,8               |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                  | 0                  | 0                | 0                  | 0                  | 0                 | 0                 |
| Sulfamides              | 27,5                          | 29                 | 19,8               | 11,4             | 7,6                | 4,4                | 5                 | 4,8               |
| Triméthoprim            | 27,5                          | 10                 | 1,6                | 3,4              | 1,7                | 2,2                | 2,5               | 4,8               |
| Chloramphénicol         | 25                            | 25                 | 15,9               | 9,1              | 5,9                | 2,2                | 2,5               | 0                 |
| Tétracycline            | 45                            | 27                 | 19                 | 12,5             | 9,3                | 7,3                | 2,5               | 9,5               |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Depuis 2000, des souches résistantes aux C3G sont détectées pour ce sérotype avec des fréquences variables suivant les années. L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance ont permis d'identifier la production de la céphalosporinase plasmidique CMY-2. Ces souches de phénotype ACazSSuCTe (ou plus rarement ACazSSpKToGSuCTe et ACazSKSuCTe) sont apparues durant la dernière décennie chez les bovins aux Etats-Unis (après l'autorisation d'utilisation d'une C3G, le ceftiofur pour le traitement de la pneumonie des bovins). Une analyse rétrospective nous a permis d'individualiser en 2000, un foyer de cas groupés dans la

région parisienne. En 2003, une petite épidémie suite à la consommation de viande de cheval insuffisamment cuite a été détectée dans le Nord de la France (Espié et al. Epidemiol Infect 2005). Toutes les souches résistantes aux C3G isolées entre 2000 et 2005 ont été caractérisées au CNR-ESS et publiées (Egorova et al. Emerg Infect Dis 2008).

Depuis 2005, 13 nouvelles souches de phénotype ACazSSuCTe, ACazSSuTe ou ACazSKSuCTe ont été confirmées comme productrices de CMY-2. En 2013, une seule souche résistante aux C3G a été isolée (BLSE de type CTX-M).

### 1.3.2.18 Résistance aux antibiotiques du sérotype Virchow de 1997 à 2013

| Antibiotique            | % de souches résistantes en : |                   |                    |                  |                    |                  |                  |                  |                  |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                         | 1997                          | 2000              | 2003               | 2004             | 2005               | 2007             | 2010             | 2012             | 2013             |
|                         | (n=50)<br>(N=501)             | (n=50)<br>(N=239) | (n=100)<br>(N=157) | (n=77)<br>(N=88) | (n=100)<br>(N=114) | (n=74)<br>(N=79) | (n=57)<br>(N=63) | (n=66)<br>(N=67) | (n=55)<br>(N=55) |
| Amoxicilline            | 26                            | 6                 | 14                 | 20,8             | 11                 | 20,3             | 5,3              | 12,1             | 27,3             |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0                             | 0                 | 3                  | 6,5              | 3                  | 4                | 1,8              | 1,5              | 0                |
| Gentamicine             | 0                             | 0                 | 1                  | 2,6              | 1                  | 1,4              | 3,5              | 7,6              | 9,1              |
| Acide nalidixique       | 24                            | 48                | 35                 | 41,6             | 51                 | 43,2             | 33,3             | 40,9             | 36,7             |
| Ciprofloxacine          | 0                             | 0                 | 0                  | 0                | 1                  | 0                | 0                | 0                | 0                |
| Sulfamides              | 12                            | 4                 | 17                 | 31,2             | 16                 | 29,7             | 17,5             | 15,2             | 16,4             |
| Triméthoprim            | 20                            | 2,4               | 18                 | 29,9             | 15                 | 29,7             | 8,8              | 13,6             | 10,9             |
| Chloramphénicol         | 6                             | 6                 | 2                  | 5,2              | 0                  | 16,2             | 0                | 0                | 1,8              |
| Tétracycline            | 24                            | 10                | 16                 | 23,4             | 16                 | 25,7             | 14               | 16,7             | 27,3             |

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

A partir de 2003, des souches résistantes aux C3G ont été détectées chez le sérotype Virchow. L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance des souches isolées entre 2003 et 2005 (Weill et al. J Clin Microbiol 2004 et Bertrand et al. J Clin Microbiol 2006) ont permis d'identifier les BLSE CTX-M-2 (phénotype ACroSuTmptTeNal, prévalence de 2 % en 2003, de 6,5 % en 2004 et de 1% en 2005), CTX-M-9 (phénotype ACroSSpKSuTmptTeNal, prévalence de 1 % en 2003), TEM-52 (phénotype ACazNal, prévalence de 1 % en 2005) et SHV-12 (phénotype ACazSSpKGSuTmptCTeNal, prévalence de 1 % en 2005).

Les 3 souches en 2007 avaient les profils « ACazNal » (TEM-52, n= 1; CTX-M-32, n=1) et « ACroSSpKSuTmptTeNal » (CTX-M-9, n=1) et les 4 souches résistantes aux C3G en 2009 avaient les profils « ACazNal » (TEM-52, n=3) et « ACroSSpSuTmptNal » (CTX-M-9, n=1). Une souche de profil « ACazNal » (TEM-52) a été isolée en 2010. En 2011 et 2013, aucune souche résistante aux C3G n'a été isolée. En 2012, on note une souche de BLSE de profil « ACroSSpSuTmptNal » (CTX-M). Depuis 2012, on note des souches exprimant un gène *qnrS* (6 en 2012 et 9 en 2013, dont 5 associées avec un voyage en Tunisie).

### 1.3.2.19 Souches de *Salmonella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques détectées au CNR-ESS en 2013

#### 1.3.2.19.1 Souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

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

#### *a- Salmonella productrices de b-lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2013*

| Sérotype        | N <sup>1</sup> | Lieu de l'isolement                | Type de la BLSE         | Résistance associée <sup>2</sup>                         | Souche                                 | Renseignements épidémiologiques      |
|-----------------|----------------|------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|
| Albany          | 2              | Saint Gregoire (35)                | CTX-M-1                 | SuTe                                                     | 2013/02297<br>2013/02416               | Contexte inconnu                     |
| Brandenburg     | 1              | Vichy (03)                         | CTX-M-32                | SSpKTNGSuTmpTeNalCip                                     | 2013/02997                             | Epidémie hospitalière Vichy          |
| Derby           | 1              | Arras (62)                         | CTX-M-9                 | SSpSuTe                                                  | 2013/00624                             | Contexte inconnu                     |
| Corvallis       | 1              | Aubenas (07)                       | CTX-M <sup>3</sup>      | SSpGSuTmpCTeNal <sup>5</sup>                             | 2013/00930                             | Séjour en Thaïlande                  |
| Infantis        | 1              | Chambery (73)                      | CTX-M-9                 | SSpKTGSuTmpCTeNal                                        | 2013/06797                             | Séjour au Pérou                      |
| Kentucky        | 3              | France entière                     | CTX-M-1 (2)<br>CTX-M-15 | SuTeNalCip<br>SSpKTNGSuTmpCTeNalCip                      | 2013/05893<br>/05899/11949             | Séjour au Portugal, Algérie ou Maroc |
| Montevideo      | 3              | Limoges (87)                       | CTX-M-9                 | SSpKTSuTmpCTe<br>SSpSuTmp<br>SSpSuTmpCTeNal <sup>4</sup> | 2013/00211<br>2013/00821<br>2013/11050 | Epidémie hospitalière Limoges        |
| Newport         | 1              | Toulon (83)                        | CTX-M <sup>3</sup>      | SuTmpTe                                                  | 2013/00539                             | Contexte inconnu                     |
| Paratyphi B dt+ | 2              | Dijon (21)<br>Chatillon/seine (21) | CTX-M-1                 | Aucune                                                   | 2013/00434<br>2013/00498               | Contexte inconnu                     |
| Saintpaul       | 1              | Saint-Flour (15)                   | CTX-M-9                 | SuTe                                                     | 2013/10992                             | Séjour en Thaïlande                  |
| Typhimurium     | 2              | La Reunion                         | CTX-M-1<br>CTX-M-55     | SuTe<br>STGSuCTe                                         | 2013/07649<br>2013/                    | Séjour à La Reunion                  |
|                 | 1              | Charenton/pont (94)                | CTX-M <sup>3</sup>      | SSpSuTmpCTeNal                                           | 2013/01092                             | Contexte inconnu                     |
|                 | 1              | Rodez (12)                         | CTX-M <sup>3</sup>      | SuTmpTe                                                  | 2013/02357                             | Contexte inconnu                     |
|                 | 2              | Loray (25)<br>Wissous (91)         | CTX-M-9                 | SSpSuTmpCTe                                              | 2013/08619<br>2013/12461               | Contexte inconnu                     |

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

<sup>2</sup>Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; T, tobramycine; G, gentamicine; A, amikacine; N, netilmicine; I, isépamicine ; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine; Azi, azithromycine.

<sup>3</sup>Groupage par PCR. Séquençage en cours pour détermination précise de l'allèle.

<sup>4</sup>Présence du gène de résistance aux quinolones *qnrA1*.

<sup>5</sup>Présence du gène de résistance aux quinolones *qnrS*.

*b- Salmonella productrices de céphalosporinases plasmidiques reçues au CNR-ESS en 2013*

| Sérotype    | N <sup>1</sup> | Lieu de l'isolement  | Type de la céphalosporinase | Résistance associée <sup>2</sup>        | Souche                   | Renseignements épidémiologiques |
|-------------|----------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 4,5,12:-:-  | 1              | Corbeil-Essones (91) | CMY-42                      | TeNal                                   | 2013/7796                | Contexte inconnu                |
| Heidelberg  | 1              | Nouvelle-Calédonie   | CMY-2                       | Nal                                     | 2013/03763               | Séjour en Nouvelle-Calédonie    |
| Kentucky    | 2              | France entière       | CMY-2                       | SSpGSuTeNalCip<br>SSpKTNGSuTmpCTeNalCip | 2013/01327<br>2013/11949 | Contexte inconnu                |
| Montevideo  | 1              | Limoges (87)         | DHA-1                       | SKTNGSulTmpCTeNal <sup>3</sup>          | 2013/05352               | Epidémie hospitalière Limoges   |
| Typhimurium | 1              | Nouvelle-Calédonie   | CMY-2                       | SuTe                                    | 2012/04642               | Séjour en Nouvelle-Calédonie    |

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

<sup>2</sup>Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Ak, amikacine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine.

<sup>3</sup>Présence du gène de résistance aux quinolones *qnrS*.

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

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

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



*c- Salmonella productrices de carbapénémases reçues au CNR-ESS en 2009-2013*

| Sérotype    | Année | N <sup>1</sup> | Lieu de l'isolement | Type de la carbapénémase | Phénotype de résistance <sup>2</sup> | Souche                                 | Renseignements épidémiologiques |
|-------------|-------|----------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
| Kentucky    | 2010  | 5              | Maroc               | VIM-2                    | AcroCazFoxSSpKTNGAISu<br>TeNalCip    | 2010/01922-<br>1923-1924-<br>1925-1926 | Maroc                           |
| Kentucky    | 2011  | 1              | Nantes (44)         | OXA-48                   | ANalCipAzi                           | 2010/00664                             | Séjour en Egypte                |
| Kentucky    | 2013  | 1              | Argenteuil (95)     | OXA-48                   | SSpGSuTmpTeNalCipAzi                 | 2013/01062                             | Séjour en Algérie               |
| Saintpaul   | 2009  | 1              | Nantes (44)         | OXA-48                   | A                                    | 2009/07981                             | Séjour en Egypte                |
| Westhampton | 2012  | 1              | La Réunion          | NDM-1                    | ACroCazFoxSSpKTNGAISu<br>NalCipAzi   | 2012/02116                             | Séjour en Inde                  |

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

<sup>2</sup>Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Ak, amikacine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine.

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

### 1.3.2.19.2 Souches résistantes à la ciprofloxacine

La résistance à la ciprofloxacine est définie *in vitro* par une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 1 mg/L (communiqué 2011 du CA-SFM). Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont principalement des modifications au niveau du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. L'accumulation de mutations et la présence additionnelle d'un mécanisme d'efflux ou de facteurs plasmidiques comme les gènes *qnr* et le gène *aac6'-Ib-cr* augmentent le niveau de résistance de ces souches.

*a- Souches du sérotype Typhimurium et 1,4,[5],12:i:- (monophasique) résistantes à la ciprofloxacine détectées au CNR-ESS entre 2002 et 2013*

Ces souches pour la plupart isolées de 2002 à 2008 possédaient une CMI à la ciprofloxacine supérieure à 16 mg/L. Une étude des mécanismes de résistance à la ciprofloxacine a montré que ces souches présentaient deux substitutions significatives dans GyrA (Ser83Phe et Asp87Asn), une dans GyrB (Ser464Phe) et une dans ParC (Ser80Arg). Un mécanisme d'efflux était également présent. Une étude par électrophorèse en champ pulsé (*Xba*I et *Bln*I) ainsi qu'une étude par les méthodes MLVA et CRISPOL a montré que ces souches étaient clonales, à l'exception des deux souches isolées en 2009 (XTYM-118) et qui présentaient une CMI plus basse à 2 mg/L.

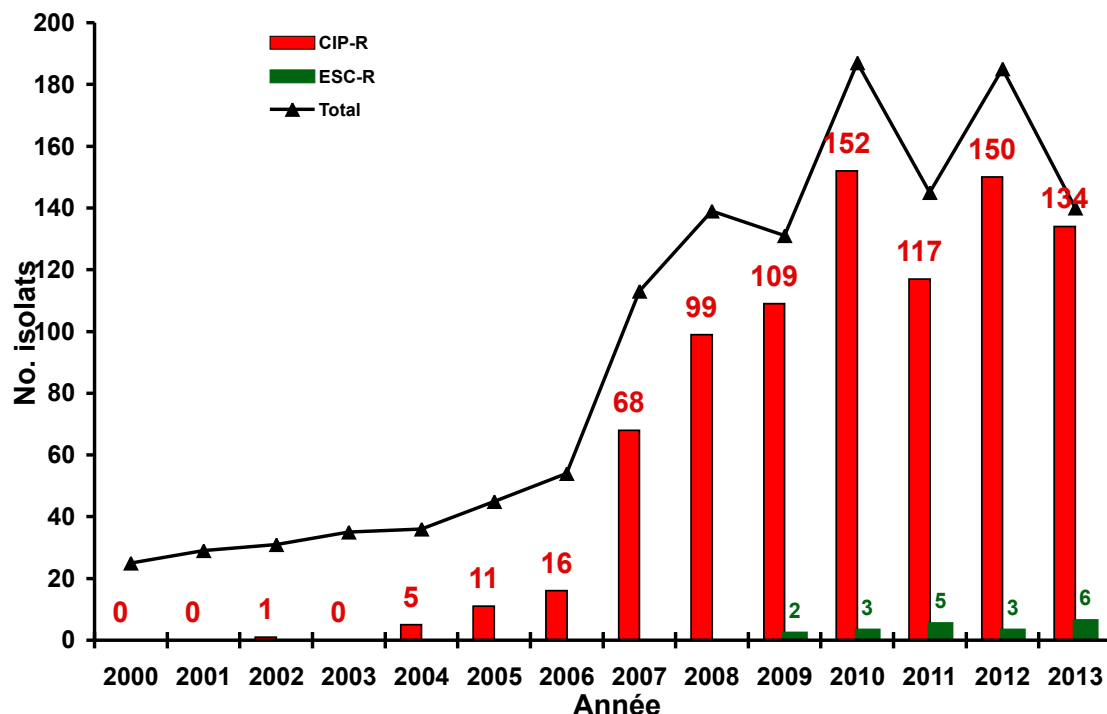
Les souches résistantes à la ciprofloxacine (Cip<sup>R</sup>) en dehors du sérotype Kentucky (voir ci-dessous) sont exceptionnelles dans le genre *Salmonella*. Les différentes études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR entre 1997 et 2007 sur 6880 souches échantillonnées appartenant aux 15 principaux sérotypes n'avaient mis en évidence que deux souches résistantes (< 0,1 %). Il s'agissait d'une souche de sérotype Typhimurium (02-8213) isolée en 2002 et d'une souche de sérotype Virchow (05-1106) isolée en 2005. Les différentes souches de sérotype Typhimurium mentionnées dans le tableau précédent ont été identifiées hors étude de prévalence par l'analyse des résultats d'antibiogrammes fournis systématiquement par les

laboratoires correspondants en même temps que les souches à sérotyper. La faible prévalence de ces souches Cip<sup>R</sup> sur le territoire national ainsi que sur le plan international pourrait être expliquée par une diffusion liée à un contact direct avec des nouveaux animaux de compagnie (dont les reptiles) porteurs sains (la souche ayant vraisemblablement été sélectionnée par l'usage prophylactique d'enrofloxacin dans les animaleries). De telles souches ont été décrites comme émergentes en Chine (Cui et al. *Emerg Infect Dis.* 2008, Xia et al. *J Clin Microbiol.* 2009). Une analyse comparative des profils PFGE et CRISPOL a montré que nos souches, les souches chinoises et des souches vietnamiennes étaient clonales. Une recherche chez des reptiles d'importation est toujours en cours mais aucun cas humain n'a été identifié depuis 2010.

*b- Souches du sérotype Kentucky résistantes à la ciprofloxacine détectées au CNR-ESS, 2000-2013*

Nous avons publié en 2006 (Weill et al. *Emerg Infect Dis*) une étude sur des souches de sérotype Kentucky Cip<sup>R</sup> reçues au CNR-ESS entre 2002 et 2005. Pendant cette période, 197 souches humaines ont été analysées au CNR *Salmonella* (sur un total de 69,759 souches de *Salmonella* sérotypées) et 17 étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 4 et 16 mg/L). Nous avons établi une surveillance continue et prospective sur ces souches responsables de l'émergence actuelle de ce sérotype (**Figure 5**).

**Figure 5.** Evolution du nombre de souches du sérotype Kentucky détectées au CNR-ESS selon leur profil de résistance



La première souche de sérotype Kentucky Cip<sup>R</sup> avait été isolée en décembre 2002 en France chez un touriste français qui avait souffert d'une gastroentérite au cours d'une croisière sur le Nil. Depuis, un nombre croissant de ces souches avait été isolé lors de salmonelloses au cours ou au décours d'un voyage en Egypte ou en Afrique de l'Est (2000-2005) puis Afrique du Nord (Maroc principalement) et Afrique de l'Ouest (2006-2009).

Le typage moléculaire a révélé que ces souches appartenaient à un seul clone « X1-ST198-SGI1-Ks » défini par le profil PFGE X1, le séquençotype ST198 et la présence de l'îlot génomique SGI1 variant –Ks (et ses dérivés –Ps, -Qs). L'étude des mécanismes de résistance à la ciprofloxacine avait identifié deux substitutions significatives dans GyrA (Ser83Phe et Asp87Gly/Asn ou Tyr) et une dans ParC (Ser80Ile).

Une collaboration internationale a révélé l'émergence, à l'échelon mondial, de ce clone et la similarité des souches humaines Cip<sup>R</sup> avec des souches aviaires (poulets et dindes), aquacoles (fruits de mer) et environnementales (épices) de pays d'Afrique (Le Hello et al. J Infect Dis 2011, Le Hello et al. Antimicrob Agents Chemother 2013 et Le Hello et al. Front Microbiol 2013).

Le suivi de ce clone par le CNR-ESS indique que cette souche s'est installée en Europe (élevage de dinde en Pologne), au Moyen-Orient, dans le sous-continent Indien et en Asie du Sud-Est et présente, désormais, des résistances additionnelles aux C3G (CTX-M, CMY ou SHV) ou aux carbapénèmes (OXA-48 ou VIM-2) (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013).

Très récemment, les premières souches de Kentucky CIP<sup>R</sup> ont été isolées d'élevage de volailles françaises (Guillon et al. BE 2013)

### 1.3.2.19.3 Souches de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine d'origine plasmidique en 2013

La résistance aux fluoroquinolones peut être également le fait de facteurs plasmidiques comme les gènes *qnr A, B, S* et le gène variant *aac6'-Ib-cr* qui augmentent le niveau de résistance de ces souches aux fluoroquinolones. Les études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR-ESS par échantillonnage en 2013 permettent de confirmer la présence de ces gènes pour les souches suivantes :

| Sérotype  | N | Lieu probable de contamination           | CMI (mg/L) |      |                  | Résistance associée          | gène impliqué | Souche                                                                                         |
|-----------|---|------------------------------------------|------------|------|------------------|------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
|           |   |                                          | Nal        | CIP  | AZI <sup>1</sup> |                              |               |                                                                                                |
| Agona     | 1 | France                                   | 12         | 0,25 | 3                | ASSuTmpTe (TEM)              | <i>qnrS</i>   | 2013/07357                                                                                     |
| Corvallis | 7 | Thaïlande (2)<br>Inconnu (5)             | 16-32      | 0,38 | 3                | Aucune                       | <i>qnrS</i>   | 2013/00445<br>2013/01905<br>2013/02550<br>2013/05407<br>2013/06126<br>2013/08209<br>2013/11900 |
|           | 3 | Laos (1)<br>Thaïlande (1)<br>Inconnu (1) | 24         | 0,5  | 3                | SSuTe                        | <i>qnrS</i>   | 2013/02308<br>2013/06298<br>2013/09410                                                         |
|           | 1 | Thaïlande (1)                            | 24         | 0,38 | 3                | ATG (TEM)                    | <i>qnrS</i>   | 2013/08559                                                                                     |
|           | 1 | Thaïlande                                | 12         | 0,25 | 2                | ACroSSpGSuTmpCTe (CTX-M)     | <i>qnrS</i>   | 2013/00930                                                                                     |
|           | 1 | Inconnu (1)                              | 12         | 0,25 | 192              | SpSuTmpTeAzi <sup>3</sup>    | <i>qnrB</i>   | 2013/010430                                                                                    |
|           | 1 | Limoges                                  | 64         | 0,38 | 8                | ACazFoxSKTNGSuTmpCTe (DHA-1) | <i>qnrS</i>   | 2013/05352                                                                                     |
|           |   | Limoges                                  | 24         | 0,19 | 4                | ACroSSpSuTmpCTe (CTX-M-9)    | <i>qnrS</i>   | 2013/11050                                                                                     |
|           | 6 | Tunisie (2)<br>Inconnu (4)               | 12-24      | 0,38 | 3-4              | STe                          | <i>qnrS</i>   | 2013/06317<br>2013/06425<br>2013/06735<br>2013/06827<br>2013/08394<br>2013/08708               |
|           | 1 | Inconnu (2)                              | 16-24      | 0,38 | 3                | Te                           | <i>qnrS</i>   | 2013/06566<br>2013/08047                                                                       |
|           | 1 | Tunisie (1)                              | 12         | 0,38 | 3                | SSuTe                        | <i>qnrS</i>   | 2013/07985                                                                                     |

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

<sup>2</sup>Abréviations utilisées: A, amoxicilline; Fox, cétoxiline; Cro, ceftriaxone; Caz, ceftazidime; S, streptomycine ; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; T, tobramycine; G, gentamicine; N, nétilmicine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Azi, azithromycine.

<sup>3</sup>Présence du gène *mphA* codant pour la résistance à l'azithromycine

La majorité des souches ayant acquis une résistance diminuée à la ciprofloxacine médiée par un plasmide possédaient le gène *qnrS*. Elles ont été isolées chez des patients qui revenaient majoritairement d'un séjour en Asie (Corvallis) ou de Tunisie (Virchow).

### 1.3.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

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

Les souches étudiées au CNR-ESS dont les formules antigéniques ne figurent pas dans le schéma de White-Kauffmann-Le Minor sont transmises pour validation au Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella* (CCOMS) dont les responsables sont ceux du CNR-ESS. En 2013, le CNR-ESS a adressé au CCOMS les putatifs nouveaux sérotypes ou nouveaux variants suivants:

- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 67:d:1,7
- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 6,7:g,m,s:e,n,z15
- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 17:r:1,5
- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 44:z:z6
- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 9,12:a:z6
- le putatif nouveau sérotype de sous-espèce *salamae* de formule 21:z4,z23:-
- le putatif nouveau variant par absence du O:6 du sérotype Beaudesert (14:e,h:1,7)

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

### 1.3.4 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux à *Salmonella* en 2013

En 2013, le CNR-ESS a participé aux investigations des cas groupés à *Salmonella* suivantes :

- à l'investigation microbiologique suite au signalement fin avril 2012 par le laboratoire du CHU de Limoges d'infections nosocomiales à *Salmonella* productrices de BLSE dans un service mère-enfant d'un centre hospitalier spécialisé. Au total, 14 cas de salmonelloses à *S. enterica* sérotype Montevideo sont survenus chez des enfants de moins de 1 an. Le CNR a identifié avec le laboratoire du CHU de Limoges les déterminants de multi-résistance aux antibiotiques des souches. La majorité des souches produisaient une BLSE (CTX-M-9) et QnrA1. Une information et un isolement pour chaque patient ont été effectués. Une réalisation de nettoyage-désinfection de l'unité a été effectuée fin mai. Cette étape a été renouvelée suite à la déclaration d'un nouveau cas quelques jours après. L'unité a été fermée début juin. L'investigation n'a pas permis d'identifier un porteur parmi le personnel, un matériel ou un aliment contaminé. De nouveaux cas sont apparus depuis février 2013 et devant la concomitance d'autres enterobactéries produisant le même type de BLSE dans les

selles de ces mêmes patients (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*,...) une campagne de prélèvements environnementaux ciblés a été effectuée par le LNR *Salmonella* (ANSES-Ploufragan). Au total sur 105 prélèvements environnementaux réalisés en novembre 2013, un seul prélèvement a identifié une souche de sérotype Montevideo sur le sol de la chambre d'un enfant porteur toujours hospitalisé (souche sensible aux antibiotiques) et 85% identifiaient une autre bactérie résistante soit au cefotaxime soit à la ceftazidime, soit aux deux. La très grande majorité de ces cultures mettait en évidence la présence de bactéries environnementales de type *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp mais 17 prélèvements mettaient en évidence la présence d'une entérobactérie dont la résistance était portée par le même plasmide que celui retrouvé chez le sérotype Montevideo. Devant de telles sources de contaminations environnementales par des bactéries multi-résistantes dont des salmonelles, une évaluation des pratiques d'entretien a permis de constater des pratiques non optimales en matière de précautions standard et d'entretien des locaux. Un suivi pédagogique a été effectué avec le soutien de l'ARLIN. Aucun nouveau cas n'a été déclaré depuis septembre 2013. La vigilance est encore en cours.

- Au signalement et à l'investigation microbiologique concernant la survenue d'une épidémie concomitante à *S. enterica* sérotype Typhimurium et à sérotype 4,12:i:- au cœur de Paris (Paris 7<sup>ème</sup>) en janvier 2014. L'approche microbiologique a été d'employer la méthode de sous-typage à haut-débit CRISPOL, mise au point par le CNR-ESS en 2009 (Fabre et al. PLoS One 2012) pour toutes les souches de sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques isolées à Paris. Au total 39 cas de Typhimurium CT51 et 16 cas de 4,12:i:- CT1 ont été reliés suite à la contamination d'un traiteur parisien chez lequel les deux souches pré-citées ont été retrouvées sur des prélèvements alimentaires et environnementaux. La fermeture administrative le 18/01/2014 a permis de mettre fin à l'épidémie. Le restaurant a ré-ouvert après mise la mise en conformité imposée (prélèvements réguliers, formation du personnel....) le 04/02/2014. Aucun nouveau cas n'a été déclaré depuis le 21/01/2014.
- à l'investigation microbiologique d'une épidémie de salmonellose à *S. enterica* sérotype Bovismorbificans associée à la consommation de viande de porc en mars 2013 en Auvergne. Entre mi-février et fin avril 2013, 14 cas confirmés (avec typage PFGE de la souche) et 4 cas probables ont été identifiés par le CNR, puis transmis à l'InVS pour investigation. L'enquête alimentaire a montré que tous les cas interrogés avaient consommé de la viande de porc dans les jours ayant précédé la survenue des signes, qu'elle soit fraîche ou préparée en charcuterie. Cinq souches de salmonelles ont pu être isolées d'un reste de saucisson conservé au domicile d'un des cas. Le profil PFGE de ces souches était identiques à celui des cas humains. Les produits issus de l'élevage incriminé (saucissons et poitrines notamment) entreposés dans un séchoir de la salaison ont été bloqués.
- à l'investigation microbiologique de deux demandes de comparaison de souche de *S. enterica* sérotype Typhimurium dans le cadre de transmissions nosocomiales en mars et en juin 2013 au C.H.I. Poissy-Saint Germain et au C.H. de Nanterre, respectivement. L'approche microbiologique a été la même pour ces deux enquêtes en effectuant une comparaison des souches par la méthode de sous-typage à haut-débit CRISPOL. Cette méthode a permis de conforter l'hypothèse épidémiologique d'une transmission au sein de l'hôpital de Poissy de 6 cas secondaires à Typhimurium CT95 et au sein l'hôpital de Nanterre d'un cas secondaire à Typhimurium à CT28 entraînant

le décès du patient. Ce CT28 correspond au clone ST313 de Typhimurium récemment décrit comme circulant largement en Afrique sub-saharienne et présentant une caractéristique d'invasivité, atypique pour un sérotype mineur (Ley B et al. Emerg Infect Dis 2014). Des mesures d'isolement et de contrôles spécifiques entreprises par les services concernés ont permis de mettre fin à ces transmissions nosocomiales.

- à l'investigation d'une double toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à *S. enterica* sérotype Enteritidis. Le 26 juin 2014, l'agence régionale de Santé (ARS) d'Ile-de-France a été informée de 2 TIAC concomitantes lors de 2 brunchs à Paris (3<sup>ème</sup>) et à Saint-Brice (95). Ces repas avaient été préparés par le même traiteur casher. L'enquête a permis d'identifier 28 personnes ayant déclaré des signes de gastroentérite fébrile sur 100 convives à Paris et 23 cas sur 100 personnes à Saint Brice, entre le 24 et 26 juin 2014. Le CNR a réalisé l'antibiogramme et un sous-typage moléculaire par MLVA et CRISPR sur 5 souches des deux TIAC. Les 5 souches présentaient une résistance isolée à l'acide nalidixique et le même profil CRISPR A6-B7 et MLVA-Enteritidis (4-6-3-1-11, selon Hopkins et al. Euro Surveill 2011). Ce profil a été retrouvé pour une souche isolée d'un membre du personnel du traiteur. Devant l'absence de salmonelles sur 60 œufs blancs d'origine espagnole et des résultats vétérinaires négatifs des autorités espagnoles concernant l'élevage des poules à l'origine des œufs consommés lors des 2 brunchs, l'hypothèse de contamination privilégiée par la DDPP de Paris reste celle du porteur sain travaillant chez le traiteur.
- à l'investigation microbiologique d'un cas groupé de salmonellose à *S. enterica* sérotype Abony survenue chez des enfants de moins de un an en région Pays de la Loire en juin 2013. Au cours des investigations épidémiologiques, l'interrogatoire des cas avait mis en évidence une exposition à des tortues au domicile des parents et des grands parents. Les investigations microbiologiques renforçaient cette hypothèse avec les résultats de la comparaison des souches humaines et vétérinaires par PFGE. Les seules mesures possibles de prévention étaient de réduire au maximum les contacts directs ou indirects avec les tortues. L'acquisition d'un reptile dans les foyers avec un enfant de moins de 5 ans est déconseillée (Colomb-Cotin et al. BEH 2014).
- à l'investigation microbiologique d'une TIAC à *S. enterica* sérotype Muenster à Fréjus fin août 2013. L'analyse microbiologique par PFGE de plusieurs souches de sérotype Muenster issues des épidémies précédemment investiguées par le CNR (épidémie fromage de chèvre 2008, cluster épidémique 2012 du Var...) indiquent la circulation endémique de certaines souches en France. Ainsi la souche épidémique « Fréjus » présente le même profil PFGE que celui retrouvé dans les analyses alimentaires d'une pâtisserie et que d'autres souches isolées en 2008 hors contexte épidémique.
- à l'alerte et à l'investigation d'une augmentation de cas de salmonelloses à *S. enterica* sérotype Putten en septembre 2013 dans un large quart Nord-Ouest de la France. Les investigations épidémiologiques et microbiologiques suggéraient qu'un établissement producteur de charcuterie était à l'origine de cette épidémie de salmonellose. Des mesures de contrôle au sein de l'établissement ont été mises en place. Une surveillance renforcée avec interrogatoire de chaque nouveau cas de sérotype Putten signalé par le CNR a été mise en place afin de vérifier l'efficacité des mesures. Les derniers cas ayant rapporté la consommation de charcuterie du fabricant ont débuté leurs symptômes le 17/09/2013.

- à l'alerte et à l'investigation de salmonellose à *S. enterica* sérotype Agona en octobre 2013 à Salon-de-Provence. L'achat de volailles ou d'œufs chez un même volailler de Miramas a été retrouvé pour 3 des 5 patients (60%). Le volailler suspecté avait fait l'objet avant l'investigation des cas d'une inspection et de mesures de gestion (nettoyage désinfection) proposées par la DDPP des Bouches-du-Rhône. Cette inspection faisait suite à la détection par les autocontrôles de l'exploitant de souches de ce même sérotype Agona et qui présentait le même profil PFGE que les cas humains. Le volailler de Miramas a détecté récemment la présence de ce sérotype dans son abattoir. Le problème n'est donc pas totalement résolu.
- à la participation à l'investigation de l'augmentation européenne de cas de salmonelloses à *S. enterica* sérotype Mikawasima en octobre-novembre 2013. L'augmentation des cas humain s'est d'abord manifestée au Royaume Uni en octobre 2013 puis a pris une dimension internationale dont la France. En effet, le CNR a rapporté 18 cas avec ce sérotype rare qui habituellement ne concerne que moins de 5 cas par an. Les investigations moléculaires menées ont montré un profil PFGE identique chez les souches anglaises et danoises. Le CNR qui a effectué une analyse PFGE par *XbaI* de 20 souches historiques et récentes a révélé un pouvoir de discrimination faible de cette méthode sur ce sérotype ce qui ne permettait pas de faire le lien entre les souches circulantes en Europe. Le dernier cas à sérotype Mikawasima a été identifié par le CNR-ESS le 09/01/2014.
- à l'investigation microbiologique à la demande de la Cire Antilles-Guyane de souches humaines et environnementales de *S. enterica* sérotype Panama dans le cadre d'une méningite létale en Martinique. Les souches isolées du LCR de la patiente décédée et des prélèvements (chiffonnettes et fientes volailles) étaient des salmonelles de même sérotype (Panama), de même antibiotype (sensible aux antibiotiques) et indistinguables en PFGE. Ces éléments supportent l'hypothèse d'une salmonellose sévère après contact avec son environnement proche. Cependant, ce profil PFGE, retrouvé dans une majeure partie des souches de sérotype Panama de Martinique, ne permet pas d'exclure une éventuelle autre origine de contamination. Ces données microbiologiques sont à relier avec une enquête épidémiologique qui va être menée à large échelle par l'ARS sur l'épidémiologie des souches de sérotype Panama circulantes en Martinique.
- à l'alerte et à l'investigation d'une augmentation de cas d'infections dues à *S. enterica* sérotype Paratyphi A chez des voyageurs de retour du Cambodge durant toute l'année 2013. Après une notification de cette augmentation de cas par la France sur la plateforme épidémiologique européenne EPIS et un « Early Warning Response System (EWRS) message », l'ECDC a posté un "rapid risk assessment" sur leur site internet. Suite à cela, 35 cas ont été identifiés au 23/09/2013, principalement en France (21 cas), en Allemagne (5 cas), aux Pays-Bas (3 cas), en Norvège (1 cas), au Royaume Uni (1 cas) et en Nouvelle-Zélande (4 cas). Cette épidémie a été confirmée localement et sévit toujours en 2014 (Tourdjman et al. Euro Suveill 2013 et Vlieghe et al. Euro Suveill 2013). Une étude microbiologique par de la génomique épidémiologique est programmée par le CNR.



### **1.3.5 Contribution à la diffusion des données de surveillance et production du CNR**

Les rapports d'activité complets du CNR-ESS (depuis celui de 2003) sont consultables (fichiers pdf) sur le site web de l'Institut Pasteur à l'adresse suivante :

[www.pasteur.fr/cnr/salmonelles](http://www.pasteur.fr/cnr/salmonelles)

*Escherichia coli*

## 2/ *Escherichia coli*

### 2.1 Missions du CNR

Voir annexe 1

### 2.2 Activités d'expertise pour l'année 2013

#### 2.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2013

Pour l'année 2013, le CNR a mis en place en routine le sous typage des gènes *stx*.

#### 2.2.2 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ESS-LA en 2013

En 2013, un total de 1170 souches de *E. coli*, 736 prélèvements de selles, 434 sérums ont été analysés au CNR-ESS.

La répartition des différents types de prélèvements, leur origine et leur nombre sont résumés dans le **tableau 1** ci-dessous.

| Activité       | Type de prélèvement                  | CNR-ESS    | LA-RD      | Total       |
|----------------|--------------------------------------|------------|------------|-------------|
| <i>E. coli</i> | Selles ou écouvillonnage rectal      | 256        | 480        | 736         |
|                | Sérums                               | 434        | -          | 434         |
|                | Extrait d'ADN de selles              | -          | 9          | 9           |
|                | Souches humaines isolées de :        |            |            |             |
|                | Selles ou écouvillonnage rectal/anal | 858        | 99         | 957         |
|                | Biopsies                             | 37         | 5          | 42          |
|                | LCR                                  | -          | 6          | 6           |
|                | Sang                                 | 3          | 57         | 60          |
|                | Urines                               | 7          | 25         | 32          |
|                | Pus/plaie/abcès                      | 3          | 1          | 4           |
|                | Prélèvement vaginal                  | 1          | 1          | 2           |
|                | Liquide articulaire                  | 1          | 3          | 4           |
|                | Liquide péritonéal                   | 4          | 1          | 5           |
|                | Placenta                             | -          | 1          | 1           |
|                | Liquide gastrique                    | 1          | 5          | 6           |
|                | Non précisé                          | 1          |            | 1           |
|                | Autres                               | 2          | 2          | 4           |
|                | <b>Sous-total souches humaines</b>   | <b>918</b> | <b>206</b> | <b>1124</b> |
|                | Autres origines                      |            |            |             |
|                | Origine animale/alimentaire          | 21         | 25         | 32          |
|                | <b>Total prélèvements</b>            | <b>939</b> | <b>231</b> | <b>1170</b> |

## 2.2.3 Bilan des activités concernant les EHEC

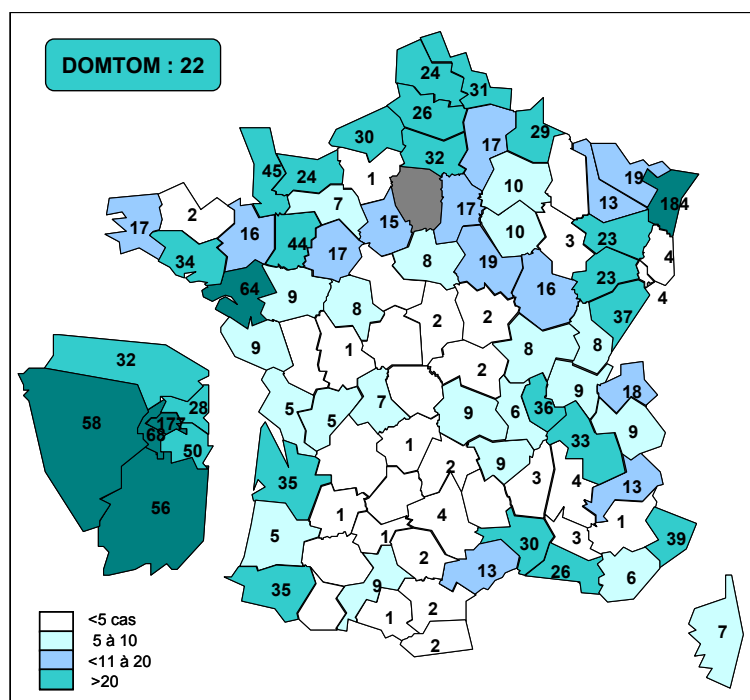
### 2.2.3.1 Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou de souches

Les symptômes donnant lieu à une recherche de EHEC, sont indiqués dans le **tableau 2** ci-dessous.

| Symptômes observés                              | Souches/selles | Sérums |
|-------------------------------------------------|----------------|--------|
| Diarrhée glairo-sanglante ou diarrhée sanglante | 713            | 11     |
| SHU/suspicion de SHU                            | 503            | 158    |
| Diarrhée/gastro-entérite aiguë                  | 703            | 3      |
| Diarrhée au retour de voyage                    | 17             |        |
| Entourage de SHU                                | 7              |        |
| Colite hémorragique                             | 93             |        |
| Anémie, thrombopénie                            | 18             | 3      |
| Contrôle post-azithromycine                     | 3              |        |
| Choc septique/toxinique                         | 28             |        |
| Insuffisance rénale aiguë                       | 21             |        |
| Microangiopathie thrombotique                   | 14             |        |
| Non précisé                                     | 45             |        |

\*SHU : syndrome hémolytique et urémique

La répartition géographique des demandes par département est indiquée dans la **figure 6** ci-dessous.



### 2.2.3.2 Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2013

Sur les 736 prélèvements de selles reçus, la recherche directe des gènes de pathogénicité par amplification génique *in vitro* a été positive dans 203 cas ce qui représente 23 % de la totalité des selles. Les résultats de la PCR directe sur les selles ont été corrélés aux résultats obtenus après culture de celles-ci à l'exception de 46 patients pour lesquels, les PCR directes sur les selles étaient positives mais chez qui aucune souche n'a pu être isolée. En 2013, 229 patients ont eu une recherche de EHEC positive (isolement de souche ou PCR positive)

De plus, afin d'étudier la prévalence des EHEC dans la population d'enfants consultant aux urgences de l'hôpital pour une diarrhée, la recherche de STEC a été systématiquement réalisée par le LA-RD sur les selles aqueuses et les selles glairo-sanglantes, soit 322 selles sur les 1256 selles reçues dans le service de Microbiologie pendant cette période. Deux souches de EHEC ont été isolées chez des enfants présentant une diarrhée glairo-sanglante n'ayant pas évolué vers un SHU.

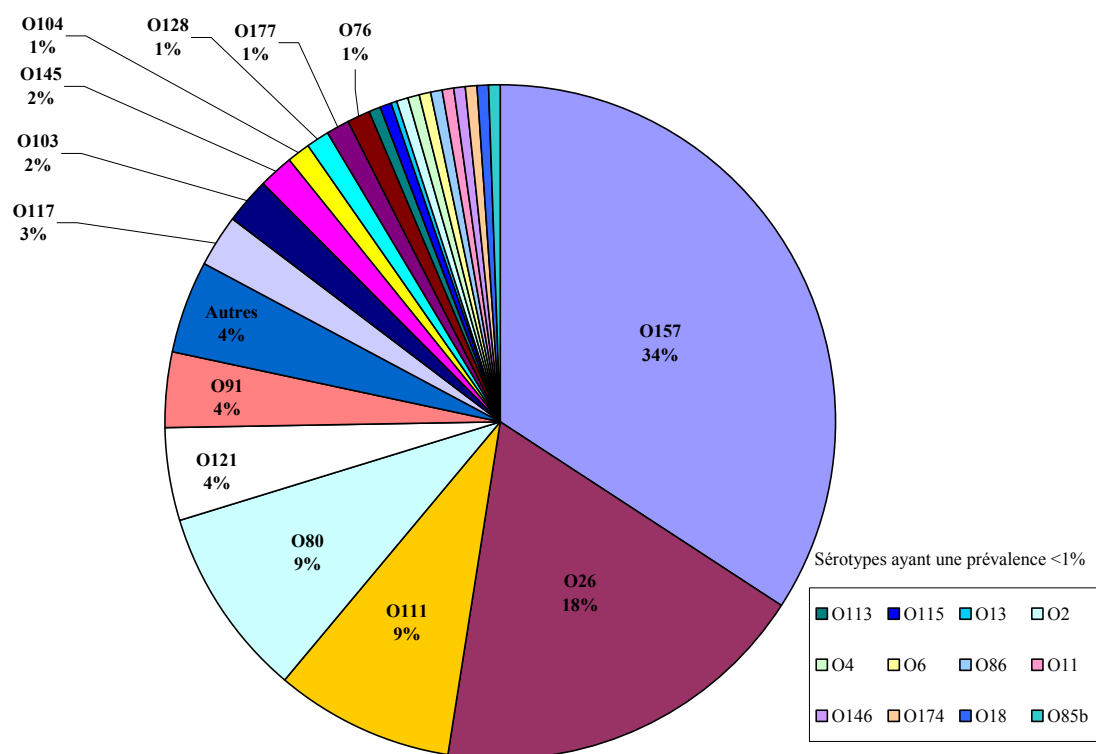
### 2.2.3.3 Analyse sur des souches de *E. coli* d'origine humaine productrices de Shiga-toxines

La présence des gènes *stx1* et *stx2* codant respectivement les Shiga-toxines (ou Verotoxines) STX1 (ou VT1) et STX2 (ou VT2) et leurs variants a été recherchée dans tous les prélèvements et/ou souches reçus. Le gène *eae*, codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC, a également été recherché.

En 2013, **185** souches de EHEC ont été mises en évidence par le CNR-ESS.

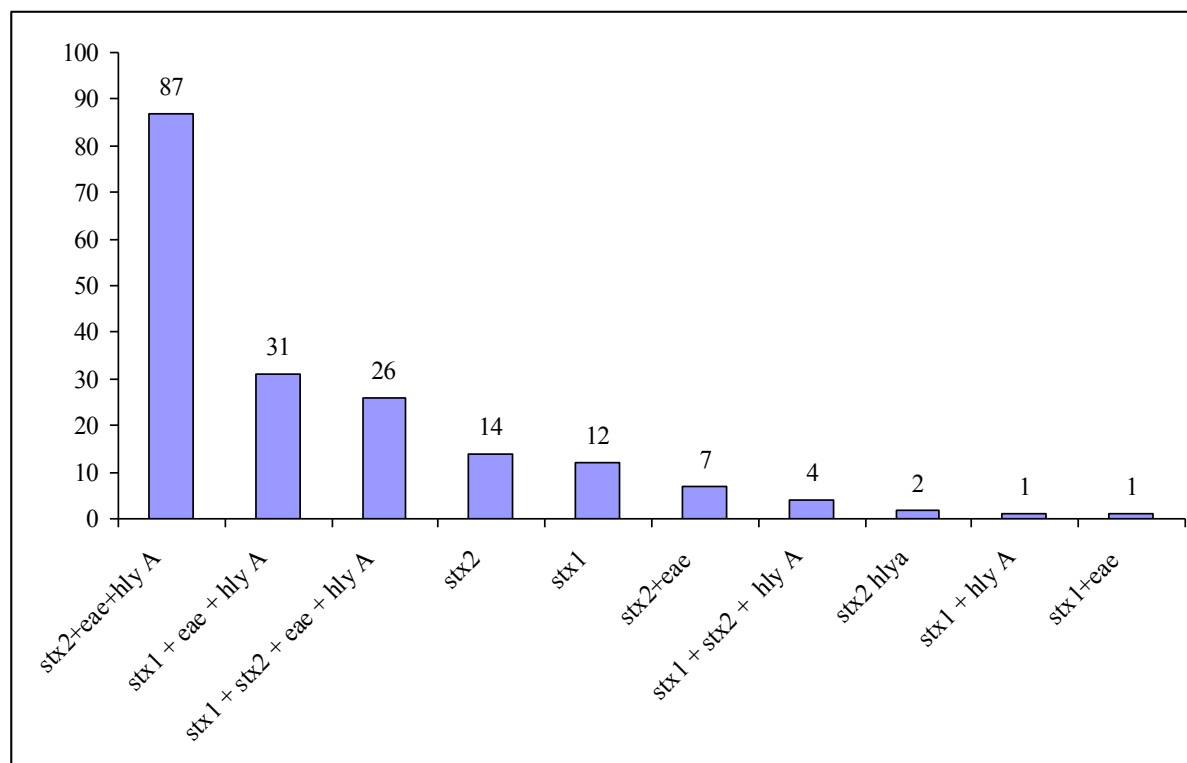
Les sérogroupes majoritairement isolés en France en 2013 étaient **O157** (34%), **O26** (18%), **O111** (9%). Il a été noté cette année, l'émergence d'un **sérogroupe rare O80** qui représente **9%** des sérogroupes isolés, essentiellement chez des enfants (71% des cas ont moins de cinq ans). Ce sérotype était retrouvé dans 4% des cas en 2012.

La répartition des différents sérogroupes de EHEC isolés en 2013 est représentée dans la **figure 7** ci-dessous.



L'analyse des profils de virulence montrent que le profil le plus souvent retrouvé est le profil *stx2+ eae +hlyA*.

La distribution des différents profils de virulence des souches EHEC isolées en 2013 est indiquée dans la **figure 8** ci-dessous.



La répartition des souches EHEC (n=185) en fonction du sérotype et du profil de virulence est représentée respectivement dans :

- le **tableau 3a** avec la liste des souches EHEC appartenant aux sérotypes les plus fréquemment incriminés dans les infections à EHEC et représentant un total de 165 souches.
- Le **tableau 3b** liste les sérotypes les moins fréquemment rencontrés représentant un total de 20 souches.  
Les souches sérotypées par agglutination à l'aide de sérums sont notées O. Les souches n'ayant pas agglutiné avec les sérums disponibles au CNR ont été sérotypées par une méthode moléculaire et sont notées R (pour l'antigène O) et F (pour l'antigène H).

Le profil *stx2+ eae +hlyA* a été retrouvé chez 47 % des souches EHEC (87/185) et chez 52,9 % des souches de sérotype O157.

**Tableau 3a.** Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les plus fréquemment isolés en 2013

| Profil de virulence          | O157      | O26       | O80       | O111      | O121     | O91      | O117     | O103     | O145     | O104     | O128     | O177     | O76      |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>stx2, eae, hly A</i>      | 46        | 5         | 17        | 1         | 6        |          |          |          | 3        |          |          | 1        |          |
| <i>stx1, eae, hly A</i>      |           | 23        |           | 7         |          |          |          | 1        |          |          |          |          | 1        |
| <i>stx1, stx2, eae, hlyA</i> | 17        | 2         |           | 5         | 1        |          |          | 1        |          |          |          |          |          |
| <i>stx2</i>                  |           |           |           |           |          | 6        |          |          |          | 2        |          | 1        |          |
| <i>stx1</i>                  |           | 1         |           |           |          |          | 5        |          |          |          | 2        |          |          |
| <i>stx2, eae</i>             |           | 2         |           | 3         | 1        |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>stx1, stx2, hly A</i>     |           |           |           |           |          | 1        |          |          |          |          |          |          |          |
| <i>stx2, hlyA</i>            |           |           |           |           |          |          |          | 2        |          |          |          |          |          |
| <i>stx1, hly A</i>           |           |           |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          | 1        |
| <i>stx1, eae</i>             |           | 1         |           |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <b>Total</b>                 | <b>63</b> | <b>34</b> | <b>17</b> | <b>16</b> | <b>8</b> | <b>7</b> | <b>5</b> | <b>4</b> | <b>3</b> | <b>2</b> | <b>2</b> | <b>2</b> | <b>2</b> |

**Tableau 3b.** Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les moins fréquemment isolés en 2013

| Profil de virulence      | Nombre de souches | Sérotypes des souches les moins fréquentes              |
|--------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>stx2, eae, hly A</i>  | 8                 | R115:F25, R13:NA, R2b:F6, R4:F2, R86:F27, NC1, NC2, NC3 |
| <i>stx1, eae, hly A</i>  | 1                 | NC4                                                     |
| <i>stx2</i>              | 5                 | R113:F21, R85b:F32/2, NC5, NC6, NC7                     |
| <i>stx1</i>              | 3                 | R6:F10, R11:F38, R18:F21                                |
| <i>stx2, eae</i>         | 1                 | R118/151:F8                                             |
| <i>stx1, stx2, hly A</i> | 2                 | R146:F21, R174:F2                                       |
| <b>Total</b>             | <b>20</b>         |                                                         |

NC<sup>+</sup> : profils de restriction pour l'antigène O obtenus après sérotypage moléculaire sans profil similaire dans la base de données du CNR-ESS

Pour 46 patients (2 pour le CNR-ESS, 44 pour le CNR-LA), les PCR directes sur les selles ou à partir de cultures sur gélose d'isolement étaient positives sans qu'aucune souche n'ait pu être isolée.

Le profil de virulence de ces 46 cas figure dans le **tableau 4** ci-dessous.

| Profil virulence / PCR positive dans les selles | N patients |
|-------------------------------------------------|------------|
| <i>stx2, eae, hlyA</i>                          | 13         |
| <i>stx2</i>                                     | 13         |
| <i>stx2, eae</i>                                | 7          |
| <i>stx1, stx2, eae, hlyA</i>                    | 3          |
| <i>stx1, eae</i>                                | 1          |
| <i>stx1, stx2, eae</i>                          | 1          |
| <i>stx1, stx2, hlyA</i>                         | 2          |
| <i>stx1, stx2</i>                               | 3          |
| <i>stx1, eae, hlyA</i>                          | 1          |
| <i>stx2, hlyA</i>                               | 2          |
| <b>Total</b>                                    | <b>46</b>  |



Pour les prélèvements du CNR-LA (39/44), une PCR sérotypage à partir de la culture bactérienne, mise au point au LA-RD et détectant les sérotypes majeurs avait donné les résultats suivants (**tableau 5**) :

**Tableau 5.** Résultats du sérotypage par PCR directement sur selles (LA-RD)

| PCR sérotypage/masse ou selles | N  |
|--------------------------------|----|
| O121                           | 2  |
| O91                            | 2  |
| O111                           | 1  |
| O145                           | 0  |
| O104                           | 1  |
| O157                           | 1  |
| O26                            | 1  |
| O55                            | 0  |
| NT*                            | 31 |

\* NT : souches non typables

#### 2.2.3.4 Analyse des variants des gènes *stx* (CNR-ESS-LA)

La mise en évidence des **variants des gènes *stx*** a été réalisée sur 180 souches isolées en 2013. Le variant *stx2a* a été retrouvé chez 48,3% des souches, seul (n=59) ou associé (n=28) avec d'autres variants. Le variant *stx2a* a été plus souvent retrouvé au cours des SHU (69%) que dans les diarrhées sanglantes (29%).

La distribution des variants *stx* en fonction de la clinique des patients est résumée dans le **tableau 6a ci-dessous**.

| Profils des variants       | Nombre de souches | DGS       | SHU       |
|----------------------------|-------------------|-----------|-----------|
| <i>stx2a</i>               | 59                | 8         | 51        |
| <i>stx1a</i>               | 40                | 37        | 3         |
| <i>stx2c, stx2d</i>        | 22                | 6         | 16        |
| <i>stx1a, stx2a</i>        | 12                | 6         | 6         |
| <i>stx2a, stx2d</i>        | 10                | 3         | 7         |
| <i>stx2d</i>               | 8                 | 4         | 4         |
| <i>stx1a, stx2c</i>        | 7                 | 7         | 0         |
| <i>stx1a, stx2a, stx2c</i> | 4                 | 4         | 0         |
| <i>stx2a, stx2c</i>        | 3                 | 2         | 1         |
| <i>stx1a, stx2d</i>        | 3                 | 1         | 2         |
| <i>stx1c</i>               | 2                 | 0         | 2         |
| <i>stx2b</i>               | 2                 | 1         | 1         |
| <i>stx2c</i>               | 2                 | 2         | 0         |
| <i>stx2a, stx2c, stx2d</i> | 2                 | 2         | 0         |
| <i>stx1a, stx2c, stx2d</i> | 2                 | 1         | 1         |
| <i>stx1c, stx2d</i>        | 1                 | 1         | 0         |
| <i>stx1c, stx2b, stx2d</i> | 1                 | 1         | 0         |
| <b>Total</b>               | <b>180</b>        | <b>86</b> | <b>94</b> |

DGS : diarrhée glairo-sanglante, SHU : syndrome hémolytique et urémique

La répartition des profils des variants en tenant compte des sérogroupes les plus fréquents et les plus rares sont regroupés respectivement **dans les tableaux 6b et 6c ci-dessous** :

**Tableau 6 b** : répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes les plus fréquents

| Profil des variants        | O157 | O26 | O80 | O111 | O121 | O91 | O117 | O103 | O145 | O104 | O128 | O177 | O76 |
|----------------------------|------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| <i>stx2a</i>               | 35   | 1   | 4   | 1    | 5    | 3   |      |      | 1    | 2    |      | 1    |     |
| <i>stx1a</i>               |      | 25  |     | 7    |      |     | 5    | 1    |      |      | 1    |      |     |
| <i>stx2c, stx2d</i>        | 1    | 3   | 7   | 2    |      | 1   |      |      | 1    |      |      | 1    |     |
| <i>stx1a, stx2a</i>        | 6    | 1   |     | 3    | 1    |     |      | 1    |      |      |      |      |     |
| <i>stx2a, stx2d</i>        | 3    | 2   | 2   |      | 2    | 1   |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx2d</i>               |      | 1   | 4   | 1    |      | 1   |      |      | 1    |      |      |      |     |
| <i>stx1a, stx2c</i>        | 6    |     |     | 1    |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1a, stx2a, stx2c</i> | 4    |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1a, stx2d</i>        |      | 1   |     |      |      | 1   |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx2a, stx2c</i>        | 3    |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1a, stx2c, stx2d</i> | 1    |     |     | 1    |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1c</i>               |      |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      | 1   |
| <i>stx2a, stx2c, stx2d</i> | 2    |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx2b</i>               |      |     |     |      |      |     |      | 2    |      |      |      |      |     |
| <i>stx2c</i>               | 2    |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1c, stx2b, stx2d</i> |      |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      |     |
| <i>stx1c, stx2d</i>        |      |     |     |      |      |     |      |      |      |      |      |      | 1   |
| <b>Total</b>               | 63   | 34  | 17  | 16   | 8    | 7   | 5    | 4    | 3    | 2    | 1    | 2    | 2   |

**Tableau 6c : répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes les plus rares**

| Profil des variants        | O113 | O13 | O2 | O4 | O6 | O86 | O146 | O174 | O18 | O85b | Autres |
|----------------------------|------|-----|----|----|----|-----|------|------|-----|------|--------|
| <i>stx2a</i>               | 1    | 1   |    |    |    |     |      |      |     | 1    | 3      |
| <i>stx1a</i>               |      |     |    |    |    |     |      |      | 1   |      |        |
| <i>stx2c, stx2d</i>        |      |     | 1  | 1  |    | 1   |      |      |     |      | 3      |
| <i>stx1a, stx2a, stx2c</i> |      |     |    |    |    |     |      |      |     |      |        |
| <i>stx1a, stx2d</i>        |      |     |    |    |    |     |      | 1    |     |      |        |
| <i>stx1c</i>               |      |     |    |    | 1  |     |      |      |     |      |        |
| <i>stx1c, stx2b, stx2d</i> |      |     |    |    |    |     | 1    |      |     |      |        |
| <b>Total</b>               | 1    | 1   | 1  | 1  | 1  | 1   | 1    | 1    | 1   | 1    | 6      |

#### 2.2.3.5 Autres facteurs de virulence

La recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence des *E. coli* enteroaggrégants (*aggR*, *pic*, *astA*) a été réalisée sur les souches ne possédant pas le gène *eae* (n = 33).

Ces gènes ont été retrouvés chez 4 souches :

- gènes *aggR* et *pic* : deux souches de sérotype O104:H4 non productrices de BLSE isolées respectivement chez deux patients originaires de Normandie et de l'Oise, sans notion de retour de voyage.
- gène *astA* : une souche de sérotype O177:H25
- gène *saa* : une souche de sérotype O113:F21

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

La mise en évidence des EHEC a été réalisée dans l'entourage de cas de SHU, soit 93 personnes prélevées dans l'entourage familial. Parmi elles, 9 étaient positives (8 souches isolées et une PCR positive dans les selles). Les souches isolées présentaient le même profil que celle du cas de SHU princeps.

Tous les cas contact positifs ont reçu de l'azithromycine. Le contrôle des selles 48 heures après l'arrêt du traitement ne retrouvait pas de EHEC et aucun d'entre eux n'a évolué vers un SHU.

Pour les patients atteints de SHU typique à EHEC, 18 ont été de façon certaine traités par azithromycine et ont eu un contrôle des selles 48 heures après l'arrêt du traitement. Ce contrôle des selles était négatif pour les 18 cas.

#### 2.2.3.7 Sérotypage moléculaire des souches EHEC non sérotypables

Le sérotypage moléculaire a été réalisé sur 49 souches non sérotypables en 2013. Les résultats sont indiqués dans le **tableau 7** ci-dessous.

| Référence CNR-ESS | Référence LA | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>hlyA</i> | <i>AggR</i> | Opéron O | flhC  |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|----------|-------|
| 201311051         | 35087        | +           | +           | -          | +           | -           | R76      | F19   |
| 201301946         | 35230        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201301947         | 35251        | -           | +           | -          | -           | -           | R177     | F25   |
| 201301948         | 35344        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201303931         | 35603        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201306803         | 35739        | -           | +           | -          | -           | -           | NC5      | F8    |
| 201306804         | 35830        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201306805         | 35905        | -           | +           | -          | -           | -           | R113     | F21   |
| 201306806         | 35975        | -           | +           | +          | +           | -           | NC1      | F25   |
| 201310470         | 36041        | -           | +           | -          | -           | -           | NC6      | F19   |
| 201310471         | 36047        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201310472         | 36052        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201310473         | 36118        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201310474         | 36119        | -           | +           | +          | +           | -           | NC2      | F19   |
| 201310475         | 36184        | -           | +           | +          | +           | -           | R13      | F25   |
| 201310476         | 36186        | -           | +           | +          | +           | -           | R86      | F27   |
| 201310477         | 36199        | -           | +           | +          | +           | -           | R2b      | F6    |
| 201310478         | 36211        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201310479         | 36248        | -           | +           | +          | +           | -           | NC3      | F25   |
| 201310480         | 36280        | -           | +           | +          | +           | -           | R4       | F2    |
| 201410484         | 36281        | +           | -           | -          | -           | -           | R6       | F10   |
| 201310482         | 36301        | -           | +           | +          | +           | -           | R115     | F25   |
| 201310483         | 36302        | +           | -           | +          | +           | -           | NC4      | F25   |
| 201310484         | 36330        | -           | +           | +          | -           | -           | R118/151 | F8    |
| 201311053         | 36382        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201311054         | 36383        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201311052         | 36411        | -           | +           | +          | +           | -           | R177     | F25   |
| 201400617         | 36435        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201400618         | 36549        | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201300105         | -            | +           | +           | -          | +           | -           | R91      | F21   |
| 201300195         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R117     | F7    |
| 201300557         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R11      | F38   |
| 201300995         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R18      | F21   |
| 201301689         | -            | +           | +           | -          | +           | -           | R146     | F21   |
| 201302537         | -            | -           | +           | -          | -           | -           | NC7      | F29   |
| 201302573         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R117     | F7    |
| 201304904         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R111     | F7    |
| 201305459         | -            | +           | +           | -          | +           | -           | R174     | F2    |
| 201305473         | -            | -           | +           | -          | -           | -           | R85b     | F32/3 |
| 201306187         | -            | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201306557         | -            | +           | -           | -          | +           | -           | R76      | F19   |
| 201306832         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R117     | F7    |
| 201306865         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R117     | F7    |
| 201308023         | -            | -           | +           | +          | -           | -           | R121     | F19   |
| 201308657         | -            | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201309007         | -            | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201310704         | -            | +           | -           | -          | -           | -           | R117     | F7    |
| 201311761         | -            | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |
| 201400620         | -            | -           | +           | +          | +           | -           | R80      | F2    |

NC1 à NC7 : profils non connus dans la base de données moléculaires

Les sérogroupes les plus fréquemment retrouvés étaient R80 (n=17), R117 (n=5). On note l'augmentation du séro groupe R80 par rapport aux années précédentes (10 en 2012).

#### 2.2.3.8 Sérodiagnostic des SHU (CNR-ESS)

Un total de 434 sérums, reçus de différents services pédiatriques et de LBM participant au réseau de surveillance des SHU, ont été analysés au CNR-ESS. Parmi ces 434 sérums (de 339 patients), 336 provenaient de France métropolitaine, un de l'Ile de la Réunion et deux de Mayotte.

Les anticorps anti-LPS appartenant aux deux classes d'immunoglobulines IgA et IgM dirigés contre les 8 sérogroupes de *E. coli* les plus fréquemment responsables de SHU (O157, O26, O55, O91, O103, O111, O128 et O145) ont été recherchés. Cette recherche a été complétée depuis 2011 par le séro groupe O104.

Le CNR-ESS recommande deux prélèvements à 15 jours d'intervalle (J0 étant le jour du diagnostic du SHU).

Pour les 90 patients pour lesquels, au moins deux sérums ont été prélevés :

- 33 ont présenté deux sérums ou plus positifs (36,7 %)
- 10 ont présenté un premier sérum négatif et un deuxième positif (11,1%)
- 47 ont présenté deux sérums ou plus négatifs (52,2 %)

En ne considérant qu'un sérum par patient (le positif en cas de discordance), le bilan des résultats obtenus est indiqué dans le **tableau 8**.

**Tableau 8.** Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS positive

|                        | < 1 an   |          | 1-5 ans   |           | 6-15 ans  |           | 16-64 ans |          | > 65 ans |           |            |
|------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|------------|
|                        | M        | F        | M         | F         | M         | F         | M         | F        | M        | F         |            |
| IgA O55                |          |          | 1         |           |           |           |           |          |          |           | 1          |
| IgM + IgA O91          |          |          |           |           |           | 1         |           | 1        |          |           | 2          |
| IgA + IgM O103         |          |          |           |           | 1         |           |           |          |          |           | 1          |
| IgM O111               |          |          | 2         |           |           |           |           |          |          | 1         | 3          |
| IgM + IgA O145         |          |          |           | 1         |           |           |           | 1        |          |           | 2          |
| IgA O26                | 1        |          | 1         | 1         |           |           | 2         |          |          | 1         | 6          |
| IgM O26                |          |          | 1         |           |           | 1         | 1         |          |          |           | 3          |
| IgM + IgA O26          |          |          | 6         | 7         | 2         | 2         |           |          | 4        | 5         | 26         |
| IgA O157               |          |          |           |           |           |           | 1         | 1        |          | 2         | 4          |
| IgM O157               |          |          |           |           |           |           | 4         |          |          |           | 4          |
| IgM + IgA O157         |          | 3        | 13        | 15        | 6         | 7         | 2         | 6        | 2        | 6         | 60         |
| IgM + IgA (O157 + O26) |          |          |           | 1         | 1         |           |           |          |          |           | 2          |
| <b>Total</b>           | <b>1</b> | <b>3</b> | <b>24</b> | <b>25</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>10</b> | <b>9</b> | <b>6</b> | <b>15</b> | <b>114</b> |

M= Masculin, F= Féminin

Sur les 339 patients ayant bénéficié d'une sérologie, 114 ont eu une sérologie positive avec présence d'anticorps anti-LPS soit 33,6%. La présence d'anticorps anti-LPS O157 était positive pour 68 patients (60%).

Parmi les 229 patients ayant eu une recherche de EHEC positive dans les selles (souches isolées et/ou PCR positive dans les selles), seuls 86 patients ont eu une sérologie pour la recherche d'anticorps anti-LPS contre les sérogroupes de *E. coli* les plus fréquemment responsables d'infections à EHEC.

La concordance des résultats entre d'une part le diagnostic direct (recherche des gènes de virulence *stx* dans les selles ou les souches ainsi que le sérotype) et le diagnostic sérologique est résumée dans le **tableau 9** ci-dessous.

| Sérogroupe EHEC                                              | O157* | O80 | O111* | O26* | O91* | O121 | O103* | O104* | O145* | O128* | O4 | O86 | Autres | Total |
|--------------------------------------------------------------|-------|-----|-------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|----|-----|--------|-------|
| Sérologie positive/ selles positives (souche isolée)         | 24    | 2   | 1     | 5    | 1    |      |       | 2     |       |       |    |     | 1      | 36    |
| Sérologie positive/ selles positives (souche non isolée)     | 5     |     |       | 5    |      |      |       |       |       |       |    |     |        | 10    |
| Sérologie négative/ selles positives (souches isolées)       |       | 7   | 2     | 2    |      | 3    | 2     |       | 1     | 1     | 1  | 1   | 3      | 23    |
| Sérologie négative/ PCR selles positives (souche non isolée) |       |     |       |      |      |      |       |       |       |       |    |     |        | 17    |

\* sérogroupes *E. coli* ciblés par le sérodiagnostic des SHU

Il est à noter que **40 patients présentant un SHU n'ont pas bénéficié de sérologie**.

La sérologie ne permettant que la détection des sérotypes O26, O55, O91, O103, O104, O111, O128, O145 et O157, les résultats étaient concordants pour 32 patients. Pour 4 patients, les résultats étaient discordants :

- deux patients présentant un SHU à *E. coli* O80 et une sérologie LPS positive en O26.
- un patient présentant un SHU à *E. coli* O26 et une sérologie LPS positive en O157
- deux patients présentant un SHU à *E. coli* O104 et une sérologie LPS positive en O103 pour l'un et O91 pour l'autre.

Il est possible que ces patients aient eu dans les selles plusieurs sérogroupes et qu'un seul d'entre eux ait pu être isolé.

La sérologie était négative et la recherche de EHEC positive pour 40 patients dont 23 pour lesquels, une souche avait été isolée et 17 pour lesquels, la PCR à partir des selles était positive mais sans isolement de souche EHEC.

Sur les 23 pour lesquels, une souche avait été isolée, 7 cas étaient positifs pour *E. coli* O26 (n=2), O111 (n=2), O103 (n=2) et O145 (n=1).

La sérologie était positive alors que la recherche des EHEC dans les selles était négative pour 23 patients (résultats ne figurant pas dans le tableau 9), cette discordance peut s'expliquer d'une part par un prélèvement tardif des selles par rapport à la diarrhée prodromique et d'autre part par l'administration d'un traitement antibiotique stérilisant les selles. Parmi ces patients 14 présentaient un SHU et 7 d'entre eux avaient reçu des antibiotiques avant le prélèvement de selles.

Aucune selle ou souche n'a été reçue au CNR pour 44 patients présentant une sérologie positive : 25 pour O157, 17 pour O26, 1 pour O145 et 1 pour O55. Aucune donnée clinique n'avait été précisée dans la demande.

## 2.2.4 Bilan des activités concernant les *E. coli* extra-intestinaux (LA-RD)

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

Le LA-RD a reçu 6 souches de *E. coli* isolées de LCR. Ces six souches ont été isolées de nouveau-nés âgés respectivement de 9 jours (n=1), de un mois (n=4) et de deux mois (n=1). Les résultats de l'étude des facteurs de virulence sont présentés dans le **tableau 10** et permettent d'incrémenter la base de données française des méningites à *E. coli*.

**Tableau 10.** Facteurs de virulence des *E. coli* responsables de méningites (LA-RD)

| N°souche | sexe | Age /PL | Groupe phylogénétique | PCR nonaplex wzv | PCR K1 | Phage K1 | agg K1 | Phage K5 | ChuA | Hra | yjaA | TSPE4.C2 | fyuA | Hly | sfa/foc | PAP C | Aer | PAP G | cnf1 | ibeA | iroN |
|----------|------|---------|-----------------------|------------------|--------|----------|--------|----------|------|-----|------|----------|------|-----|---------|-------|-----|-------|------|------|------|
| 375      | M    | 9 jours | B2                    | O2               | +      | +        | +      | -        | +    | +   | +    | +        | +    | +   | +       | +     | +   | III   | +    | -    | +    |
| 376      | F    | 1 mois  | D                     | O7               | +      | +        | +      | -        | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| 377      | M    | 1 mois  | B21                   | O1               | +      | +        | +      | -        | +    | -   | +    | +        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| 378      | F    | 2 mois  | B21                   | O18              | +      | +        | +      | -        | +    | -   | +    | +        | +    | -   | +       | -     | +   | -     | -    | +    | +    |
| 379      | F    | 1 mois  | B2                    | O1               | +      | +        | +      | -        | +    | *   | +    | +        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| 380      | M    | 2 mois  | B21                   | O18              | +      | +        | +      | -        | +    | -   | +    | +        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | +    | +    |

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

Le LA-RD a reçu 70 souches d'EXPEC hors méningites isolées des prélèvements suivants :

- hémocultures (n=37)
- urines (n= 15)
- placenta (n=1)
- liquide péritonéal (n=1)
- liquide articulaire (n=3)
- biopsies (n=2)
- divers (n=3)
- prélèvement vaginal (n=1)
- liquide gastrique (n=5)
- poche de sang (n=1)
- tubulures poche de sang (n=1)

Les caractéristiques de ces souches sont indiquées dans le **tableau 11**.

**Tableau 11.** Caractéristiques des souches de EXPEC hors méningites

| n° RDB  | Sexe | Age      | Groupe phylogénétique | PCR nonaplex wzy | per K1 | phage K1 | aggI K1 | ChuA | Hra | YjaA | ISPEC2 | fyuA | Hly | sfa/foc | PAP C | Aer | PAP G | cnfl | ibaA | iroN |
|---------|------|----------|-----------------------|------------------|--------|----------|---------|------|-----|------|--------|------|-----|---------|-------|-----|-------|------|------|------|
| RDEx262 | F    | 40 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx263 | M    | 60 ans   | B2                    | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx264 | M    | 60 ans   | B2                    | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx265 | ?    | ?        | B21                   | O2               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx266 | ?    | ?        | B21                   | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx267 | M    | 92 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx268 | M    | 4 mois   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx269 | F    | 1 mois   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx270 | M    | 76 ans   | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx271 | F    | 61 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx272 | F    | 39 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | III   | -    | -    | -    |
| RDEx273 | M    | 39 ans   | A                     | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx274 | M    | 70 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx275 | M    | 53 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx276 | F    | 4 ans    | B2                    | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | +    | -    | -    |
| RDEx277 | M    | 63 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx278 | M    | 75 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx279 | M    | 9 jours  | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | III   | +    | -    | +    |
| RDEx280 | F    | 26 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx281 | F    | 49 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx282 | F    | 53 ans   | A                     | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx283 | F    | 53 ans   | A                     | neg              | -      |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx284 | F    | 26 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx285 | F    | 1 jour   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx286 | M    | 71 ans   | B21                   |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx287 | F    | 49 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx288 | F    | 1 jour   | D                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx289 | F    | 54 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx290 | M    | 61 ans   | B2                    |                  |        | +        | d       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | III   | +    | -    | +    |
| RDEx291 | F    | 79 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx292 | F    | 1 jour   | B2                    | neg              | -      | -        | d       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx293 | M    | 76 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | III   | +    | -    | +    |
| RDEx294 | F    | 40 ans   | A                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx295 | M    | 1 jour   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx296 | F    | 37 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx297 | M    | 7 jours  | D                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx298 | M    | 7 jours  | D                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx299 | F    | 32 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx300 | F    | 18 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx301 | F    | 51 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx302 | F    | 40 ans   | A                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx303 | F    | 89 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx304 | F    | ?        | D                     | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx305 | M    | ?        | D                     | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx306 | NA   | ?        | D                     | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx307 | NA   | ?        | D                     | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx308 | NA   | ?        | D                     | O1               | +      |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx310 | M    | 68 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx311 | F    | 86 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx312 | M    | 72 ans   | B1                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx313 | F    | 77 ans   | B2                    |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx314 | M    | 57 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx315 | F    | 29 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx316 | F    | 40 ans   | B1                    |                  |        | -        | d       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx317 | M    | 63 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx318 | M    | 56 ans   | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx319 | M    | 85 ans   | B2                    | neg              |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx320 | M    | 24 ans   | A                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx322 | M    | 75 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx323 | M    | 75 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx324 | M    | 75 ans   | B2                    |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | +    |
| RDEx325 | F    | 65 ans   | F                     |                  |        |          | +       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx326 | F    | 20j?     | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx327 | M    | 12 jours | B2                    |                  |        |          | *       | *    | *   | *    | *      | *    | *   | *       | *     | *   | *     | *    | *    | *    |
| RDEx328 | F    | 29 ans   | C                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx329 | M    | 6 mois   | F                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx330 | M    | 78 ans   | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx331 | M    | 78 ans   | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |
| RDEx332 | F    |          | D                     |                  |        |          | -       | +    | +   | +    | +      | +    | +   | +       | +     | +   | +     | +    | +    | +    |



### 2.2.5 Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR-ESS-LA

L'activité concernant *E. coli* en 2013, tous types de prélèvements confondus, a connu une légère augmentation de 7 % par rapport à 2012. Le CNR-ESS a reçu moins de prélèvements de selles et de sérums mais plus de souches comme en témoignent les résultats ci-dessous :

- Souches : + 25,3 % (1124 en 2013 versus 897 en 2012)
- Selles : - 5,8 % (736 en 2013 versus 781 en 2012)
- Sérums : - 6,5 % (434 en 2013 versus 464 en 2012)

**Figure 9.** Evolution de l'activité du CNR-ESS pour *E. coli* et *Shigella* de 2006 à 2013



## 2.3 Activités de surveillance des *Escherichia coli*

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

#### 2.3.1.1 Réseau partenaire

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

#### 2.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

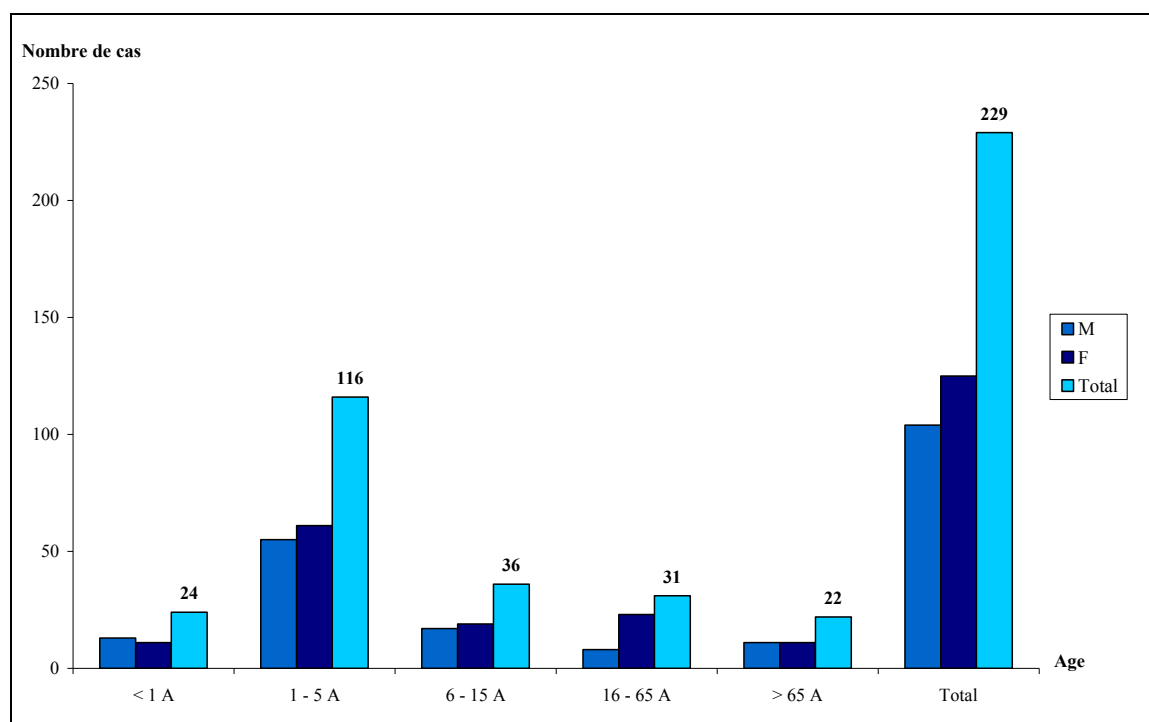
En 2013, **229 patients** ont eu une **recherche de EHEC positive** (isolement de souche ou PCR positive).

La recherche de EHEC était positive dans 33 % des demandes pour SHU ou suspicion de SHU comme **le montre le tableau 12 ci-dessous**

|                    | Souches    | PCR selles positive<br>sans isolement de souche | Total      |
|--------------------|------------|-------------------------------------------------|------------|
| SHU/MAT            | 86         | 34                                              | 119        |
| DGS                | 42         | 7                                               | 49         |
| Diarrhée simple    | 21         | 2                                               | 23         |
| Diarrhée chronique | 1          | -                                               | 1          |
| Posrteur chronique | 1          | -                                               | 1          |
| Patients contact   | 8          | 1                                               | 9          |
| Inconnu            | 20         | 1                                               | 21         |
| Enquête            | 6          | -                                               | 6          |
| <b>Total</b>       | <b>185</b> | <b>45</b>                                       | <b>229</b> |

SHU, syndrome hémolytique et urémique ; MAT , microangiopathie thrombotique ; DGS, diarrhée sanglante

La prévalence en fonction de l'âge et du sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive (souches isolées et/ou PCR positive dans les selles) est représenté dans la **figure 10** ci-dessous.



La prévalence la plus importante est retrouvée dans la tranche d'âge de 1 à 5 ans (50,6%) avec un sex-ratio de 0,9. Dans cette tranche d'âge, les enfants les plus touchés sont les enfants âgés de 1 à 3 ans (n=101 avec 46 garçons pour 55 filles).

Dans la tranche d'âge la plus atteinte, les souches de EHEC retrouvées appartenaient aux sérogroupes O26 (29,6%), O157 (26,5%), O111 (11,2%), O80 (9,2%) et O121 (6,1 %).

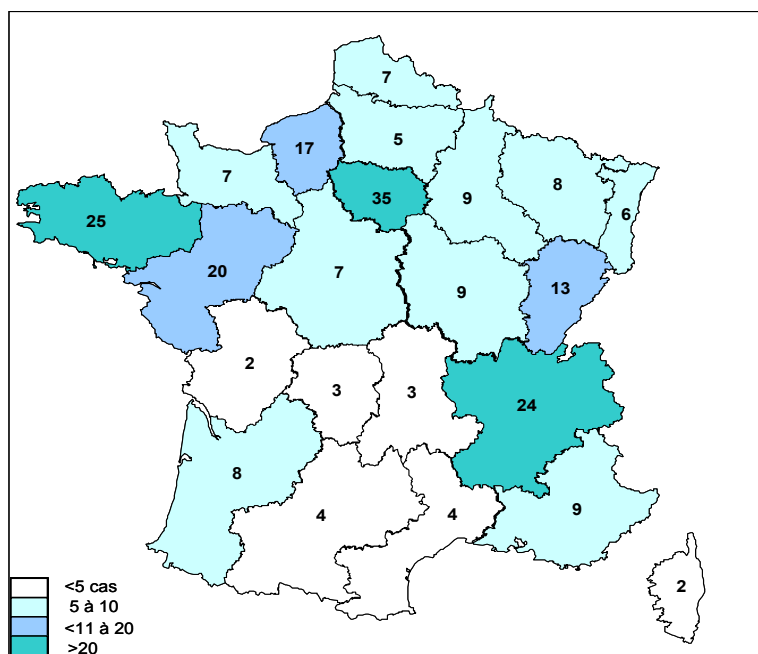
La répartition chiffrée des différents sérogroupes de EHEC (souches isolées) par âge et par sexe des patients est représentée dans le **tableau 13** ci dessous.

| Age          | < 1an |   | 1 – 5 ans |    | 6 – 15 ans |    | 16 – 64 ans |    | > 65 ans |    | Total |
|--------------|-------|---|-----------|----|------------|----|-------------|----|----------|----|-------|
| Sérogroupe   | M     | F | M         | F  | M          | F  | M           | F  | M        | F  |       |
| NC           |       |   | 3         | 2  |            | 1  |             |    | 1        | 1  | 8     |
| O2           |       |   |           | 1  |            |    |             |    |          |    | 1     |
| O4           |       |   |           | 1  |            |    |             |    |          |    | 1     |
| O6           |       |   |           |    |            |    | 1           |    |          |    | 1     |
| O11          |       |   |           | 1  |            |    |             |    |          |    | 1     |
| O13          |       |   |           |    |            | 1  |             |    |          |    | 1     |
| O18          |       |   | 1         |    |            |    |             |    |          |    | 1     |
| O26          | 1     | 2 | 11        | 18 |            |    |             | 1  | 1        |    | 34    |
| O76          |       |   |           | 1  |            |    |             | 1  |          |    | 2     |
| O80          | 2     | 3 | 6         | 3  |            | 1  |             | 2  |          |    | 17    |
| O85          |       |   |           |    |            |    |             |    |          | 1  | 1     |
| O86          |       |   | 1         |    |            |    |             |    |          |    | 1     |
| O91          |       |   |           |    |            |    |             |    | 4        | 3  | 7     |
| O103         | 1     |   | 1         |    |            |    |             | 2  |          |    | 4     |
| O104         |       |   |           |    | 1          | 1  |             |    |          |    | 2     |
| O111         |       | 2 | 4         | 7  | 1          |    |             | 2  |          |    | 16    |
| O115         |       |   |           |    |            | 1  |             |    |          |    | 1     |
| O113         |       |   |           |    |            |    |             | 1  |          |    | 1     |
| O117         |       |   |           |    |            |    | 1           | 4  |          |    | 5     |
| O121         | 1     |   | 3         | 3  |            |    |             |    |          | 1  | 8     |
| O128         |       |   | 2         |    |            |    |             |    |          |    | 2     |
| O145         |       |   | 1         | 2  |            |    |             |    |          |    | 3     |
| O146         |       |   |           |    |            |    |             |    | 1        |    | 1     |
| O157         | 1     | 1 | 13        | 13 | 11         | 11 | 3           | 6  | 1        | 3  | 63    |
| O174         |       |   |           |    |            |    |             |    |          | 1  | 1     |
| O177         |       |   |           |    | 1          |    |             |    |          | 1  | 2     |
| <b>Total</b> | 6     | 8 | 46        | 52 | 14         | 16 | 5           | 19 | 8        | 11 | 185   |

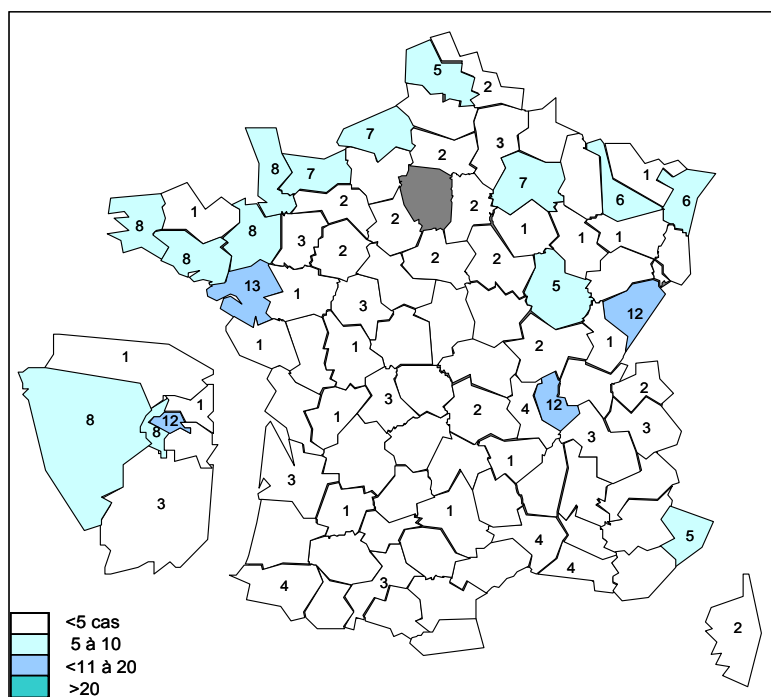
NC\* : souches sérotypées par méthode moléculaire et dont les profils sont inconnus dans la base de données du CNR-ESS

La répartition géographique des souches de EHEC isolées en 2013 est indiquée dans les figure 11 et 12 ci-dessous.

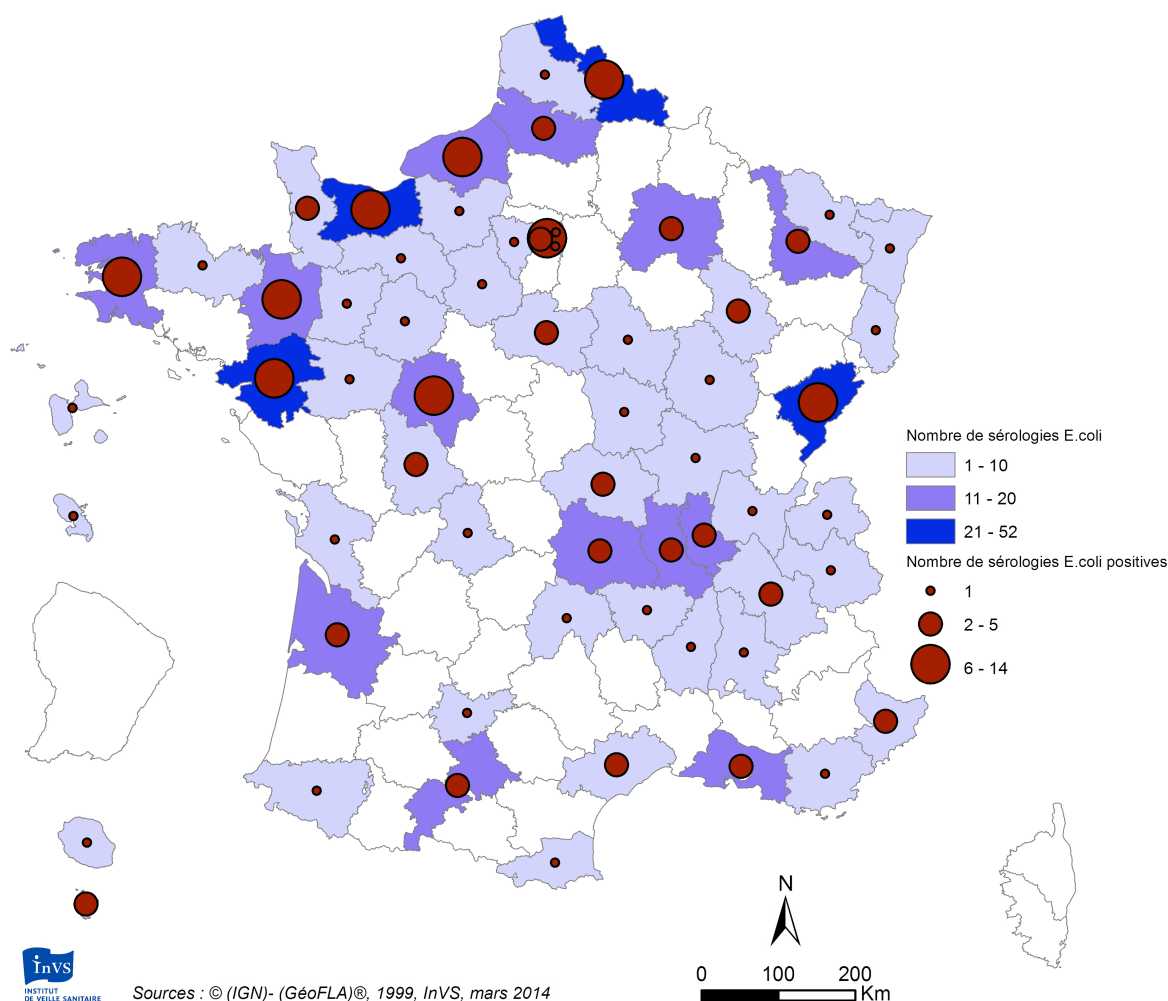
**Figure 11.** Répartition régionale des EHEC en 2013



**Figure 12.** Répartition départementale des EHEC en 2013



**Figure 13.** Répartition par département du nombre de sérologies *E. coli* et du nombre de sérologies positives en 2013\*



\* Quand le département de domiciliation n'était pas indiqué, le département du laboratoire expéditeur a été utilisé.

## 2.3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

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

Bien que l'utilisation des antibiotiques soit controversée dans les infections à EHEC, l'étude de la sensibilité des souches présente un intérêt épidémiologique. Le LA-RD a étudié la sensibilité des souches isolées en 2013, vis-à-vis des antibiotiques suivants :

- Bêta-lactamines : amoxicilline (AMX), cefixime (CFM) et ceftriaxone (CRO)
- Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT)
- Quinolones et fluoroquinolones : acide nalidixique (Nal) et ciprofloxacine (CIP)

La prévalence exprimée en pourcentage de résistance est indiquée dans le **tableau 14**.

**Tableau 14.** Prévalence (%) de la résistance aux antibiotiques des souches EHEC (LA-RD)

| % de Résistance | AMX  | CFM | CRO | SXT  | Nal  | CIP |
|-----------------|------|-----|-----|------|------|-----|
| O157 (n=36)     | 2,7  | 0   | 0   | 2,7  | 2,7  | 0   |
| Non O157 (n=66) | 32,8 | 0   | 0   | 14,9 | 20,9 | 0   |

Aucune souche productrice de BLSE n'a été isolée en 2013 au LA-RD

En raison des fortes concentrations intraluminales de l'azithromycine (AZM), les CMI AZM ont été déterminées vis-à-vis des souches isolées en 2013 par la méthode de l'E-Test (**Tableau 15**). Une seule souche de *E. coli* non O157 présentait une CMI AZM > 256 mg/L ; cette souche présentait par ailleurs une cephalosporinase de haut niveau.

**Tableau 15.** CMI à l'azithromycine des souches EHEC isolées en 2013 au LA-RD

|                 | CMI 50 (mg/L) | CMI 90 (mg/L) | Intervalles (mg/L) |
|-----------------|---------------|---------------|--------------------|
| O157 (n=36)     | 3             | 3             | 2 - 3              |
| Non O157 (n=66) | 3             | 4             | 0,5 - > 256        |

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

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

La prévalence de la résistance aux antibiotiques des souches EXPEC reçues en 2013 au LA-RD exprimée en % est détaillée dans le **tableau 16 ci-dessous**.

|                              | AMX  | CFM  | CTX  | SXT  | Nal  | CIP  |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| ExpEC méningites (n=60)      | 50   | 0    | 0    | 16,7 | 16,7 | 0    |
| ExpEC hors méningites (n=70) | 49,3 | 15,5 | 12,5 | 28,2 | 21,1 | 11,3 |

### 2.3.3 Participation aux réseaux de surveillance

#### 2.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

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

- Signalement systématique de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.

- Dans le cadre de la surveillance des EHEC, toute souche ou selle porteuse de gènes *stx* est immédiatement signalée à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par fax.

- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à l'InVS dès leur édition.

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

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

### 2.3.4 Détection et investigation des cas

#### Cas groupés à *Escherichia coli* entérohémorragique O91

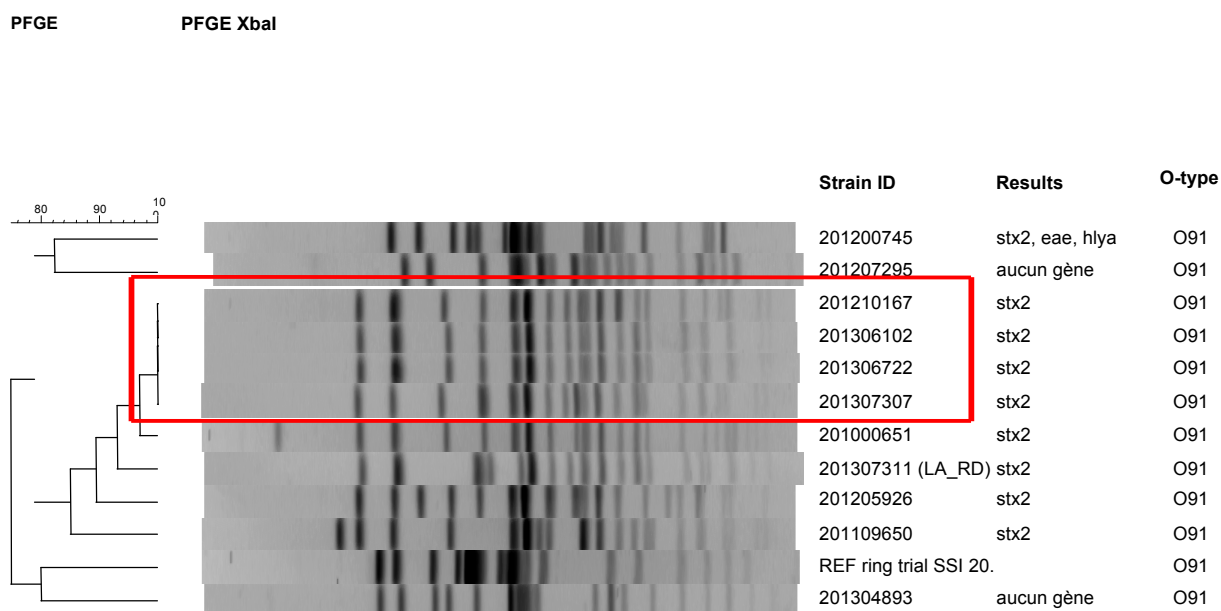
Le CNR ESS-LA a identifié entre le 19 et le 26 août 2013 une infection à EHEC O91 chez 4 patients âgés. Deux des patients, une femme et un homme âgés de 87 et 69 ans respectivement, ont été hospitalisés au CHU de Reims, la troisième patiente, une femme âgée de 71 ans, a été hospitalisée au CHRU de Lille et le quatrième, un homme âgé de 81 ans au CH de Villefranche-sur-Saône.

Une souche de EHEC O91 portant le gène de virulence EHEC *stx2* sans les gènes *eae* et *hlyA* a été isolée chez les 2 patients de Reims le 19 et 31 juillet et le patient de Lyon le 26 août. Pour le 3<sup>ème</sup> patient (CHRU de Lille) aucune souche n'a pu être isolée et le seul résultat disponible était un résultat de PCR positif pour O91 *stx2* sur des selles du 28 juillet.

Une analyse PFGE a été réalisée (**Figure 14**). Les résultats de la comparaison moléculaire des souches O91 de ce signalement et de souches historiques du CNR-ESS (2011-2013) a démontré que les 3 souches des patients de Reims et de Lyon avaient le même profil PFGE (A) et étaient ainsi génétiquement reliées entre elles. Ce même profil PFGE a été identifié chez une patiente de 69 ans en octobre 2012 au CHU de Besançon. Les 6 autres souches historiques et la souche de référence EHEC O91 du CNR, avaient toutes des profils PFGE différents du profil A et également différents entre eux.



**Figure 14.** Analyse par électrophorèse en champ pulsé des souches EHEC O91



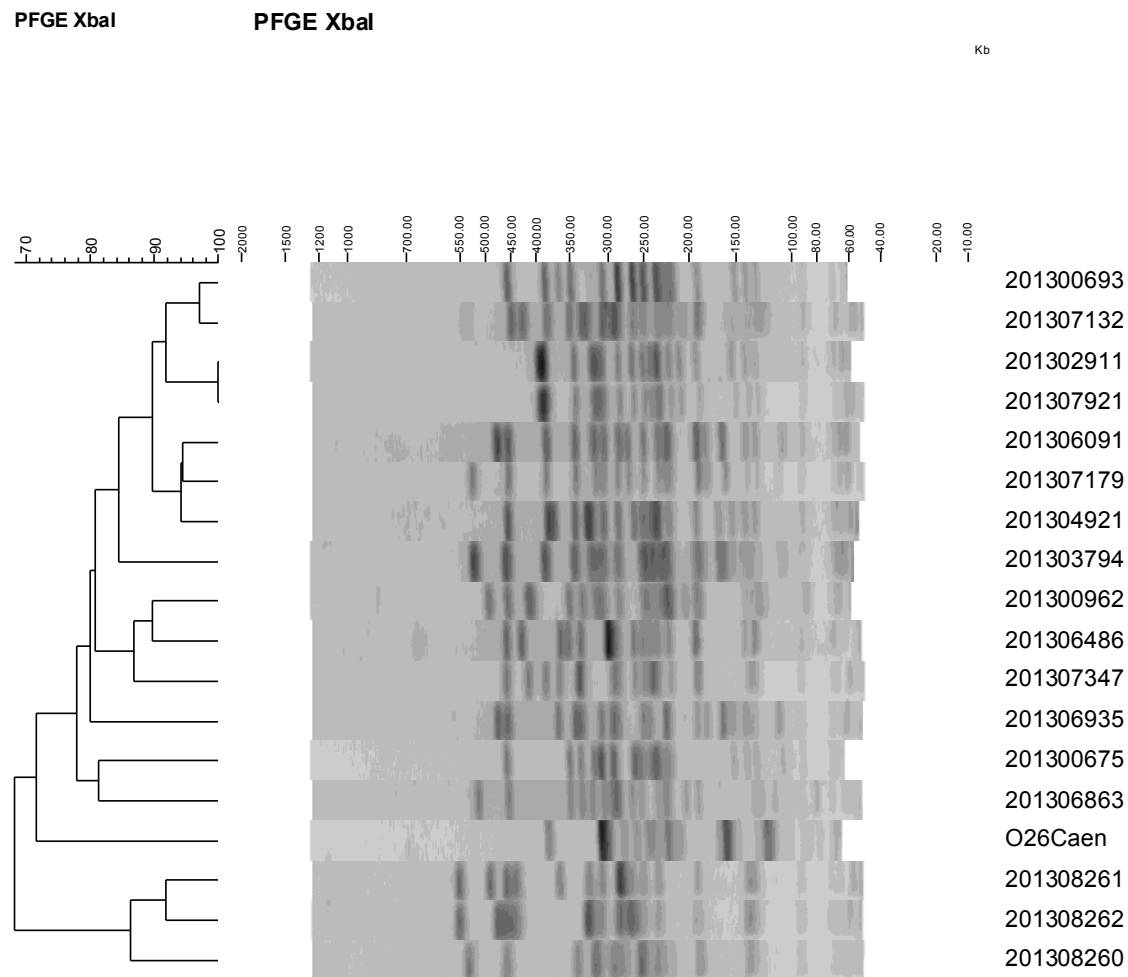
#### Augmentation du nombre d'infections à *E. coli* enterohémorragique O26 identifiées en août 2013 avec un regroupement temporo-spatial dans le centre-sud du pays

Le CNR ESS-LA a signalé à l'InVS le 04 septembre, 5 résultats de sérologie positifs pour *E. coli* O26 chez des cas de SHU pédiatriques pris en charge en Auvergne, Rhône-Alpes et en Pays-de-Loire. L'investigation menée par l'InVS a identifié 13 infections à *E. coli* O26 survenus en août 2013 dont 7 cas de SHU pédiatrique survenus chez des enfants âgés de 19 mois à trois ans résidant dans des régions différentes. Au total, une souche de EHEC O26 a été isolée chez 9 enfants avec des profils de virulence différents.

Une électrophorèse en champ pulsé a été réalisée sur 10 souches isolées en août et 7 souches isolées au cours du 1<sup>er</sup> semestre 2013 (**Figure 15**). Les résultats montraient autant de profils que de souches testées à l'exception de deux profils identiques concernant deux souches, l'une isolée parmi les 13 cas, l'autre isolée dans le dpt 67 chez un enfant en avril 2013.

L'investigation épidémiologique n'a pas permis d'identifier une exposition commune pouvant expliquer cet excès de cas.

**Figure 15.** Analyse par électrophorèse en champ pulsé des EHEC O26



## **Epidémie d'infections à *E. coli* entérohémorragique O157:H- liée à la consommation de camembert au lait cru, Ouest de la France, mai 2013**

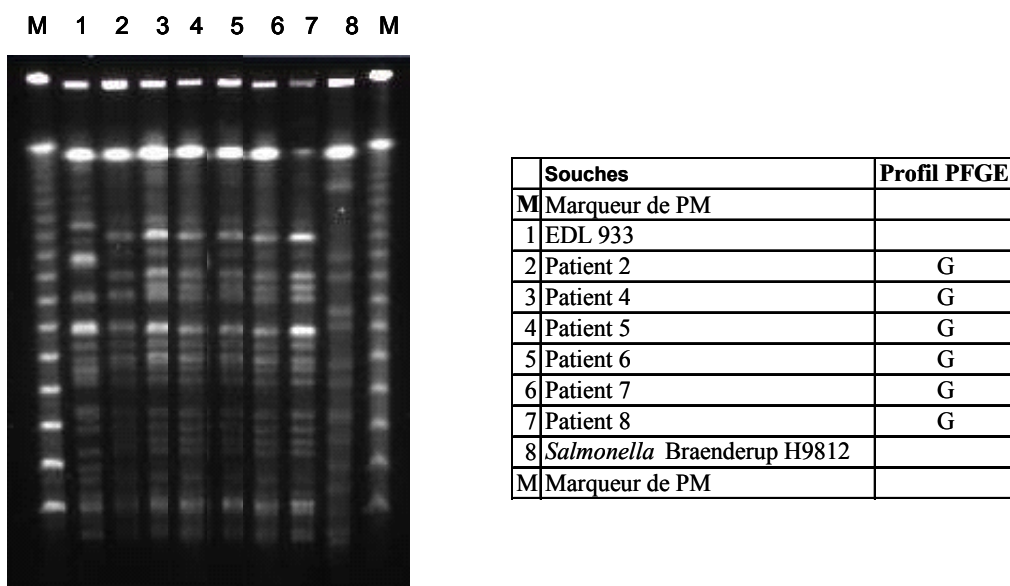
Le 28 mai 2013, le Centre Hospitalier de St Lo (Manche) avait signalé à la Cellule régionale de veille, alerte et gestion sanitaires de l'Agence Régionale de Santé Basse-Normandie la prise en charge de 3 patients pour une infection à *E. coli* O157. Sur la même période, 2 cas de SHU, chez un enfant de 3 ans hospitalisé au CH de Caen et chez une femme de 83 ans hospitalisée au CH de Rennes avec une sérologie positive à *E. coli* O157, avaient été confirmés par le CNR-ESS. Le regroupement dans le temps et l'espace de plusieurs cas d'infection à *E. coli* O157 était en faveur d'une épidémie liée à une source commune de contamination.

En tout, huit cas ont été identifiés : 6 enfants et 2 adultes qui étaient âgés de 2 à 83 ans (médiane =11 ans), le ratio homme-femme était de 0,6. Les cas résidaient dans quatre régions différentes. La moitié des cas résidait dans la Manche (50). Les dates de début de signes des cas allaient du 8 au 24 mai 2013. Cinq des huit patients ont développé un SHU post-diarrhée. Aucun patient n'est décédé.

Un prélèvement de selles a été effectué pour les 8 cas identifiés et un prélèvement de sérum pour 4 cas (tous des cas de SHU). Une infection à *E. coli* O157 a été confirmée pour les 8 cas soit par sérologie soit par l'analyse des selles. Une souche de EHEC O157:H- sorbitol négative porteuse des gènes de virulence *stx2a*, *eae* et *hlyA* a été isolée des selles de 6 cas. Les sérologies des 4 cas testés étaient toutes positives pour le séro groupe O157.

La comparaison moléculaire par électrophorèse en champ-pulsé de l'ADN total après macrorestriction par *XbaI* de ces 6 souches d'EHEC O157:H- a montré qu'elles étaient génétiquement reliées (**Figure 16**).

**Figure 16.** Electrophorèse en champ pulsé des EHEC O157:H-



Trois des 8 cas résidaient dans une zone rurale et un contact avec des animaux de ferme a été rapporté pour 3 autres cas dont les 2 enfants de la même fratrie. Aucun cas n'avait voyagé hors de France. La survenue de diarrhée dans l'entourage des cas a été rapportée pour 3 cas dont les 2 enfants de la même fratrie. La consommation de steak haché de bœuf a été rapportée pour 4 cas dans 3 foyers différents. Les steaks hachés consommés étaient conditionnés différemment et provenaient des lieux d'achat différents. La consommation de camembert au lait cru a été rapportée pour 5 cas. Deux enfants d'une même fratrie, n'avaient pas consommé de camembert au lait cru mais leurs parents avaient consommé des camemberts dans la semaine précédant le début de signes du premier enfant.

L'enquête alimentaire a pu établir un lien direct ou indirect avec la consommation de camembert au lait cru fabriqué par le même établissement pour 6 cas dont 5 confirmés. Le huitième cas non consommateur était un cas possible (souche de EHEC non isolée).

## Génotypage de souches de *E. coli* responsables d'une Infection Bactérienne Transmise par Transfusion (IBTT) (LA-RD)

Le LA-RD a reçu une demande de génotypage de souches de *E. coli* dans le cadre d'un IBTT de gravité 4 ayant entraîné le décès du patient receveur d'un concentré de plaquettes d'aphérèse. La demande provenait de l'Etablissement Français du Sang –Rhône- Alpes.

Cinq souches de *E. coli* ont été analysées :

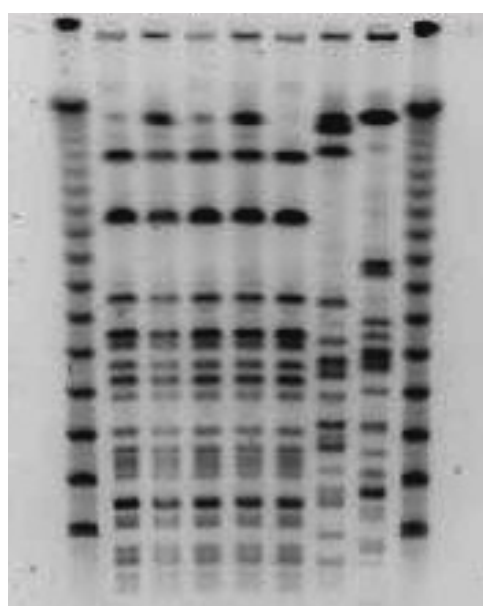
- une souche issue du donneur, potentiellement la source (souche isolée d'urines)
- une souche issue du receveur (hémoculture)
- 3 souches liées au produit sanguin : une isolée de la poche après rinçage au sérum physiologique, une isolée de la tubulure attenante à la poche et en communication avec la poche, et une issue d'un segment de tubulure clos.

Les 5 souches de sérotype O1:K1, appartenaient au groupe phylogénétique D et présentaient le même génotype de virulence avec en particulier la présence du gène *papGII* caractéristique des souches de pyélonéphrite.

L'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN total après macrorestriction par *NotI*, retrouvait des profils strictement identiques entre les 5 souches. Il en était de même lors de l'analyse par rep-PCR (**figure 17 ci-dessous**).

| n° RDB  | ville    | origine du prélèvement | catégorie clinique | Groupe phylogénétique | PCR nonaplex wzy | PCR K1 | Agglutination K1 | ChuA | Hra | YjaA | TSPE4.C2 | fyuA | Hly | sfa/foc | PAP C | Aer | PAP G | cnf1 | ibeA | iroN |
|---------|----------|------------------------|--------------------|-----------------------|------------------|--------|------------------|------|-----|------|----------|------|-----|---------|-------|-----|-------|------|------|------|
| RDEx304 | Grenoble | ecbu donneuse          | IBTT               | D                     | O1               | +      | +                | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx305 | Grenoble | hemoc receveur         | IBTT               | D                     | O1               | +      | +                | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx306 | Grenoble | poche                  | IBTT               | D                     | O1               | +      | +                | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx307 | Grenoble | tubulure attenante     | IBTT               | D                     | O1               | +      | +                | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |
| RDEx308 | Grenoble | segment clos tubulure  | IBTT               | D                     | O1               | +      | +                | +    | -   | -    | -        | +    | -   | -       | +     | +   | II    | -    | -    | -    |

M 1 2 3 4 5 6 7 M



| Piste | Souches               |
|-------|-----------------------|
| 1     | RDEx304               |
| 2     | RDEx305               |
| 3     | RDEx306               |
| 4     | RDEx307               |
| 5     | RDEx308               |
| 6     | Souche non reliée n°1 |
| 7     | Souche non reliée n°2 |

*Shigella*

### **3/ *Shigella***

#### **3.1 Missions et Organisation du CNR**

Voir Annexe 1

#### **3.2 Activités d'expertise**

##### **3.2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2013**

Aucune.

##### **3.2.2 Activités d'expertise pour l'année 2013**

###### **3.2.2.1 Inventaire global des souches reçues au CNR-ESS en 2013**

Durant l'année 2013, le CNR-ESS a reçu 976 souches de *Shigella* envoyées comme appartenant au genre *Shigella*. Sur ces 976 souches, 925 ont été confirmées comme étant des *Shigella* dont 923 souches d'origine humaine et 2 souches d'origine animale (isolée chez un macaque). Sur les 51 souches restantes, 47 souches n'étaient pas des shigelles et 4 souches n'ont pu être cultivées.

Sur les 923 souches d'origine humaine, 673 provenaient de France métropolitaine (de 664 patients), 111 (de 105 patients) des DOM-TOM et 139 de l'étranger.

De plus, 183 fiches d'information correspondant à 178 patients ont été envoyées au CNR-ESS pour signaler une infection à *Shigella*. *S. sonnei* avait été isolée de 164 patients et *S. flexneri* de 14 patients.

En compilant les informations et souches et après élimination des doublons, des souches non humaines, des souches adressées de l'étranger, **un total de 947 souches de *Shigella* isolées en métropole et dans les DOM-TOM a été répertorié au CNR-ESS en 2013.**

### 3.2.2.2 Analyse des 673 souches reçues de France métropolitaine en 2013

Les caractéristiques des 673 souches par sérotype sont résumées dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 17. *Shigella boydii* (41 souches pour 41 patients)**

| Sérotype | Nombre de cas | Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>     | Epidémie <sup>b</sup> | Voyage, pays potentiel de contamination ( ) <sup>a</sup> |
|----------|---------------|----------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| 1        | 3             | 09, 27, 75                                   | -                     | Inde                                                     |
| 2        | 11            | 12, 25, 38, 44, 65, 69, 76(2), 87, 92(2)     | -                     | Algérie, Maroc (2), Mexique, République Dominicaine      |
| 4        | 12            | 13, 21(2), 30, 38, 64, 74, 89, 91, 92(2), 95 | -                     | Mayotte, Madagascar, Guadeloupe, Côte d'Ivoire           |
| 5        | 1             | 75                                           | -                     |                                                          |
| 10       | 4             | 22(2), 92, 94                                | -                     | Bénin, Tchad, Sénégal                                    |
| 12       | 1             | 67                                           | -                     | Tchad                                                    |
| 14       | 2             | 94(2)                                        | -                     | Sénégal                                                  |
| 18       | 1             | 92                                           | -                     |                                                          |
| 20       | 6             | 34, 53, 67, 71, 92, 93                       | -                     | Inde (2), Indonésie, Yémen                               |

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

**Tableau 18. *Shigella dysenteriae* (7 cas pour 7 patients)**

| Sérotype | Nombre de cas | Département d'isolement ( ) <sup>a</sup> | Epidémie <sup>b</sup>    | Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup> |
|----------|---------------|------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------|
| 2        | 4             | 38, 44, 72, 95                           | Familiale ( ?, 44, Inde) | Cameroun, Inde, Pakistan                          |
| 4        | 2             | 34, 92                                   | -                        | -                                                 |
| 12       | 1             | 92                                       | -                        | Mali                                              |

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

NST : non sérotypable



**Tableau 19. *Shigella flexneri* (246 souches pour 242 patients)**

| Sérotype              | Nombre de cas | Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>                                                                                                                                          | Epidémie <sup>b</sup>                                                           | Voyage, pays potentiel de contamination ( ) <sup>a</sup>                                                                                               |
|-----------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                     | 7             | 44(3), 75(2), 92(1), 95                                                                                                                                                           | Familiale (44, ?, ?)                                                            | Indonésie                                                                                                                                              |
| 1a                    | 4             | 06, 22, 31, 35                                                                                                                                                                    | -                                                                               | Madagascar, Cambodge                                                                                                                                   |
| 1b                    | 30            | 03, 12, 17, 67, 68(3), 73, 75(6), 76, 77, 78, 80, 83, 85, 92, 93(2), 94(4), 95(3)                                                                                                 | Familiale (?, 77, ?), Familiale ( ?, 94, ?)                                     | Espagne, Cameroun, Sénégal (2), Maroc (3), Tunisie, Togo, Inde                                                                                         |
| 2a                    | 69            | 04, 06(3), 09, 11(2), 16, 21, 26, 27, 28, 34(3), 37, 42(2), 44, 56, 59, 67(2), 69(6), 71(2), 72(2), 74, 75(9), 76(2), 77(2), 78(6), 79, 83(2), 85, 91(2), 92(3), 93, 94(2), 95(4) |                                                                                 | Inde, Sénégal, Burkina Faso, Gambie, Afrique du Sud, Maroc (5), Algérie, Cameroun (2), Emirats Arabes Unis, Mexique, Hong Kong, République Dominicaine |
| 2b                    | 16            | 10, 13, 14, 30, 34(2), 44, 59, 74, 75(3), 83, 92, 95(2)                                                                                                                           | Familiale (?, 14, ?)                                                            | Maroc, Sénégal, Bénin, Tunisie                                                                                                                         |
| 3a                    | 49            | 07, 17, 21(2), 28(2), 30, 31, 37, 41, 42, 44, 45, 47, 49, 56, 57, 59(2), 60(2), 62, 68, 69(4), 74, 75(9), 76, 78(2), 80, 83, 85, 91, 92(3), 93, 95                                | -                                                                               | Inde (2), Burkina Faso, Egypte, Congo, Cameroun, Côte d'Ivoire, Niger, Ethiopie, Algérie, Madagascar, Philippines, République Dominicaine, Espagne     |
| 3b                    | 3             | 15, 21(2)                                                                                                                                                                         | -                                                                               | -                                                                                                                                                      |
| 4                     | 7             | 45, 92, 94(4), 56                                                                                                                                                                 | Familiale (4, 94, ?)                                                            | Congo, Bénin, Sénégal                                                                                                                                  |
| 4 variété Saigonensis | 2             | 48, 95                                                                                                                                                                            | -                                                                               | -                                                                                                                                                      |
| 4a                    | 1             | 63                                                                                                                                                                                | -                                                                               | Madagascar                                                                                                                                             |
| 4b                    | 1             | 38                                                                                                                                                                                | -                                                                               | Sénégal                                                                                                                                                |
| 4c                    | 6             | 12, 75(2), 92, 93, 94                                                                                                                                                             | -                                                                               | Sénégal, Côte d'Ivoire, Asie                                                                                                                           |
| 6 Boyd88              | 35            | 12, 21, 24(2), 38, 44(2), 45(3), 54, 58, 59, 60(4), 67, 68, 69(3), 73, 78(3), 85, 91, 92(3), 94, 95(3)                                                                            | Familiale (3, 60, ?)<br>Familiale ( ?, 44, Maroc)<br>Familiale (2, 45, Tunisie) | Inde (2), Haïti, Maroc (3), Tunisie (2), Cameroun (2), Sénégal, Mauritanie, Niger, Nigeria, Egypte, Pérou                                              |
| 6 Herfordshire        | 5             | 31(2), 45, 78(2)                                                                                                                                                                  | -                                                                               | Tchad, Congo, Mali                                                                                                                                     |
| 6 Manchester          | 1             | 69                                                                                                                                                                                | -                                                                               | -                                                                                                                                                      |
| 6 Newcastle           | 1             | 33                                                                                                                                                                                | -                                                                               | La Barbade                                                                                                                                             |
| X                     | 2             | 47, 91                                                                                                                                                                            | -                                                                               | Congo, Angola                                                                                                                                          |
| Y                     | 3             | 29, 36, 75                                                                                                                                                                        | -                                                                               | -                                                                                                                                                      |

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

**Tableau 20.** *Shigella sonnei* (355 souches pour 350 patients)

| Sérotype             | Nombre de cas | Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Epidémie <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                  | Voyage, pays potentiel de contamination ( ) <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                 |
|----------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a                    | 14            | 01, 54, 56, 59(2), 67, 72, 75, 76(2), 84, 92, 94(2)                                                                                                                                                                                                                                                                                   | (72, ?, Indonésie)<br>( ?, 76, République Dominicaine)<br>( ?, 94, ?)                                                                                                                                                                                                  | République Dominicaine, Brésil, Vénézuëla, Indonésie, Mayotte, Iles Pitcairn                                                                                                                                                             |
| f                    | 1             | 92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | -                                                                                                                                                                                                                                                                      | -                                                                                                                                                                                                                                        |
| g                    | 253           | 01(2), 04, 06(6), 07, 09(18), 10, 11(10), 12(3), 13(13), 15, 19, 20, 21(2), 22, 25(2), 28, 30(2), 31(12), 33(3), 34(13), 35, 37, 38(2), 44(2), 46, 47(2), 50, 56(2), 57, 59(4), 62(2), 63, 64(2), 66, 67, 68(4), 69(3), 71, 73, 74(5), 75(61), 76(7), 78(4), 80, 81, 82, 83(2), 84, 85(2), 88, 89(4), 91(4), 92(8), 93, 94(19), 95(4) | - Epidémie lors d'un festival de musique (15 cas, 09)<br>Familiale ( ?, 31, Egypte)<br>Familiale ( ?, 68, Egypte)<br>Familiale ( ?, 11, ?)<br>Familiale ( ?; 31, ?)<br>Familiale ( ?, 76, ?)<br>Familiale (2, 89, ?)<br>Epidémie dans écoles confessionnelles (9, IDF) | Algérie, Tunisie (3), Maroc (2), Bénin, Mali, Tchad, Congo, Kenya, Tanzanie (2), Egypte(6)<br><br>Allemagne, Espagne (3), USA, Costa-Rica, Cuba (3), El-Salvador, Pérou<br><br>Inde (7), Sri-Lanka (2), Indonésie, Laos, Cambodge, Chine |
| g (mannitol -)       | 46            | 06(2), 10, 11, 22, 25(3), 30, 34, 38(2), 45, 47, 49(2), 50, 51, 57, 64, 69(2), 74(2), 75(6), 76, 78(5), 83, 91, 92(2), 93(3), 94, 95(2)                                                                                                                                                                                               | Familiale ( ?, 38, ?)<br>Familiale ( ?, 69, ?)<br>Familiale ( ?, 78, ?)                                                                                                                                                                                                | Algérie (2), Maroc(9)                                                                                                                                                                                                                    |
| g (ONPG-)            | 33            | 07, 09, 34, 38, 56, 57, 59, 60, 66(2), 67, 68, 69, 75(8), 76, 78, 91, 92(3), 93, 95(5)                                                                                                                                                                                                                                                | Familiale ( ?, 07, Cameroun)<br>Familiale ( ?, 75, ?)                                                                                                                                                                                                                  | Cameroun (2), Indonésie (2), Malaisie, Sénégal, Togo                                                                                                                                                                                     |
| g (mannitol-, ONPG-) | 01            | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | -                                                                                                                                                                                                                                                                      | -                                                                                                                                                                                                                                        |
| g (ODC -)            | 02            | 69, 95                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | -                                                                                                                                                                                                                                                                      | -                                                                                                                                                                                                                                        |

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

Les quatre dernières lignes du **tableau 20** concernent des souches de *S. sonnei* présentant des caractères biochimiques spécifiques (mannitol négatif et/ou ONPG négatif ; ODC négatif).

**Tableau 21.** Sérotypes provisoires on non sérogroupables (24 souches pour 24 patients)

| Sérotipe                                     | Nombre de cas | Département d'isolement | Epidémie                | Voyage, pays potentiel de contamination ( ) <sup>a</sup> |
|----------------------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>S. flexneri</i> prov 1c                   | 5             | 44, 68(2), 75, 92       | -                       | Cap-Vert                                                 |
| <i>S. flexneri</i> prov 1c (7, 8+)           | 12            | 40, 44, 37(9), 78       | (37, 9, Gens du voyage) | -                                                        |
| <i>S. dysenteriae</i> prov 97-10607 (96-204) | 6             | 34, 42, 62, 74, 75, 91  | -                       | -                                                        |
| Ewing 1621-54                                | 1             | 94                      | -                       | -                                                        |

### 3.2.2.3 Souches reçues des DOM-TOM

En 2013, le CNR-ESS a reçu des DOM-TOM, 111 souches de *Shigella* isolées chez 105 patients (Tableau 22).

**Tableau 22.** Répartition des souches en provenance des DOM-TOM

| Sérotipe                    | Guyane française | Réunion  |
|-----------------------------|------------------|----------|
| <i>S. flexneri</i> 1a       |                  | 1        |
| <i>S. flexneri</i> 1b       | 19               |          |
| <i>S. flexneri</i> 2a       | 64               |          |
| <i>S. flexneri</i> 3a       | 1                |          |
| <i>S. flexneri</i> 3b       | 3                |          |
| <i>S. flexneri</i> 6 Boyd88 | 3                |          |
| <i>S. sonnei</i> g          | 14               |          |
| <b>Total</b>                | <b>104</b>       | <b>1</b> |

### 3.2.2.4 Souche reçue de l'Etranger

En 2013, Le CNR a reçu une souche de *Shigella* non sérotypable de Belgique et une souche de *Shigella sonnei* g d'Autriche dans le cadre de l'investigation d'une épidémie survenue au cours de l'été 2013 dans le Val d'Ariège.

Par ailleurs, dans le cadre de projets collaboratifs, le CNR a reçu également 88 souches du Niger et 49 souches de l'Institut Pasteur de Bangui.

### 3.2.2.5 Bilan des fiches d'information reçues au CNR-ESS

En 2013, Le CNR a reçu 184 fiches correspondant à 178 patients (14 pour *Shigella flexneri* et 164 pour *Shigella sonnei*).

Ces fiches d'information ont été établies pour répertorier les cas de *S. sonnei* au niveau de la France métropolitaine. Sur ces fiches d'information, en plus du sérotype, les trois cases ONPG, rhamnose et mannitol permettent de définir le biotype. Cependant pour l'année 2013, l'ensemble des fiches reçues ne comportaient pas les résultats de fermentation des deux sucres rhamnose et mannitol, ce qui n'a pas permis de donner une répartition des biotypes par département.

Les caractéristiques épidémiologiques des souches isolées figurent dans le **tableau 23** ci-dessous :

**Tableau 23.** Résultats des fiches d'information pour *Shigella*

| Sérogroupe         | Nombre de cas | Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                 | Epidémie <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Voyage, pays potentiel de contamination ( ) <sup>a</sup>                                                                                                                                                          |
|--------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. flexneri</i> | 14            | 29, 40, 49, 69(2), 75, 77(4), 93(4),                                                                                                                                                                                                                                                     | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Sénégal, Haïti                                                                                                                                                                                                    |
| <i>S. sonnei</i>   | 164           | 10, 13(3), 14(3), 15, 16, 17(3), 19, 21(3), 22, 27, 29(2), 30, 31(3), 33(4), 35, 36(2), 37(2), 38, 41, 44(5), 45(2), 47, 51(2), 59(14), 60, 63, 65, 67(4), 69(14), 71(5), 72(2), 74(2), 75(13), 76(5), 77(3), 78(4), 80, 81, 83(2), 84(2), 87, 89(2), 91(9), 92(6), 93(10), 94(6), 95(9) | Familiale (3, 21, ?)<br>Familiale (?, 41, Tunisie)<br>Familiale (2, 44, ?)<br>Familiale (2, 59, Guinée)<br>Familiale (2, 59, ?)<br>Familiale (? 69, Algérie)<br>Familiale (?, 89, Maroc)<br>Familiale (?, 92, ?)<br>Familiale (?, 93, ?)<br>Familiale (?, 94, ?)<br>Familiale (?, 95, ?)<br>Ecoles confessionnelles<br>(?, Ile de France, ?) | Algérie (2), Maroc(5), Tunisie (2), Sénégal, Egypte (4), Israël, Mali (2), Cameroun, Côte d'Ivoire, RCA, Guinée, Madagascar (3), Mexique, Brésil, République Dominicaine, Haïti, Inde (9), Thaïlande, Afghanistan |

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

### 3.3 Activités de surveillance

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

##### 3.3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ESS collabore depuis de nombreuses années avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

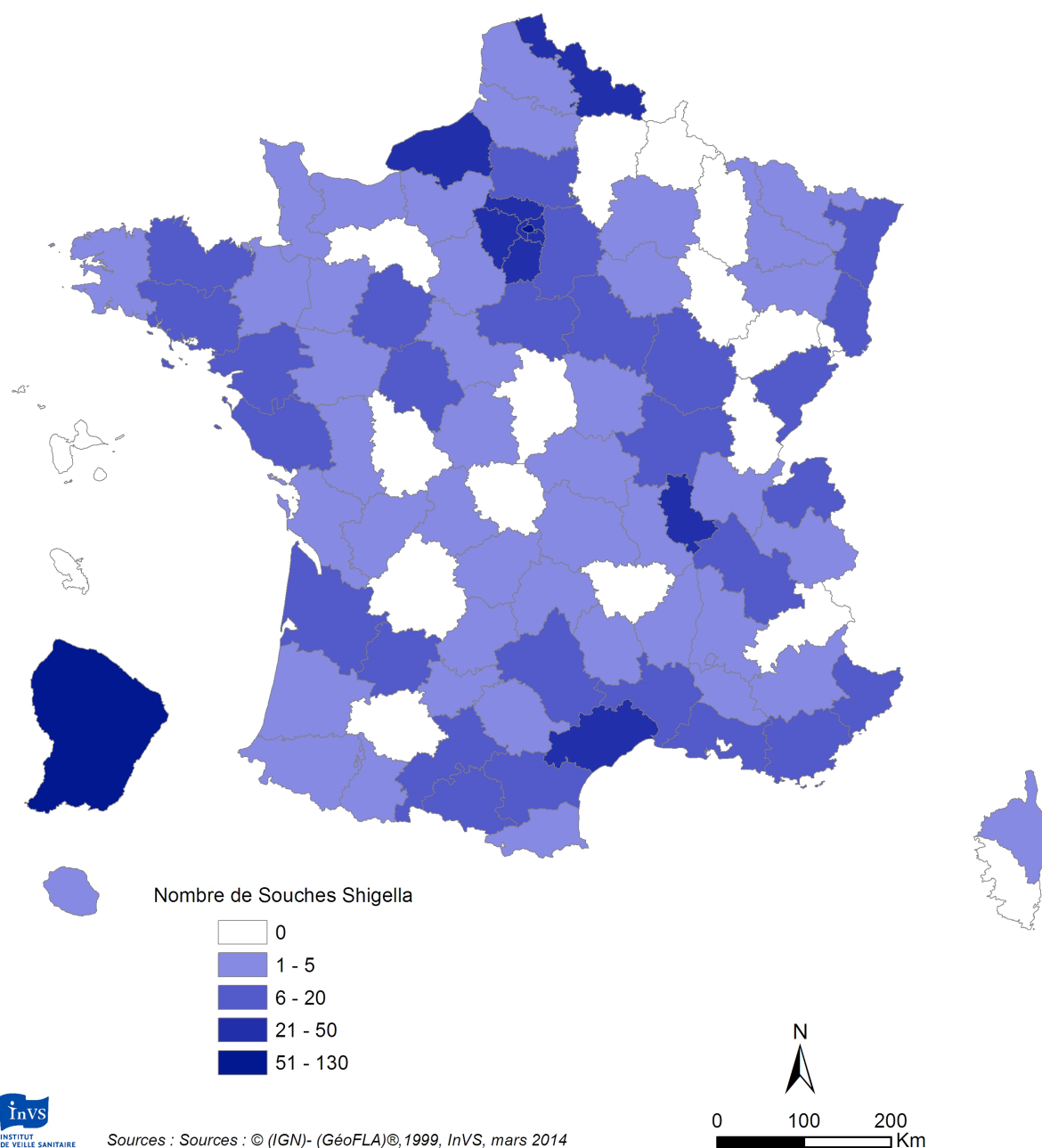
##### 3.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

#### **- Distribution des souches de *Shigella* :**

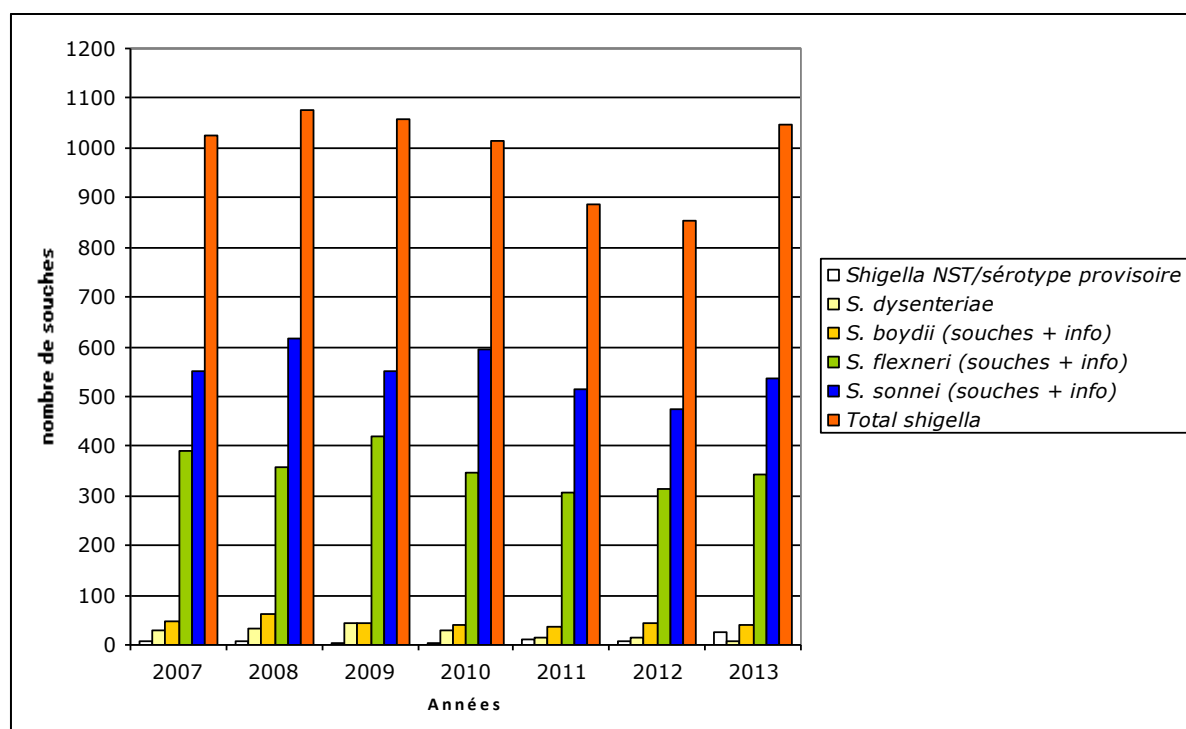
Des souches de *Shigella* d'origine humaine ou des fiches d'information ont été adressées par 83 départements de France métropolitaine et 2 DOM.

Le détail de la répartition par département selon les sérotypes figure dans les tableaux numérotés de 18 à 22. Seuls 13 départements (02, 05, 08, 23, 24, 32, 39, 43, 52, 55, 61, 86, 90) n'ont pas déclaré d'isollements de *Shigella* (souches ou fiches d'information) en 2013.

**Figure 18.** Répartition par département du nombre de souches de *Shigella* et d'information sur les *Shigella* reçues en 2013 (département de domiciliation du patient ou à défaut département du laboratoire expéditeur)



**Figure 19.** Distribution globale des sérogroupes de *Shigella* reçues au CNR-ESS depuis 2007



### 3.3.2 Surveillance de la résistance des shigelles aux anti-infectieux

#### 3.3.2.1 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella* (CNR-ESS)

##### 3.3.2.1.1 Surveillance globale

Depuis 2006, un antibiogramme est réalisé sur toutes les souches de *Shigella* identifiées au CNR-ESS, à l'aide de 16 disques d'antibiotiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du CA-SFM. Dans certains cas, la méthode de l'E-test est utilisée pour déterminer les CMI. Pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G<sup>R</sup>), un antibiogramme complémentaire est effectué ainsi que les CMI aux C3G et l'azithromycine par la méthode E-Test.

Des CMI sont également réalisées pour toutes les souches de *Shigella* résistantes à la ciprofloxacine.

Un antibiogramme a été réalisé en 2013 sur les souches de *Shigella* reçues au CNR-ESS. Les résultats de la résistance aux principaux antibiotiques de 662 souches humaines sur les 664 isolées en France métropolitaine, en 2013 sont présentés dans le **Tableau 24**.

**Tableau 24.** Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de *Shigella* en 2013 en France métropolitaine

| Sérogroupe              | Nb souches testées | AMX         | CRO /CAZ   | K        | GM         | NA          | CIP         | C           | TE        | SSS         | TMP         | SXT         | AMX + SXT   |
|-------------------------|--------------------|-------------|------------|----------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>S. boydii</i>        | 41                 | 31,7        | 0          | 0        | 0          | 9,8         | 0           | 9,8         | 63,4      | 68,3        | 61          | 53,7        | 26,7        |
| <i>S. dysenteriae</i>   | 7                  | 42,8        | 0          | 0        | 0          | 0           | 0           | 28,6        | 71,4      | 71,4        | 71,4        | 57,1        | 42,9        |
| <i>S. flexneri</i>      | 242                | 69,4        | 1,2        | 0        | 0,4        | 11,2        | 9           | 59,5        | 76,9      | 57,4        | 64,1        | 56,6        | 42,6        |
| <i>S. sonnei</i>        | 348                | 16,6        | 5,2        | 0        | 0,6        | 29,3        | 21,9        | 1,1         | 67        | 71,6        | 98,6        | 87,8        | 13,8        |
| Sérotype provisoire/NST | 24                 | 91,6        | 0          | 0        | 0          | 4,2         | 0           | 66,6        | 83,4      | 50          | 50          | 50          | 45,8        |
| <b>Total</b>            | <b>662</b>         | <b>39,9</b> | <b>3,2</b> | <b>0</b> | <b>0,6</b> | <b>20,2</b> | <b>14,8</b> | <b>25,7</b> | <b>71</b> | <b>65,4</b> | <b>81,6</b> | <b>72,8</b> | <b>26,6</b> |

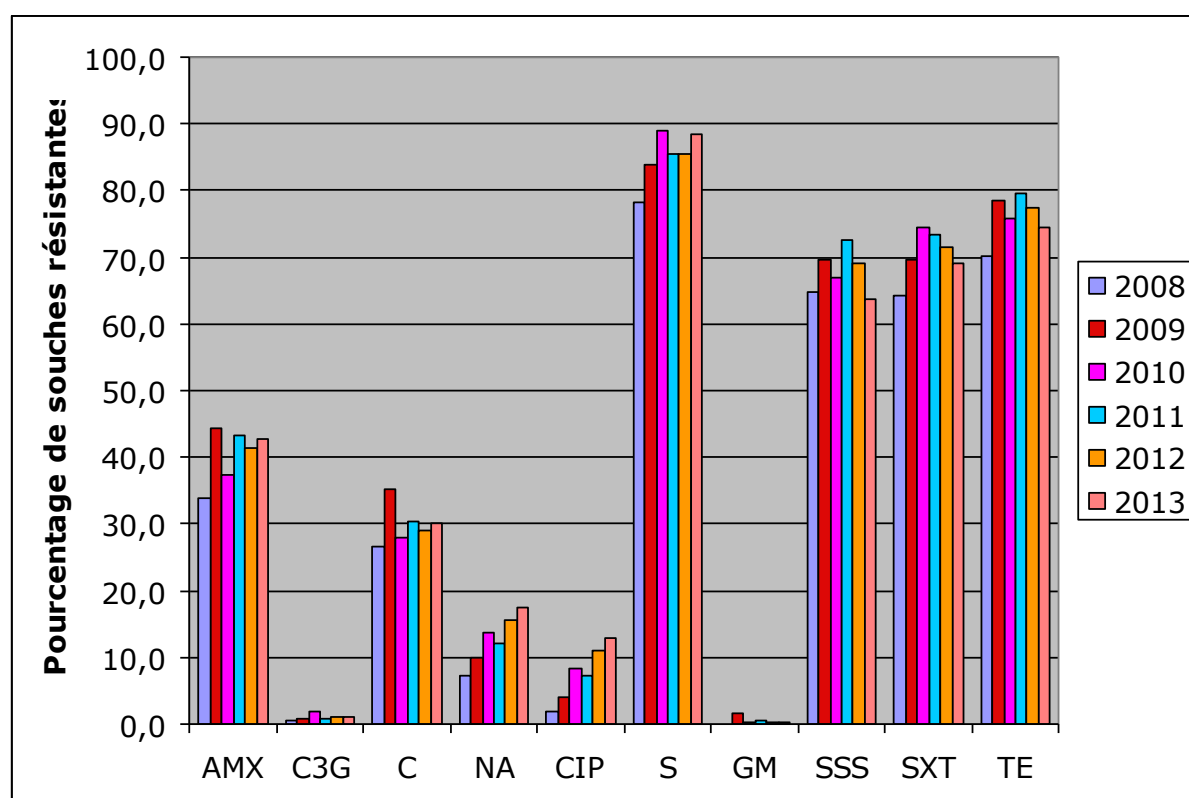
NST : non sérotypables

AMX=amoxicilline, CRO=ceftriaxone, CAZ=ceftazidime, K=kanamycine, GM=gentamicine, NA=acide nalidixique, CIP=ciprofloxacine, C=chloramphénicol, TE=tétracycline, SSS=sulfamides, TMP=triméthoprim, SXT=cotrimoxazole.

**Tableau 25.** Evolution de la résistance aux antibiotiques chez *Shigella spp.* en France métropolitaine et DOM-TOM

| Antibiotique testé      | Pourcentage des souches résistantes en : |      |      |      |      |      |           |
|-------------------------|------------------------------------------|------|------|------|------|------|-----------|
|                         | 2008                                     | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2008-2013 |
| Amoxicilline            | 33,9                                     | 44,5 | 37,3 | 43,3 | 41,3 | 42,7 | 41,3      |
| Ceftriaxone/ceftazidime | 0,5                                      | 0,7  | 1,8  | 0,8  | 1,2  | 1,2  | 1         |
| Chloramphénicol         | 26,7                                     | 35,1 | 27,9 | 30,5 | 29,0 | 30,2 | 30,2      |
| Acide nalidixique       | 7,2                                      | 9,9  | 13,8 | 12   | 15,7 | 17,4 | 11,8      |
| Ciprofloxacine          | 2,0                                      | 4,1  | 8,3  | 7,2  | 11   | 12,8 | 6,8       |
| Streptomycine           | 78,2                                     | 84,0 | 88,9 | 85,4 | 85,4 | 88,5 | 85,7      |
| Gentamicine             | 0,1                                      | 1,7  | 0,1  | 0,5  | 0,4  | 0,4  | 0,5       |
| Sulfamides              | 64,9                                     | 69,7 | 67   | 72,7 | 69,0 | 63,7 | 68        |
| Cotrimoxazole           | 64,3                                     | 69,7 | 74,6 | 73,3 | 71,5 | 69,1 | 70,3      |
| Tétracyclines           | 70,1                                     | 78,6 | 75,9 | 79,5 | 77,3 | 74,5 | 75,2      |

**Figure 20.** Evolution des résistances aux antibiotiques de *Shigella* spp de 2008 à 2013



Une augmentation de la résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones est notée d'année en année. En 2013, 17,4% et 12,8% des souches étaient respectivement résistantes à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine par rapport à 15,7 et 11% en 2012.



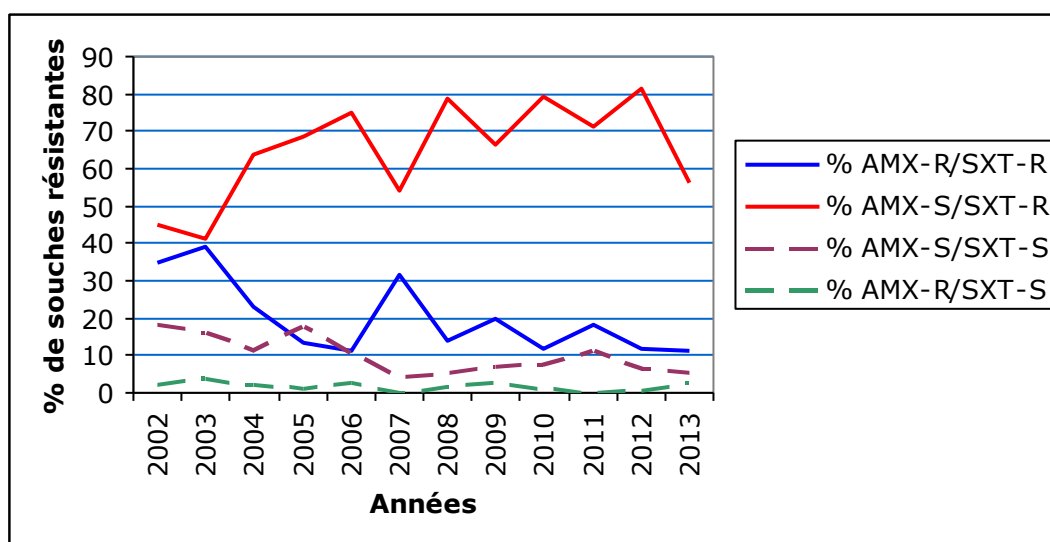
### 3.3.2.1.2 Surveillance de *Shigella sonnei*

Ce séro groupe est particulièrement surveillé depuis l'apparition de souches résistantes simultanément à l'amoxicilline et au cotrimoxazole (AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup>) dans les années 2000 (2002, 2003) puis en 2007 suite à la survenue d'épidémies dans des écoles confessionnelles de l'Ile de France au cours desquelles, a été mise en évidence une résistance additionnelle à l'azithromycine (AZM) (CMI >256 ml/L). Depuis, un antibiogramme incluant l'AZM a été mis en place pour toutes les souches de *S. sonnei* AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup> en utilisant, à la fois, la méthode de diffusion (détermination du diamètre de la zone d'inhibition) et la méthode Etest (détermination des CMI).

Depuis 2007, aucune nouvelle épidémie avec des souches AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup>-AZM<sup>R</sup> n'a été détectée.

La figure ci-dessous montre l'évolution de la résistance à l'amoxicilline et au cotrimoxazole chez *S. sonnei* biotype g depuis 2002.

**Figure 21.** Analyses des tendances des résistances à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez *Shigella sonnei* biotype g



Le nombre de *S. sonnei* résistantes à l'azithromycine (CMI>16 g/L) sur la période 2007-2013 est indiqué dans le **tableau 26**.

**Tableau 26.** Caractéristiques des souches de shigelles résistantes à l’azithromycine depuis 2007

| Année | Nb de souches | Sérotype                  | CMI AZM (mg/L)        | Sensibilité AMX/SXT (nombre) |
|-------|---------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 2007  | 1             | <i>S. sonnei</i> g        | 18                    |                              |
|       | 19            | <i>S. sonnei</i> g        | 24                    | RR (18), SR (1)              |
|       | 19            | <i>S. sonnei</i> g        | 32                    | RR (15), SR (2)<br>SS (2)    |
|       | 1             | <i>S. sonnei</i> g        | 48                    | RR                           |
|       | 1             | <i>S. sonnei</i> g        | 64                    | SR (1)                       |
|       | 45            | <i>S. sonnei</i> g        | >256                  | RR (45)                      |
| 2008  | 0             | <i>S. sonnei</i> g        |                       |                              |
| 2009  | 1             | <i>S. sonnei</i> a        | >256                  | RR (1)                       |
| 2010  | 2             | <i>S. sonnei</i> g        | >256                  | RR (2)                       |
| 2011  | 4             | <i>S. sonnei</i> g        | 32<br>48<br>64<br>256 | RR (4)                       |
| 2012  | 1             | <i>S. flexneri</i> 2a     | >256                  | RS (1)                       |
|       | 1             | <i>S. flexneri</i> Boyd88 | >256                  | RR (1)                       |
| 2013  | 2             | <i>S. sonnei</i> g        | >256                  | RR (2)                       |

### 3.3.2.1.3 Résistances émergentes chez *Shigella* spp

Depuis 2005, le CNR-ESS a noté une augmentation du nombre de souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G<sup>R</sup>) par production d’une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) ainsi que du nombre de souches résistantes à haut niveau à la ciprofloxacine (CIP<sup>R</sup>, CMI > 1 mg/L). Ces souches essentiellement de sérogroupes *S. sonnei* et *S. flexneri* ont été acquises principalement lors d’un séjour en Inde ou de pays limitrophes.

#### ➤ Résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

En 2013, 9 souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont été isolées, 7 souches de *S. sonnei* et 2 souches de *S. flexneri*, toutes isolées en France métropolitaine à l’exception d’une souche de *S. sonnei* g et de *S. flexneri* 3a isolées de personnes de retour respectivement du Maghreb et d’Ethiopie. L’analyse des mécanismes de résistance (type de BLSE) de ces souches est résumée dans le **tableau 27**.

**Tableau 27.** Caractéristiques des souches résistantes aux C3G isolées en 2013

| N°CNR      | Sérotype             | Profil de résistance | CMI (mg/L)       |                  |                  | Type de BLSE | Notion de voyage |
|------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
|            |                      |                      | CRO <sup>1</sup> | CAZ <sup>1</sup> | CIP <sup>1</sup> |              |                  |
| 2013/00694 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmp          | >256             | 8                | -                | CTXM-1       |                  |
| 2013/01550 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmp          | 24               | 0,75             | 8                | CTXM-1       |                  |
| 2013/02179 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmp          | 48               | 6                | 6                | CTXM-15      |                  |
| 2013/07390 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmpNalCIP    | >256             | 12               | 12               | CTXM-55 like |                  |
| 2013/08207 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmp          | 48               | 3                | ND               | CTXM-1       | Maghreb          |
| 2013/08616 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmpNalCIP    | 96               | 1                | 4                | CTXM-1       |                  |
| 2013/08995 | <i>S.sonnei</i> g    | ASSpTeSuTmpNalCIP    | 32               | 0,5              | 4                | CTXM-1       |                  |
| 2013/02829 | <i>S.flexneri</i> 3a | ASSpTeSuTmp          | >256             | 12               | -                | CTXM-15      | Ethiopie         |
| 2013/02910 | <i>S.flexneri</i> 3a | ASSpTeSuTmp          | >256             | 12               | -                | CTXM-15      |                  |

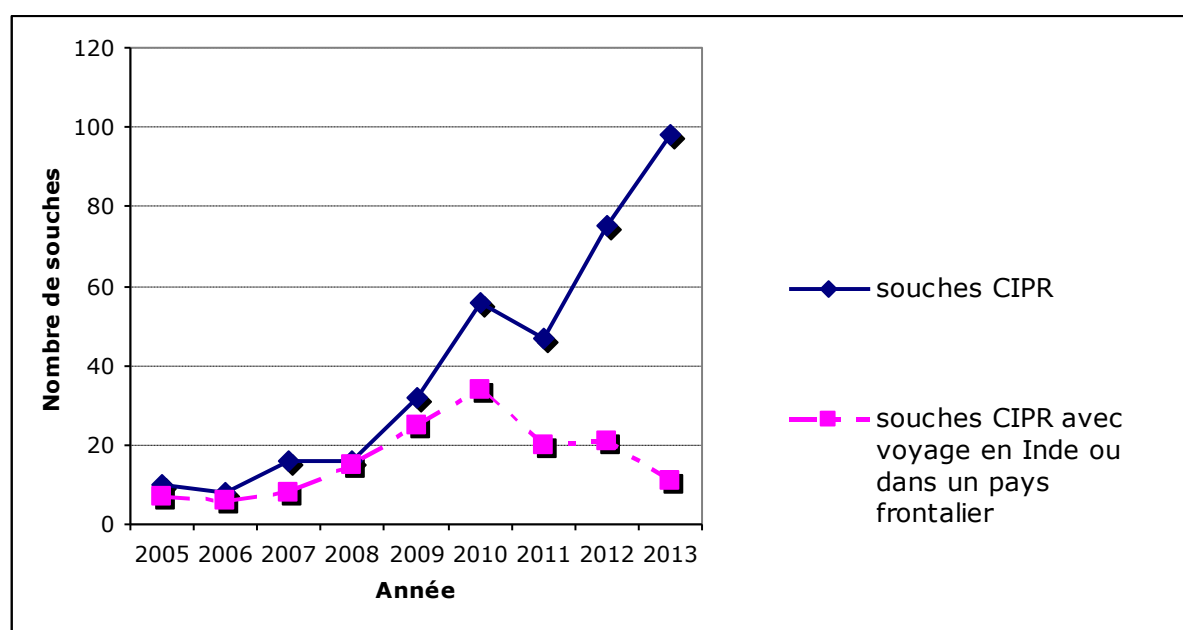
<sup>1</sup> : CRO, ceftriaxone ; CAZ, ceftazidime ; CIP, ciprofloxacine.

A, amoxicilline ; S, streptomycine ; Sp, spectinomycine ; Te, tétracyclines ; Su, sulfamides ; Tmp, triméthoprim ; Nal, acide nalidixique

### ➤ Résistance de haut niveau à la ciprofloxacine

La résistance de haut niveau à la ciprofloxacine de souches de *Shigella* isolées en France métropolitaine n'a cessé d'augmenter depuis 2005 (**Figure 19**). En 2013, cette résistance touche 12,8 % (98/767) des shigelles, dont 9 isolées chez des patients de retour d'Inde ou de pays limitrophes.

**Figure 22.** Evolution du nombre de *Shigella* CIP<sup>R</sup> au CNR-ESS entre 2005 et 2013



### 3.3.3 Participation aux réseaux de surveillance

#### 3.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

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

#### 3.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

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

### 3.3.4 Détection et investigation des cas

#### 3.3.4.1 Epidémie à *Shigella sonnei* dans le Val d'Ariège en août 2013

En juillet 2013, est survenue une épidémie à *Shigella sonnei* au cours d'un festival de musique « Terres de couleurs » à Daumazan-sur-Arize en Ariège ayant rassemblé 300 bénévoles, 150 artistes et 3500 festivaliers. Les investigations environnementale, épidémiologique et microbiologique menées par l'ARS et l'InVS ont révélé plusieurs voies de transmission potentielles : aliments souillés par des manipulateurs excréteurs, contamination inter-humaine favorisée par des conditions d'hygiène déficientes.

Sur les 119 cas de gastroentérite aigue, 16 cas ont été confirmées microbiologiquement au CNR comme étant des *S. sonnei* de biotype g, ayant le même antibiotype (souche résistante à la streptomycine, spectinomycine et triméthoprim).

L'investigation épidémiologique a révélé que sur les cas confirmés, deux ont rapporté une date de début des symptômes antérieure à leur arrivée sur le site du festival alors qu'ils participaient à un autre festival musical (Nowhere) en Aragon dans le nord de l'Espagne au cours duquel, une épidémie à *Shigella sonnei* était également survenue.

Par ailleurs, le CNR a reçu, à la même période, d'un laboratoire de Seine-Saint-Denis, une souche isolée chez une personne de retour d'Espagne qui s'est rendue au festival de musique espagnol sans aller en Ariège ainsi qu'une souche isolée dans un laboratoire autrichien d'un cas, de retour du festival d'Espagne. Les deux souches étaient également de biotype g et avaient le même antibiotype que celui des cas ariégeois.

En plus de ces 16 cas, d'autres foyers secondaires ont été identifiés en Ariège et dans les départements limitrophes. Au total, le CNR a reçu 26 souches dans le cadre de l'investigation de cette épidémie.

Un séquençage complet de ces souches est en cours dans le cadre d'une collaboration avec le Wellcome Trust Sanger Institute.

#### 3.3.4.2 Cas groupés à *Shigella flexneri* 1c dans une communauté des gens du voyage

Une épidémie d'infections à *S. flexneri* 1c est survenue à Tours en avril puis en août 2013 ayant touché respectivement 5 et 4 personnes dans une même famille, issues toutes deux de la communauté des gens du voyage. La souche isolée dans les deux épisodes avait le même antibiotype : résistance à l'amoxicilline, la streptomycine, la spectinomycine, aux tétracyclines et au chloramphénicol.

#### 3.3.4.3 Epidémie à *S. sonnei* en Ile de France (septembre 2013 – heure actuelle)

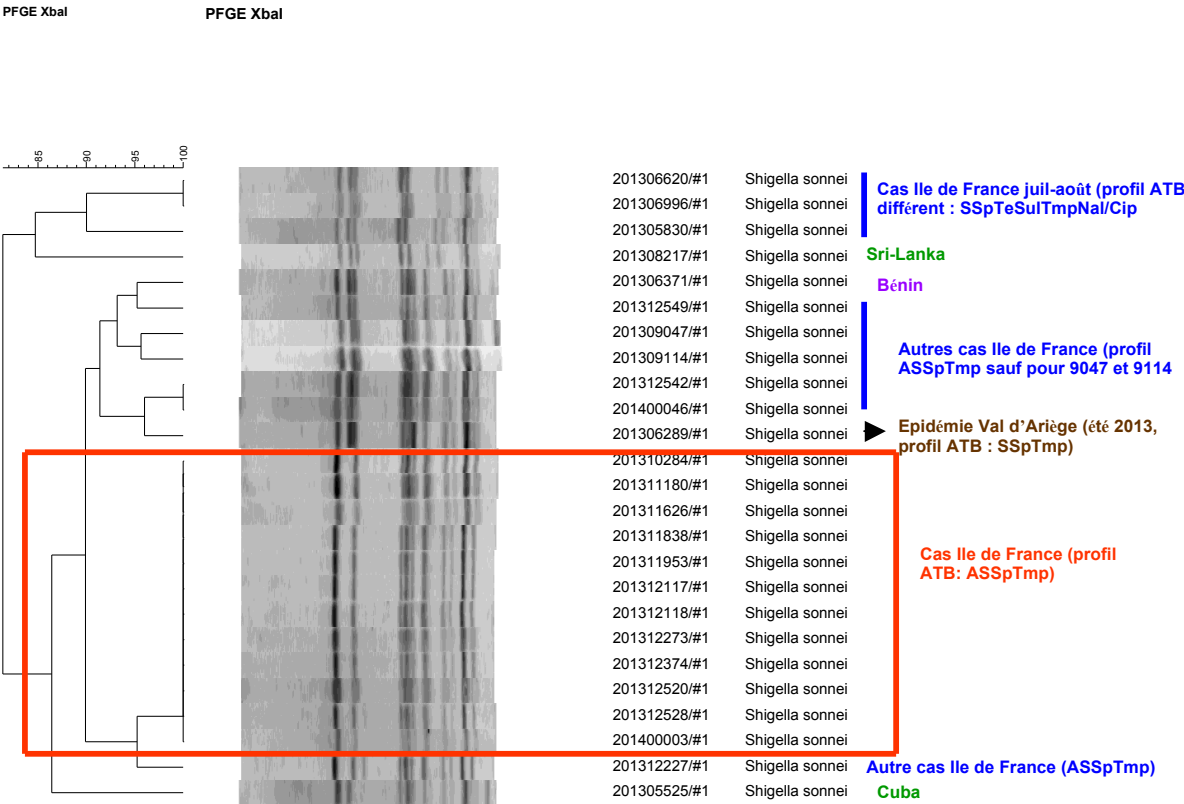
En janvier 2014, le CNR informe l'InVS d'une augmentation du nombre de souches de *S. sonnei* de biotype g isolées en Ile de France. En effet, 23 souches ont été isolées en décembre contre 7 en novembre. Les 23 souches avaient toutes le même antibiotype avec une résistance à l'ampicilline, la streptomycine, la spectinomycine et au triméthoprim (ASSpTpm) et ont été isolées chez des enfants fréquentant tous des établissements confessionnels parisiens.

L'épidémie continue de s'étendre et au 13 mars 2014, 61 cas sur 12 établissements scolaires ont été confirmés au CNR.

Le CNR a réalisé une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) sur 16 souches isolées dans le cadre de cette épidémie en parallèle avec d'autres souches de *Shigella sonnei* de biotype g isolées dans d'autres épidémies ou lors de cas sporadiques (**Figure 23**).

Le résultat du PFGE montrait que la majorité des souches liées à cette épidémie ayant le même antibiotype (ASSpTpm) avait un profil PFGE identique. Cependant quelques souches ayant également le profil ASSpTpm n'étaient pas groupées avec le cluster "épidémique".

**Figure 23.** Analyse par électrophorèse en champ pulsé de *S. sonnei* (IDF, 2013)



## 4/ Alerte

Les responsables du CNR sont en relation quotidienne avec leurs homologues du Département des Maladies Infectieuses de l'InVS. Les épidémies potentielles détectées sont signalées par téléphone à l'InVS afin de vérifier si l'épidémie est connue et s'informer de l'enquête éventuellement en cours à leur niveau. Le CNR participe activement aux conférences téléphoniques lors des investigations d'épidémies.

Le CNR signale systématiquement à l'InVS en temps réel par téléphone, fax ou courrier électronique :

Pour les *E. coli* :

- tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans,
- toute souche ou selle positive pour les gènes *stx*,
- tout résultat positif de sérologie *E. coli* ainsi que tout résultat positif et/ou négatif de sérologie *E. coli* concernant des enfants de moins de 15 ans.

Pour les *Shigella* :

- tous les cas groupés,
- toute augmentation anormale du nombre de *Shigella* d'un sérotype donné,
- tout nouveau profil de résistance aux antibiotiques.

Pour les *Salmonella* :

- toutes les élévations anormales de sérotypes détectées par le programme de détection ou par les responsables du CNR,
- tout nouveau profil de résistance aux antibiotiques.

Le CNR fournit au Réseau Européen de surveillance (ECDC-FWD), à travers la plate forme épidémiologique EPIS et la plate forme moléculaire Tessy-MSS, les caractéristiques microbiologiques des souches responsables d'épidémies nationales ou locales qui présentent une potentialité à se produire dans d'autres pays de la communauté européenne ou internationale et le nombre de souches ayant le même sérotype que certaines souches épidémiques signalées en Europe.

## 5/ Activités d'information, de formation et de conseil

### 5.1 Réunions et missions

- S. Le Hello. Audition dans le cadre de la saisine de l'ANSES : Identification des variants de *Salmonella* Typhimurium et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole » - demande d'informations, 17 janvier 2013, direction de l'évaluation des risques, ANSES.
- S. Le Hello. Participation au cours Global Foodborne Network, 11 au 17 février 2013, Calcutta, Inde.
- M. Gouali. Participation à la deuxième réunion du Réseau de l'EFSA-ECDC (Autorité européenne de sécurité des aliments-Centre Européen pour la prévention et le contrôle des maladies), le 18 avril 2013, Uppsala, Suède.
- M. Gouali. Participation à la cinquième réunion du Réseau FWD, 19 avril 2013, Uppsala, Suède.
- F.-X. Weill. Conseil scientifique de l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg, 6 au 7 juin 2013, Saint-Petersbourg, Russie.
- M. Gouali. Evaluation du laboratoire de sécurité alimentaire de l'Institut Pasteur du Cambodge, 8 au 16 juin 2013, Phnom-Penh, Cambodge.
- S. Le Hello. Collaboration au CHU de Limoges sur « *Salmonella* Montevideo » suite à une épidémie, 27 septembre 2013, Limoges.
- M. Gouali. Journée d'échanges et d'informations du réseau officiel *E. coli* producteurs de Shiga-toxines et *E. coli* O157 organisée par le laboratoire national de référence pour les *E. coli* y compris les STEC, 3 octobre 2013, Lyon.
- F.-X. Weill. Réunion de lancement du réseau ouest-africain pour la recherche sur les maladies entériques à potentiel épidémique (Réseau REMENTA) organisée par l'Institut Pasteur du Dakar, 7 au 10 octobre 2013, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.
- S. Le Hello. Participation à la réunion FWD Molecular Surveillance MidPilot Investigators Meeting à l'ECDC, 26 au 27 novembre 2013, Stockholm, Suède.

À l'occasion de la Journée européenne d'information sur les antibiotiques, le 18 novembre 2013, Mme Marisol Touraine, Ministre des Affaires sociales et de la Santé, et M. Stéphane Le Foll, Ministre de l'Agriculture, se sont rendus à l'Institut Pasteur et ont visité le CNR-ESS.

M. Yong Zhang, Ministre de la China Food and Drug Administration, République Populaire de Chine a visité le CNR-ESS le 2 décembre 2013.

### 5.2 Enseignement / formation

- F.-X. Weill. Cours de Bactériologie Médicale de l'Institut Pasteur, « *Salmonella* », 18 avril 2013, Paris.
- F.-X. Weill. Formation InVS «Salmonelloses, illustration d'une application des méthodes de typage et de leurs limites dans la surveillance et les investigations d'épidémie, 12 mars 2013, Saint-Maurice.
- M. Gouali. Formation InVS « Méthodes de typage des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines », 12 mars 2013, Saint-Maurice.



- S. Le Hello. Membre du Jury des soutenances du BTS Bio analyse et Contrôles, 21 juin 2013, ENCPB, Paris.
- F.-X. Weill. Cours Master 2 de Microbiologie (Institut Pasteur, Paris 5/6/7), « Epidémiologie des salmonelloses mineures : évolution, résistance et facteurs génétiques », 1<sup>er</sup> octobre 2013, Paris.
- S. Le Hello. Membre du Jury de la thèse pour le diplôme d'état de Dr en Pharmacie (Paris Descartes) de Mme Colomb-Cotin « reptiles à domicile : un risque de salmonellose parfois sévère chez les enfants », 2 octobre 2013, Paris.
- S. Le Hello. Membre du Jury de la thèse de doctorat ParisTech de M. Djim-adjim Tabo « étude de la contribution des salmonelloses aviaires aux salmonelloses humaines au Tchad », 18 octobre 2013.
- S. Le Hello. Participation aux journées « Programme de lutte contre les salmonelles en filière avicole », 24 octobre 2013, Direction générale de l'alimentation, Paris.
- S. Le Hello. Participation aux journées du réseau *Salmonella* : « Synthèse des données de surveillance du CNR *Salmonella* pour l'année 2012 et actualités », 17<sup>eme</sup> réunion du réseau *Salmonella*, 14 novembre 2013, Maisons-Alfort.
- S. Bonacorsi, P. Mariani-Kurkdjian. Participation à l'enseignement universitaire sur les *E.coli* intestinaux et extraintestinaux pour DCEM1, DES de Biologie, DIU de Pathologie infectieuse pédiatrique (organisé par le Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique), Hôpital Saint Vincent de Paul Paris (3 heures par an), Internes de Pédiatrie et de Biologie au sein de l'hôpital Robert Debré.
- P. Mariani-Kurkdjian. Participation à l'enseignement du cours de Bactériologie médicale à l'Institut Pasteur.
- P. Mariani-Kurkdjian. Formation continue aux techniques de laboratoire. Formation continue des biologistes à la faculté de Pharmacie Paris V (Bioforma).

### 5.3 Accueil de stagiaires

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

#### Liste des stagiaires au CNR-ESS en 2013 :

- Melle Alicia TRAN DIEN, Master 2 Microbiologie Fondamentale (Paris X), 3 décembre 2012 au 28 juin 2013 sur la génomique comparative des supports de la multirésistance aux antibiotiques (plasmides et SRL) chez *Shigella dysenteriae* de type 1.
- M. Grégory DOUARD, Post-doctorant à l'ANSES, 7 au 18 janvier 2013 sur la caractérisation des plasmides supportant la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de BLSE isolées de la filière équine.
- Melle Joana LANDIER, Elève de 3<sup>ème</sup>, 18 au 22 février 2013, stage d'observation.
- M. Ethan CASANG, Elève de 3<sup>ème</sup>, 25 février au 1<sup>er</sup> mars 2013, stage d'observation.

- Melle Catherine LIM, Master 1 Biologie moléculaire et cellulaire (Paris V), 8 avril au 31 mai 2013 sur la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques de *Salmonella* Blockley et autres populations résistantes à l'azithromycine.
- M. Nicolas ALEXANDRE, BTS 1<sup>ère</sup> année Biotechnologies, 13 mai au 5 juillet 2013 sur le génotypage CRISPOL des populations de *Salmonella* Typhimurium
- M. Thomas OTTONE, 1<sup>ère</sup> année de BTS Bio-analyses et contrôles, 3 juin au 12 juillet 2013 sur la validation d'une stratégie de détection des EHEC dans les selles de patients par l'utilisation du test immunochromatographique ImmunoCard STAT EHEC (Meridian) détectant les shiga-toxines *stx1* et *stx2* et d'une gélose chromogénique, CHROMagar STEC (CHROMagar).
- Mme Vivianne MOREL, Technicienne à l'ANSES, 14 au 18 octobre 2013 sur le sérotypage de salmonelles d'agglutination difficile.
- M. Geoffrey COSTILHES, Master Microbiologie Appliquée et Génie Biologique (Paris X), en contrat d'apprentissage, 21 octobre 2013 au 30 septembre 2014 sur la dynamique évolutive de deux lignées invasives de *Salmonella* Typhimurium ST313 en Afrique sub-saharienne.
- Mr Geoffroy DE PIMODAN, Elève de 3<sup>ème</sup>, 2 au 6 décembre 2013, stage d'observation.
- Melle Estelle PROTHERY, BTS 2<sup>ème</sup> année Biotechnologies, 9 décembre 2013 au 14 février 2014 sur la recherche de gènes de virulence *stx1* et *stx2* dans une collection de souches de *Shigella*.
- M. Loric CARLE, Elève de 3<sup>ème</sup>, 16 au 20 décembre 2013, stage d'observation.
- M. Nicolas ALEXANDRE, BTS 2<sup>ème</sup> année Biotechnologies, 16 décembre 2013 au 21 février 2014 sur la caractérisation des gènes de résistance chez les populations de *Salmonella* multi-résistante de Nouvelle-Calédonie.

Liste des stagiaires au LA-RD en 2013 :

- Melle Chloe Lemaitre. Thèse de Sciences – Analyse fonctionnelle du plasmide pS88 impliqué dans la virulence de *E. coli* responsable de méningite.

## 5.4 Congrès

- P. Mariani-Kurkdjian. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 7 et 8 février, Lille.
- P. Mariani-Kurkdjian. Congrès de la Société Française de Pédiatrie, 15 et 16 mai, Clermont-Ferrand.
- F.-X. Weill. Président de la session « Genomic and application », Congrès International of *Salmonella* and Salmonellosis (I3S), 26 au 29 mai 2013, St Malo.
- S. Le Hello. Journées départementales Infection & Epidémiologie de l'Institut Pasteur, 30 septembre au 1er octobre 2013, Belle Eglise.
- P. Mariani-Kurkdjian. Journées Parisiennes de Pédiatrie, 5 octobre 2013.
- S. Le Hello. “*Salmonella* non-typhiques: nouvelles marches vers la pan-resistance aux antibiotiques», communication orale à la 33<sup>e</sup> réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, 21 et 22 novembre 2013, CNIT Paris La Défense. Cette communication a obtenu le prix RICAI dans le domaine Bactériologie.

## 5.5 Information et conseil aux biologistes et praticiens

La plupart des informations concernant le CNR-ESS-LA (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais d'une page Internet sur le site de l'Institut Pasteur dont voici les liens :

[www.pasteur.fr/cnr/salmonelles](http://www.pasteur.fr/cnr/salmonelles)

[www.pasteur.fr/ccoms/salmonella](http://www.pasteur.fr/ccoms/salmonella)

[www.pasteur.fr/cnr/ecoli-shigelles](http://www.pasteur.fr/cnr/ecoli-shigelles)

Les résultats sont envoyés au laboratoire par courrier, une copie peut être envoyée par fax ou par courrier électronique sur demande du laboratoire.

Des conseils à la fois pratiques (milieu de transport, feuille d'information...), diagnostic (importance des gènes de pathogénicité ou du sérotype détecté...), thérapeutiques et/ou épidémiologiques sont donnés de façon quasi quotidienne par téléphone ou courrier électronique ([colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr) ou [salmonella@pasteur.fr](mailto:salmonella@pasteur.fr)).

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

### **6.1 Activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.**

#### **6.1.1 *E. coli***

##### **\* *E. coli* extra intestinaux (LA-RD)**

- **Participation au PHRC national ZYTHROSHU 2013**

« Intérêt de l'Azithromycine dans le traitement des syndromes hémolytiques et urémiques post diarrhée » Les objectifs de ce PHRC national sont :

- l'évaluation de l'intérêt d'un traitement précoce des SHU typiques post diarrhée (D+HUS) par azithromycine sur la fonction rénale à court terme (1 mois).
- l'évaluation de l'impact du traitement par azithromycine sur les différentes atteintes d'organes lors du D+HUS à la phase dite « aigue » de la pathologie (soit le premier mois après le diagnostic ou la sortie d'hospitalisation du patient)
- l'évaluation de l'impact du traitement par azithromycine sur l'éradication des EHEC à une semaine du traitement par azithromycine et le profil de résistance à l'azithromycine.

- **Unité INSERM 1137**

S. Bonacorsi et P. Mariani sont membres de l'équipe 2 de l'unité INSERM 1137 nouvellement créée en 2014. La thématique de l'unité porte sur *Escherichia coli* : épidémiologie de la résistance, étude des mécanismes de virulence avec des approches évolutives et de modélisation. Les travaux menés par les membres du LA-RD portent plus spécifiquement sur le rôle du plasmide de virulence pS88 séquencé dans les méningites néonatales, sur les apports potentiels de la phagothérapie dans le traitement des infections à *E. coli* multirésistants et sur la caractérisation d'un clone émergent de EHEC O80:H2 *stx2*.

- **Etude clinico-biologique des méningites néonatales à *E. coli* en France (LA-RD)**

Le LA-RD a reçu l'accord du groupe de pathologie infectieuse pédiatrique (GPIP) pour effectuer le recueil exhaustif des données cliniques auprès de chaque service clinique. Cette étude porte sur les antécédents familiaux, le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et des suites de couches, l'examen clinique à la naissance et le terme de l'enfant, les antécédents personnels, le tableau clinique au moment de la prise en charge de la méningite, l'évolution avec en particulier, le décès ou l'apparition de complications et localisations parenchymateuses. Le bilan infectieux réalisé est détaillé ainsi que l'antibiogramme de chaque souche. Enfin la prise en charge thérapeutique est étudiée en particulier avec le type, la dose, et la durée des antibiotiques.

- **Participation au PHRC national COMBAT**

« Observatoire des méningites bactériennes de l'adulte » pour la caractérisation des souches de *E. coli*. Début janvier 2013.

- **Participation à l'étude du portage des BLSE dans la flore fécale chez l'enfant** en lien avec le groupe ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique du Val de Marne)

- **Participation à l'Observatoire des pyélonéphrites à *E. coli* BLSE** sous l'égide du GPIP (LA-RD).

**\* EHEC (LA-RD)**

- **Etude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées chez l'homme, l'animal et dans les aliments en France - Convention de recherche et développement ANSES, VETAGRO SUP**

L'objectif général de ce projet vise à établir un bilan national (analyse de tendance et comparaison) des caractéristiques génétiques (types et profils de virulence) et phénotypiques (antibiorésistance) des souches STEC isolées chez l'homme, dans les aliments (produits considérés comme « à risque » c'est-à-dire produits carnés laitiers essentiellement et végétaux), mais également dans le réservoir animal et son environnement. Ce bilan permettra ainsi :

- d'obtenir une analyse comparée des profils des souches animales (au sens large) et humaines et de vérifier l'existence ou non de relations clonales et de flux de gènes de virulence ou d'antibiorésistance entre ces populations.
- d'établir une surveillance des flux de gènes entre les populations de STEC présentes le réservoir animal (i.e. isolés chez les animaux, dans les denrées alimentaires ou dans l'environnement) et celles isolées chez les patients en France.
- d'obtenir par conséquent des données quant à l'émergence de nouveaux clones pathogènes pour l'homme.
- de proposer des données nécessaires à l'amélioration des systèmes de surveillance des souches STEC en France.

Ce bilan permettra ainsi une meilleure évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de souches EHEC dans les aliments en France.

### **6.1.2 *Shigella* (CNR-ESS)**

#### **6.1.2.1 Génétique et génomique évolutive de *Shigella***

Ces travaux permettent de mieux comprendre comment évoluent les génomes au cours du temps et conduisent au développement d'outils moléculaires permettant notamment de différencier des souches épidémiques de souches sporadiques et ce même au sein de populations bactériennes génétiquement très homogènes (exemple des *S. sonnei* de biotype « g »).

Ces travaux se font en collaboration avec les Prs G. Dougan et N. Thomson du Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Royaume Uni, le Dr K. Holt de l'University of Melbourne, Australie, le Dr S. Brisse de l'Unité de Génomique Evolutive des Microbes de l'Institut Pasteur et avec le Dr C. Bouchier de la Plateforme de Génomique de l' Institut Pasteur.

Le CNR-ESS apporte son expertise sur la circulation des populations bactériennes, effectue la sélection des souches représentatives à partir de sa collection, effectue la caractérisation moléculaire et phénotypique de première intention et des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et en fonction des projets (porteur ou collaboration) recherche des financements (fonctionnement et salaires) pour le séquençage haut-débit, l'analyse et l' interprétation des résultats.

#### 6.1.2.2 Génomique épidémiologique de *S. sonnei*

Ce projet fait suite à l'étude sur la structure des populations de *S. sonnei* (132 génomes dont 54 issus du CNR-ESS) coordonnée par le Wellcome Trust Sanger Institute et publiée en 2012 dans *Nature Genetics* (Holt et al.). Il s'agit maintenant d'utiliser le séquençage complet à haut débit (méthodologie Illumina) pour suivre et mieux comprendre les épidémies à *S. sonnei*. Une nouvelle sélection d'une cinquantaine souches de *S. sonnei* « g » du CNR-ESS est en cours de séquençage. Il s'agit de souches isolées d'écoles confessionnelles entre 1996 et 2007 en France et en Amérique du Nord ainsi que des souches de deux épidémies en lien avec des festivals en Espagne et en Ariège en 2013. Les résultats seront comparés aux méthodes traditionnelles (antibiotypie, PFGE) qui sont très peu discriminantes avec ce biotype et seront confrontés aux données épidémiologiques. Les génomes seront également comparés à de nouveaux génomes issus d'écoles confessionnelles du Royaume Uni, de Belgique et de souches circulantes en Israël.

#### 6.1.2.3 Etude de la structure des populations et suivi de clones internationaux de *S. flexneri*

Ce projet coordonné par le Wellcome Trust Sanger Institute concerne le séquençage complet (méthodologie Illumina) d'une collection représentative mondiale de plus de 500 souches de *S. flexneri*. Le CNR a participé de façon majeure à cette étude en sélectionnant dans sa collection 151 souches acquises entre 1918 et 2013 sur différents continents et en assurant l'analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence une population de *S. flexneri* 2a ayant acquis un prophage *stx1* à Saint-Domingue et une population de *S. flexneri* 3a circulant chez des homosexuels au Royaume Uni et en France.

#### 6.1.2.4 Étude de l'évolution génomique de *S. dysenteriae* de type 1

*Shigella dysenteriae* de type 1 (Sd1) ou Bacille de Shiga est une bactérie entéropathogène très importante en Santé Publique car elle a un potentiel épidémiogène (responsable de grandes épidémies dans les pays en voie de développement et est parfois importée en France chez des voyageurs), elle possède comme facteur de virulence la Shiga-toxine, elle est multi-résistante aux antibiotiques, (iv) et c'est un agent infectieux potentiel pour le bioterrorisme.

Le CNR-ESS a initié et coordonné une étude de génomique évolutive de cet agent pathogène après avoir rassemblé pendant 7 ans une collection unique de plus de 250 souches isolées sur les différents continents de 1915 à 2011. Ces souches proviennent de la collection du CNR ainsi que de celles de nombreuses équipes participantes: CDC (Atlanta, USA), iccdr,b, (Dacca, Bangladesh), PHE (Colindale, Royaume Uni), PHAS (Stockholm, Suède), NIPH (Oslo, Norvège), AFRIMS (Bangkok, Thaïlande), RKI et BfR (Berlin, Allemagne), CDCC (Pékin, Chine), CIP (Paris, France), ...

L'analyse de la sensibilité aux antibiotiques de cette collection a permis d'identifier les 1ères souches multirésistantes lors de la grande épidémie d'Amérique centrale en 1969-1972. Cette résistance à la streptomycine, aux sulfamides, au chloramphénicol et à la tétracycline était médiée par un plasmide de type IncB. De 1972 à 1981, plusieurs autres plasmides, de types IncX, IncF ou IncII, entraînant une résistance additionnelle aux aminopénicillines et au cotrimoxazole ont été identifiés. Nous avons mis en évidence qu'au cours des années 1980 à partir de l'Inde, la très grande majorité des souches avait acquis dans le chromosome un îlot

de pathogénicité (le PAI) comportant une région de multirésistance aux antibiotiques (le SRL).

A ce jour le séquençage par la méthode Illumina a été réalisé sur 129 souches. L'analyse des 3600 SNPs informatifs et du génome accessoire a permis de mettre en évidence 5 lignées génétiques avec une forte tendance phylogéographique. Cependant une transmission intercontinentale entre le sous-continent Indien et l'Afrique de l'Est a été mise en évidence à la fin des années 1980 avec un rapide remplacement des lignées africaines antérieures par cette nouvelle souche possédant le SRL. Des souches historiques ont permis de mettre en évidence une ligne génétique ayant circulé en Europe du Sud et de l'Est au moins depuis 1915 (bataille des Dardanelles) et jusque dans les années 1970 en Afrique du Nord. Le séquençage de 80 nouvelles souches (historiques et asiatiques) prévu en 2014 a pour but de mieux caractériser les lignées ayant circulé au cours de la première guerre mondiale et pour mieux documenter la transmission de la souche émergente depuis l'Asie vers l'Afrique de l'Est.

Six plasmides de grande taille des différents groupes d'incompatibilité sont en cours d'assemblage après séquençage 454 pour comprendre la genèse du SRL-PAI.

#### 6.1.2.5 Méthodes de typage des souches de *Shigella*

Le typage des souches de *Shigella* repose sur le sérotypage à l'aide d'antisérums dirigés contre les antigènes somatiques O. Il est nécessaire de pouvoir disposer de méthodes moléculaires alternatives en cas de souches autoagglutinables (« rough »), de nouveaux sérotypes ou en cas de rupture de stock des sérums de typage.

Tous ces travaux se font au sein du CNR-ESS. Le but ultime étant d'avoir un dictionnaire sérotype/*fliC*/CRISPR/MLST permettant de caractériser l'ensemble des populations de *Shigella* et de EIEC. Les données génomiques seront progressivement incorporées à ce dictionnaire.

- **Caractérisation des séquences du gène *fliC* chez *Shigella* :**

Les souches de *Shigella* étant immobiles, le gène de la flagelline est considéré comme cryptique. Il existe une corrélation entre les allèles de *fliC* et le séro groupe des *Shigella*. Ceci a été démontré au CNR-ESS par analyse des profils de restriction de *fliC* (Roney et al. J Clin Microbiol. 2001). Cependant, le séquençage du gène *fliC* par méthode Sanger est plus informatif qu'une analyse des profils de restriction.

Depuis 2009, le CNR-ESS a complété sa base de séquences *fliC* avec 158 souches représentatives des différents sérotypes de *Shigella*. L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence la présence de séquences d'insertion (IS) chez différents sérotypes (*S. boydii* 7, 16 & 17; *S. dysenteriae* 1, 9, 11 et 13). Après suppression des IS, des clusters de séquences *fliC* on été mis en évidence :

- cluster 1 : *S. boydii* 1-4, 6, 8, 10, 14, 18-20 ; *S. dysenteriae* 3-7, 9, 11-15, sérotypes provisoires 93-119 et 97-10607 ; *S. flexneri* 6.
- cluster 2 : *S. boydii* 5, 7, 9, 11-12 sérotype provisoire E1621-54; *S. flexneri* 1-5
- cluster 3 : *S. boydii* 15-17
- cluster 4 : *S. sonnei* des différents biotypes.

Certain sérotypes ont des séquences *fliC* spécifiques: *S. boydii* 13; *S. dysenteriae* 1, 8, 10.

Certain stéréotypes n'ont pu être amplifiés par PCR malgré différents essais avec différentes amorces : *S. dysenteriae* 2, sérotype provisoire BEDP 02-5104, et quelques *S. boydii* 12.

L'explication la plus probable est que le gène *fliC* ou une région du gène soit déletée pour ces sérotypes de *Shigella*.

- **Etude du polymorphisme des Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) dans le génome de *Shigella* :**

Le terme CRISPR désigne une famille de séquences génomiques répétées. Cette famille se caractérise par des séries de répétitions directes, courtes (de 21 à 37 paires de bases) et régulièrement espacées par des séquences, généralement uniques et non codantes, de 20 à 40 paires de bases (espaceurs ou spacers). Le polymorphisme de ces régions est souvent utilisé pour sous-typé certains pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, ..

Un locus CRISPR avait été mise en évidence chez *E. coli* par Jensen et al, en 2002 (Mol. Microbiol). Nous avons évalué sa présence dans les génomes publiés de *E. coli* et *Shigella*. Deux loci CRISPR (1 et 2) ont été mis en évidence. Depuis 2009, le CNR-ESS a amplifié et séquencé 125 souches représentatives des différents sérotypes de *Shigella* pour le locus 1 et 29 souches pour le locus 2. l'analyse des résultats obtenus sur le locus 1 de 125 souches a permis de définir 2 importants clusters présentant une identité parfaite dans la composition en espaceurs du locus 1 :

- cluster 1 : *S. boydii* 1-5, 6-8, 1, 14, 18-20 ; *S. dysenteriae* 3-6, 9, 11-13, 15 sérotypes provisoires 97-10607 ; *S. flexneri* 6.
- cluster 2 : *S. boydii* 12, sérotype provisoire E1621-54, *S. flexneri* 1-5.

- **Construction d'une base de données de « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) pour les différents sérotypes de *Shigella***

Le CNR-ESS est en train de compléter une base de données MLST de l'ensemble des populations de *Shigella* en suivant le protocole du «University College Cork» (<http://mlst.ucc.ie/>) utilisant 7 gènes de ménage : *adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase) et *recA* (ATP/GTP binding motif).

Le séquençage de souches de *Shigella* de différents sérotypes a débuté en 2009, et se poursuivra afin d'obtenir une base représentative de tous les profils MLST (séquentotype, ST) des *Shigella*. A l'heure actuelle, plus de 270 souches ont été typées.

### **6.1.3 *Salmonella* (CNR-ESS)**

#### **6.1.3.1 Contribution au développement de nouvelles méthodes de typage et sous-typage des *Salmonella***

Le CNR-ESS s'efforce de développer des outils moléculaires à haut débit, à moindre coût permettant d'analyser de façon simple et robuste les relations phylogénétiques entre les isolats tout en gardant un lien avec les méthodes de typages précédentes, comme le sérotypage, de façon à ne pas perdre les données accumulées depuis plus de 80 ans.



#### 6.1.3.1.1 La méthode MLST

Lors d'un travail en collaboration avec le Pr M. Achtman (University College Cork, Irlande) et S. Brisse (PF8, Institut Pasteur), nous avons étudié une collection de 4257 souches de *S. enterica* appartenant à 554 sérotypes par la technique de multilocus sequence typing (MLST). La contribution du CNR-ESS et du CCOMS était de 1900 souches pour 500 sérotypes. Cette méthode, facilement automatisable, repose sur la caractérisation par séquençage de sept gènes « de ménage » non soumis à une pression de sélection. Les résultats montraient une parfaite corrélation entre sérotypes et multilocus sequence types (ST). De plus pour la majorité des sérotypes (à l'exception de Typhimurium et Enteritidis les deux plus prévalents à l'échelle planétaire) le MLST était plus discriminant que le sérotype. Ce travail concluait que l'utilisation du MLST pouvait être une alternative au sérotypage, la méthode de référence pour le typage des salmonelles depuis plus de 80 ans. L'article publié en 2012 (Achtman et al. Plos Pathogens), pour lequel le CNR-ESS partage la première position, a déjà été visualisé plus de 11600 fois et cité 26 fois au 25 mars 2014). L'ensemble des données associées à chaque souche (origine, sérotype, ST, phage type, ..) est accessible à la communauté scientifique via un site web dédié : *Salmonella enterica* MLST Database (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

Le travail se poursuit dans le but de finaliser au cours des prochaines années les 2600 sérotypes de *Salmonella* déposés au CCOMS. Au 25 mars 2014, la base de donnée MLST du CNR-ESS dans le logiciel Bionumerics comprenait 2317 souches appartenant aux sous-espèces *enterica* (n=1765), *salamae* (n=227), *arizonae* (n=51), *diarizonae* (n=165), *houtenae* (n=63) et *indica* (n=15) de l'espèce *enterica* et à l'espèce *bongori* (n=31) couvrant 654 sérotypes. La *Salmonella enterica* MLST Database quant à elle comprenait 6285 souches définissant 1669 ST.

#### 6.1.3.1.2 Inventaire des séquences des gènes *fliC* et *fljB* codant pour les antigènes flagellaires H

Le sérotypage classique étant basé sur l'analyse antigénique des facteurs somatiques O et des facteurs flagellaires H, une analyse des séquences des gènes *fliC* et *fljB* codant pour les flagellines ou antigènes H permet de déterminer avec précision les antigènes H même en cas de souches non-sérotypables (rough, monophasiques ou immobiles) ou en cas de sérotypes rares entraînant des réactions croisées avec les sérums de typage. Nous continuons l'analyse extensive de la diversité de ces gènes de façon à développer un dictionnaire sérotype/séquences *fliC* et *fljB*/MLST. Au 25 mars 2014, 1041 souches ont été analysées simultanément par sérotypage, MLST et séquençage des gènes *fliC* et *fljB*.

#### 6.1.3.1.3 Etude du polymorphisme des régions CRISPR pour typer et sous-typer les *Salmonella* en une seule étape.

Le CNR-ESS a étudié une nouvelle approche pour le typage des salmonelles basée sur le polymorphisme d'une famille de séquences répétées d'ADN nommée CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Chez *Salmonella*, il existe deux régions, CRISPR1 et CRISPR2 séparées par 20 kb dont une partie contient la machinerie CAS (CRISPR-associated genes). Chaque région est caractérisée par la succession de séquences directes répétées d'ADN (DR ou direct repeats) d'une longueur moyenne de 29 pb et régulièrement intercalées par des séquences non codantes de 32 pb appelées spacers (27 en moyenne par souche). Dans un premier travail publié en 2012 (Fabre et al. Plos One, cité 30 fois et vu 5300 fois au 25 mars 2014), le contenu en spacers d'une collection globale de 750

souches représentatives de plus de 130 sérotypes dont les plus fréquemment impliqués en pathologie humaine, comme Typhimurium et Enteritidis, a été inventorié. Plus de 3800 spacers ont été mis en évidence par séquençage Sanger des deux régions (de 500 pb à 4 kb par région). Le contenu en spacers de chaque souche (de 1 à 124 par région) était parfaitement corrélé au sérotype et même à la structure génétique des populations obtenue par MLST. Quand plusieurs souches d'un même sérotype étaient étudiées, la composition en spacers pouvait varier (duplication, SNP, variant VNTR, perte et acquisition de spacers) entre les souches et cette variabilité au sein d'un même sérotype était concordante avec les méthodes traditionnelles de sous-typage (p. ex. bonne identification des souches du clone DT104 de Typhimurium ou des souches d'Enteritidis dites Danysz, toujours utilisées comme raticide dans certains pays). Ce travail a fait également l'objet d'une demande de dépôt de brevet (no. FR07/09188 Weill et al. "Typage et sous-typage moléculaire de *Salmonella* par identification des séquences nucléotidiques variables des loci CRISPR") avec extension internationale (no. PCT/IB200/8004004)

Le travail se poursuit et à l'heure actuelle plus de 1400 souches de plus de 200 sérotypes ont été étudiées et 7100 spacers différents décrits. Le but est de finaliser au cours des prochaines années les 2600 sérotypes de *Salmonella* déposés au CCOMS.

#### 6.1.3.1.4 Génomique épidémiologique

L'arrivée des technologies de séquençage haut-débit sur des appareils de paillasse (GS junior, MiSeq, IonPGM) et adaptées aux génomes bactériens est en train de révolutionner le monde de l'épidémiologie moléculaire et du typage bactérien.

Nous commençons à travailler sur l'utilisation du séquençage haut-débit comme méthode unique pour le typage des salmonelles. Des financements extérieurs ont permis le recrutement d'un doctorant biologiste et d'un post-doctorant bioinformaticien ainsi que la possibilité de séquencer 1000 génomes en 3 ans. Il s'agira de génomes de 300 Typhimurium, 100 Enteritidis et 600 souches de 200 autres sérotypes d'intérêt. Les essais se font sur un petit échantillon de souches par la méthode MiSeq (2x300 pb) d'Illumina après préparation des librairies avec le kit Nextera (Illumina) et multiplexage de 20 souches par flow cell à la plateforme Génomique de l'Institut Pasteur (Dr C. Bouchier). Plusieurs régions du génomes seront analysées à partir des séquences génomiques réassemblées : le polymorphisme de 7 (MLST) à plus de 200 gènes du core genome (cgMLST), la structure du locus *rfb* définissant l'antigène O et la séquence des gènes *fliC* et *fliB* codant pour les antigènes H, le polymorphisme des régions CRISPR, les gènes de résistance aux antibiotiques seront extraits, .... Ce travail bénéficiera de l'apport du dictionnaire sérotype/MLST/CRISPR décrit dans les paragraphes précédents. Une nouvelle nomenclature des souches de *Salmonella* sera à redéfinir mais celle-ci devra rester corrélée aux anciennes méthodes de typage tel le sérotypage.

Ce travail sera fait en synergie avec nos collègues de la Gastrointestinal Bacteria Reference Unit (Dr K. Grant) de Public Health England (Colindale).

#### 6.1.3.1.5 Etude du polymorphisme des régions CRISPR sur une collection mondiale de souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium

Le CNR-ESS a mis au point en 2012 (Fabre et al. Plos One) une méthode de caractérisation rapide des souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de son variant monophasique. Cette méthode nommée CRISPOL (pour CRISPr POLymorphisms) est basée sur la présence ou non des soixante-huit spacers de ce sérotype après détection par hybridation sur microsphères (technologie Luminex). Actuellement, notre base de données contient plus de 8700 souches typées par cette technique générant 799 CRISPOL types (CT) différents.

Son utilisation en temps réel devrait permettre d'augmenter significativement la sensibilité de la détection des épidémies liées à *S. enterica* sérotype Typhimurium, l'agent pathogène responsable de 50% des salmonelloses dans notre pays.

Elle a été utilisée en 2013 pour identifier rapidement un clone prévalent et associé à des formes invasives en République Démocratique du Congo (Ley et al. Emerg Infect Dis 2014). Ce clone habituellement reconnu par son type MLST (ST313) peut maintenant être facilement identifié par son type CRISPOL (CT28) en une journée et à un coût six fois moindre que le MLST.

Cette méthodologie a été également transférée à l'ANSES à Maisons-Alfort (Dr A. Brisabois) et à l'University College Cork (Pr M. Achtman) en Irlande. Une comparaison de la base de données du CNR-ESS avec environ 1000 souches animales ou alimentaires de l'Anses est en cours. Une autre étude concernant 7300 souches mondiales (humaines et non-humaines, historiques et contemporaines) est également en cours d'analyse.

#### 6.1.3.1.6 Etude de la coévolution entre les régions CRISPR et le core genome chez 300 souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de son variant monophasique

Ce travail en collaboration avec le Pr M. Achtman (University College Cork, Irlande puis University of Warwick, RU) qui fait suite à l'analyse de la collection mondiale par la technique CRISPOL a pour but de comparer l'évolution des 2 régions CRISPR (polymorphisme du contenu en spacers) à celle du génome (principalement SNPs informatifs sur le core genome). Pour cela une collection de 350 souches appartenant aux différents groupes CRISPOL a été sélectionnée et est actuellement en cours de séquençage Illumina (150 souches au CNR et 200 entre l'Université de Warwick et le Sanger Institute). Des résultats préliminaires sur 80 génomes montrent une excellente corrélation entre les deux approches indiquant que le polymorphisme des régions CRISPR serait un moyen fiable d'apprécier la distance génétique entre deux isolats.

#### 6.1.3.1.7 Génomique évolutive de différents sérotypes de Salmonella

\* Une étude de **génomique évolutive sur *S. enterica* sérotype Kentucky ST198**, la souche émergente et multirésistante aux antibiotiques décrite par les responsables du CNR (Weill et al. Emerg Infect Dis 2006, Le Hello et al. J Infect Dis 2011, Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013). Après avoir rassemblé une collection globale de cet agent pathogène (souches de 1937 à 2013, humaines, animales, environnementales, des différents continents), 50 génomes ont été séquencés grâce à des financements extérieurs. Vingt-six nouveaux génomes sont prévus en 2014. L'analyse bioinformatique est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Melbourne (Dr K. Holt, scientifique ayant effectué un séjour scientifique dans l'Unité BPE en 2012). Un post-doctorant en bioinformatique sera recruté par l'Unité BPE en 2014 en partie pour ce projet et ce dans le cadre du LabEX IBEID (Prs Sansonetti et Cossart).

\* Collaboration avec les Prs M. Achtman (University of Warwick,) et G. Dougan (Sanger Institute) à une étude de **génomique comparative de *S. enterica* sérotype Paratyphi A, l'agent de la fièvre paratyphoïde**. Cent-quarante neuf souches isolées depuis le début du 20ème siècle sur tous les continents, dont 91 provenaient de la collection du CNR-ESS, ont été séquencées par la méthode Illumina au Sanger Institute. Une analyse des 4,584 SNPs informatifs a mis en évidence plusieurs lignées génétiques chez cet agent pathogène génétiquement homogène qui a peu évolué depuis son apparition au 16ème siècle. Le travail a été soumis pour publication en 2014.

\* Collaboration avec les Prs G. Dougan et N. Thomson (Sanger Institute) à plusieurs autres études de **génomique comparative de *S. enterica* sérotypes Paratyphi B, Weltevreden, Enteritidis** (souches invasives africaines). Ces projets de grande ampleur coordonnés par le Sanger Institute comprennent de 100 à 2000 génomes et sont au stade de l'analyse des séquences. Le CNR-ESS a contribué aux différents projets par le choix des souches appropriées (de 50 à 350 par projet) en fonction des données épidémiologiques, des caractéristiques phénotypiques et génotypiques et des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

\* Collaboration avec le Dr R. Hendriksen (Technical University of Denmark) à une étude de **génomique évolutive de *S. enterica* sérotype Typhimurium DT104**. Le CNR-ESS a fourni 85 souches de cette bactérie dont des souches historiques de la fin des années 1960 identifiées dans la collection du CNR-ESS grâce à la technique CRISPOL.

#### 6.1.3.2. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Salmonella*

Le CNR *Salmonella* a mené en 2013 plusieurs travaux sur la caractérisation de souches résistantes aux antibiotiques :

\* Poursuite de la caractérisation systématique de toutes les souches de *S. enterica* résistantes aux C3G isolées en France et participation aux investigations nationales (Montevideo, Brandenburg, Blockley) et internationales (Harrois et al. Clin Microbiol Infect 2013). Une attention particulière sur les souches résistantes à l'azithromycine est portée par le CNR-ESS.

\* Poursuite d'un suivi international sur la diffusion de la souche de *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013 et Le Hello et al. Front Microbiol 2013). Parallèlement, les souches possédant le SGI1 et résistantes aux quinolones sont également en cours d'investigation microbiologique en collaboration avec l'équipe du Dr Cloeckaert (INRA de Nouzilly)

\* Caractérisation des souches de *S. enterica* résistantes aux carbapénèmes (OXA-48, VIM-2, NDM-1). L'analyse globale des plasmides portant ces gènes de carbapénémases sont actuellement en cours d'analyse au CNR-ESS.

## 6.2 Liste des publications et communications 2013 pour le CNR-ESS-LA

### 6.2.1 Publications nationales

1. Guillon F, Chasset P, **Le Hello S**, Granier SA. Epidemiological investigation of highly ciprofloxacin resistant *Salmonella* Kentucky detected for the first time in French avian production. **Bulletin épidémiologique** 2013, 201, 57.
2. **Gouali M, Weill FX**. Les *Escherichia coli* enterohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. **La Presse Médicale** 2013, 42(1):68-75.
3. **Gouali M, Weill FX**. Les *Escherichia coli* enterohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. **Revue francophone des laboratoires** 2013, 449(2):44-49.
4. **Mariani-Kurkdjian P**. *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines. Médecine Thérapeutique Pédiatrique. **Progrès en pédiatrie** 2013, 16, 4.

### 6.2.2 Publications internationales

1. Sangal V, Holt KE, Yuan J, Brown DJ, **Filliol-Toutain I, Weill FX**, Kim DW, da Silveira WD, Pickard D, Thomson NR, Parkhill J, Yu J. Global phylogeny of *Shigella sonnei* strains from limited single nucleotide polymorphisms (SNPs) and development of a rapid and cost-effective SNP-typing scheme for strain identification by high-resolution melting analysis. **Journal of Clinical Microbiology** 2013, 51(1):303-5.
2. **Gouali M, Ruckly C, Carle I, Lejay-Collin M, Weill FX**. Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 Chromogenic Agar Media for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology** 2013, 51(3):894-900.
3. Grad YH, Godfrey P, Cerquiera GC, **Mariani-Kurkdjian P, Gouali M, Bingen E**, Shea TP, Haas BJ, Griggs A, Young S, Zeng Q, Lipsitch M, Waldor MK, **Weill FX**, Wortman JR, Hanage WP. Comparative Genomics of Recent Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4: Short-Term Evolution of an Emerging Pathogen. **Mbio** 2013, 4(1):e00452-12.
4. Lindstedt B, Torpdahl M, Vergnaud G, **Le Hello S, Weill FX**, Tietze E, Malorny B, Prendergast D, Ni Ghalloir E, Lista R, Schouls L, Soderlund R, Borjesson S, Akerstrom S. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. **Euro Surveillance** 2013, 18(4):20385.
5. David JM, Sanders P, Bemrah N, Granier S, Denis M, **Weill FX**, Guillemot D, Watier L. Attribution of the French human Salmonellosis cases to the main food-sources according to the type of surveillance data. **Preventive Veterinary Medicine** 2013, doi:pii: S0167-5877(13)00033-0.
6. **Le Hello S, Harrois D**, Bouchrif B, **Sontag L, Elhani D, Guibert V**, Zerouali K, **Weill FX**. Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases** 2013, 13(8):672-9.

7. Rahman MZ, Akter S, Azmuda N, Sultana M, **Weill FX**, Khan SI, **Grimont PA**, Birkeland NK. Serological Cross-Reaction Between O-Antigens of *Shigella dysenteriae* Type 4 and an Environmental *Escherichia albertii* Isolate. **Current Microbiology** **2013**, 67(5):590-5.
8. Baucheron S, **Le Hello S**, Doublet B, Giraud E, **Weill FX**, Cloeckeaert A. ramR mutations affecting fluoroquinolone susceptibility in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198. **Frontiers in Microbiology** **2013**, 31;4:213.
9. Sire JM, Garin B, Chartier L, Fall NK, Tall A, Seck A, **Weill FX**, Breurec S, Vray M. Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal. **Paediatrics and International Child Health** **2013**, 33 (3):139-44.
10. Kerouanton A, Rose V, **Weill FX**, Granier SA, Denis M. Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella enterica* Serotype Derby Isolated from Pigs, Pork, and Humans in France. **Foodborne Pathogens and Disease** **2013**, 10(11):977-84.
11. **Harrois D**, Breurec S, Seck A, **Delauné A**, **Le Hello S**, **Pardos de la Gándara M**, **Sontag L**, Perrier-Gros-Claude JD, Sire JM, Garin B, **Weill FX**. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical *Salmonella enterica* isolates in Dakar, Senegal, from 1999 to 2009. **Clinical Microbiology and Infection** **2013**. [Epub ahead of print] 2013-Aug 20.
12. Tourdjman M, **Le Hello S**, Gossner C, Delmas G, Tubiana S, **Fabre L**, Kerleguer A, Tarantola A, Fruth A, Friesema I, Thorstensen Brandal L, Lawrence J, Fisher I, Dufour M, **Weill FX**, de Valk H. Unusual increase in reported cases of paratyphoid A fever among travellers returning from Cambodia, January to September 2013. **Euro Surveillance** **2013**, 18(39).
13. Compain F, Poisson A, **Le Hello S**, Branger C, **Weill FX**, Arlet G, Decré D. Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in Enterobacteriaceae. **International Journal of Medical Microbiology** **2013**, pii: S1438-4221(13)00147-1.
14. **Le Hello S**, Bekhit A, Granier SA, Barua H, Beutlich J, Zajac M, Münch S, Sintchenko V, Bouchrif B, Fashae K, Pinsard JL, **Sontag L**, **Fabre L**, **Garnier M**, **Guibert V**, Howard P, Hendriksen RS, Christensen JP, Biswas PK, Cloeckeaert A, Rabsch W, Wasyl D, Doublet B, **Weill FX**. The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. **Frontiers in Microbiology** **2013**, 4:395.
15. Zajac M, Wasyl D, Hoszowski A, **Le Hello S**, Szulowski K. Genetic lineages of *Salmonella enterica* serovar Kentucky spreading in pet reptiles. **Veterinary Microbiology** **2013**, 166(3-4):686-9.
16. Larsson JT, Torpdahl M, **MLVA working group**, Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. **Euro Surveillance** **2013**, 29;18(35):20566.

17. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P, **MLVA Harmonization Working Group**. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. **Euro Surveillance** 2013, 29;18(35):20565.
18. Rosin P, Niskanen T, Palm D, Struelens M, Takkinen J, **Shiga toxin-producing Escherichia coli Experts of European Union Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Network**. Laboratory preparedness for detection and monitoring of Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O104:H4 in Europe and response to the 2011 outbreak. **Euro Surveillance** 2013, 20;18(25).
19. Lemaître C, Mahjoub-Messai F, Dupont D, Caro V, Diancourt L, **Bingen E**, Bidet P, **Bonacorsi S**. A conserved virulence plasmidic region contributes to the virulence of the multiresistant *Escherichia coli* meningitis strain S286 belonging to phylogenetic group C. **PLoS One** 2013, 8(9):e74423.
20. **Bingen E**, Bidet P, D'humieres C, Sobral E, **Mariani-Kurkdjian P**, Cohen R. In vitro interaction between cefepime and amoxicillin-clavulanate against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2013, 57(5):2437-9.
21. Birgy A, **Mariani-Kurkdjian P**, Bidet P, Doit C, Genel N, Courroux C, Arlet G, **Bingen E**. Characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains involved in maternal-fetal colonization: prevalence of *E. coli* ST131. **Journal of Clinical Microbiology** 2013, 51(6):1727-32.
22. Barret AS, Charron M, **Mariani-Kurkdjian P**, **Gouali M**, Loukiadis E, Poignet-Leroux B, Godron A, Gault G, Faure M, Mailles A, group of investigators. Shopper cards data and storage practices for the investigation of an outbreak of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 infections. **Médecine et Maladies Infectieuses** 2013, 43(9):368-73.
23. Madhi F, Biscardi S, **Bingen E**, Jaby O, Epau R, Cohen R. Combined relay therapy with oral cefixime and clavulanate for febrile urinary tract infection caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. **The Pediatric Infectious Disease Journal** 2013, 32(1):96-7.
24. Miko A, Delannoy S, Fach P, Strockbine NA, Lindstedt BA, **Mariani-Kurkdjian P**, Reetz J, Beutin L. Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strains from different origins and sources. **International Journal of Medical Microbiology** 2013. 303(8):410-21.
25. Clermont O, Glodt J, Burdet C, Pognard D, Lefort A, Branger C, Denamur E; **COLIBAFI Group Members**. Complexity of *Escherichia coli* bacteremia pathophysiology evidenced by comparison of isolates from blood and portal of entry within single patients. **International Journal of Medical Microbiology** 2013, 303(8):529-32.
26. Loirat C, **Mariani-Kurkdjian P**, Fremeaux-Bacchi V. Hemolytic uremic syndrome as of 2013. **Archives de Pédiatrie** 2013, 20(8):827-30.

### 6.2.3 Communications internationales

- S. Le Hello. "Epidemiological and genetic features associated with the international spread of multi-drug resistant *Salmonella* Kentucky ST198 », communication orale au symposium international of *Salmonella* and Salmonellosis (I3S), 26 au 29 mai 2013, St Malo.
- S. Le Hello. "One-year surveillance of human and non-human *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its monophasic variant based on CRISPOL subtyping, France, 2011", communication orale au symposium international of *Salmonella* and Salmonellosis (I3S), 26 au 29 mai 2013, St Malo.

### 6.2.4 Conférences sur invitation

- F.-X Weill. Conférence « *Escherichia coli*: le concombre n'était pas coupable ! » Journées de Biologie Clinique Necker Pasteur, 29 janvier 2013, Paris.
- S. Le Hello. Conférence « The Odyssey of multi-drug resistant *Salmonella* Kentucky ST198 strain » au 7<sup>ème</sup> EURL-AR Workshop, 4 et 5 avril 2013, Copenhague, Danemark.
- F.-X Weill. Conférence « *E. coli* enter-hémorragiques: des bactéries à la une des medias » Académie Nationale de Médecine, 23 avril 2013, Paris.
- F.-X Weill. Conférence « Which molecular typing methods for *Salmonella* in the near future ? » Statens Serum Institut, 14 mai 2013, Copenhague, Danemark.
- F.-X Weill. Conférence « Antibiotic resistance in *Salmonella*. Where are we ? and where are we going ? » CHU d'Odense, 15 mai 2013, Odense, Danemark.
- F.-X Weill. Conférence « Which molecular typing methods for *Salmonella* in the near future ? » International conference Molecular epidemiology of infectious diseases, 5-7 juin 2013, St. Petersburg, Russie.
- F.-X Weill. Intervention « *Salmonella* Kentucky ST198-X1 une super bug émergente des pays émergents » Colloque Maladies et risques infectieux (ré)-émergents, 22 octobre 2013, Direction Générale de la Santé, Paris.
- F.-X Weill. Conférence « CRISPR markers for *Salmonella* epidemiology » et présidence de session, International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10), 2-5 octobre 2013, Paris.
- F.-X Weill. Conférence « Épidémie européenne d'infection à *E. coli* O104 » 3<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 22 novembre 2013, Paris.
- F.-X Weill. Intervention « Les défis de l'accréditation », 6<sup>e</sup> séminaire des CNR, 28 novembre 2013, Paris.
- P. Mariani – Kurkdjian. Invitation de la Société Française de Pédiatrie : Congrès de la SFP Clermont Ferrand Mai 2013 – Table ronde : Le Syndrome hémolytique et urémique après l'épidémie allemande –Microbiologie.
- P. Mariani – Kurkdjian. Invitation de la Société Française de Microbiologie : Congrès de la SFM « De l'EPEC au triple hybride ». Février 2013.



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

### **7.1 *Salmonella***

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

Le CNR-ESS est parfois sollicité pour avis d'experts sur certaines saisines ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2033/99/CE.

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

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

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

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

A cet effet, dans le cadre d'une convention de recherche et développement de l'ANSES, VETAGRO-SUP, une étude a été initiée en 2013 portant sur **l'étude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées chez l'homme, l'animal et dans les aliments en France.**

L'objectif général de ce projet vise à établir un bilan national (analyse de tendance et comparaison) des caractéristiques génétiques (types et profils de virulence) et phénotypiques (antibiorésistance) des souches STEC isolées chez l'homme, dans les aliments (produits considérés comme « à risque » c'est-à-dire produits carnés laitiers essentiellement et végétaux), mais également dans le réservoir animal et son environnement. Ce bilan permettra ainsi :

- d'obtenir une analyse comparée des profils des souches animales (au sens large) et humaines et de vérifier l'existence ou non de relations clonales et de flux de gènes de virulence ou d'antibiorésistance entre ces populations ;
- d'établir une surveillance des flux de gènes entre les populations de STEC présentes le réservoir animal (i.e. isolés chez les animaux, dans les denrées alimentaires ou dans l'environnement) et celles isolées chez les patients en France
- d'obtenir par conséquent des données quant à l'émergence de nouveaux clones pathogènes pour l'homme.
- de proposer des données nécessaires à l'amélioration des systèmes de surveillance des souches STEC en France.

Ce bilan permettra ainsi une meilleure évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de souches EHEC dans les aliments en France.

Par ailleurs, le CNR-ESS répond à des demandes du LNR-STECC (VETAGRO-SUP) pour des analyses de sérotypage moléculaire de souches EHEC d'origine alimentaire ou animale. C'est ainsi qu'il a réalisé en 2013, le sérotypage d'une vingtaine de souches dans le cadre de la note de la DGAL SDSSA/2012-8279 concernant la mise en place d'un plan de surveillance de la contamination par STEC des minerais de bœuf et des viandes hachées de bœuf, au stade de la production.

## 8/ Programme d'activités 2013-2015

### 8.1 Apporter une expertise microbiologique

#### 8.1.1 Infections à *E. coli*

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

- **Diagnostic des infections à *E. coli* entéro-hémorragiques**

Dans le cadre du diagnostic des infections à EHEC, le CNR-ESS-LA :

Réaliser une identification biochimique du genre *Escherichia* et dans le cas de souches difficilement identifiables biochimiquement, la PCR du gène *uid* et/ou le séquençage du gène *rpoB* permettant de confirmer l'identité de la souche en déterminant le genre ou l'espèce grâce à sa banque de données pour toutes les entérobactéries.

Puis le CNR-ESS-LA effectuera de façon systématique :

- l'agglutination des souches d'origine intestinale avec les antisérums : O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164,
- la recherche par PCR des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA* et *AggR* sur souches bactériennes d'origine intestinale et dans les selles d'adultes,
- le sous typage des gènes *stx1* et *stx2*
- la recherche d'anticorps anti-LPS (IgA et IgM) des principaux sérotypes de EHEC O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157 et O104) dans le sérum par la méthode de line-blot.

Les gènes de virulence des autres pathovars de *E. coli* seront recherchés après entente préalable et en connaissance du contexte clinique ou épidémiologique.

Le CNR-ESS réalisera un sérotypage moléculaire par la méthode *rfb*-RFLP et le séquençage du gène de flagelline *fliC* dans le cas de souches non-sérotypables.

Toujours, dans un but diagnostique, le LA-RD réalisera :

- la recherche par PCR des gènes de virulence dans les selles par PCR en temps réel et sur les souches isolées de selles,
  - la recherche des variants des gènes de virulence,
  - le sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145.
- La PCR peut-être réajustée en fonction des données épidémiologiques. Ainsi, devant l'augmentation de sa prévalence en 2013, le sérotype *E. coli* O80 va être ajouté à la liste des sérotypes testés.

- **Validation des tests d'immunodétection des Shiga-toxines commercialisés sur le marché.**

Du fait de l'hétérogénéité génétique des STEC, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode simple et standardisée pour leur identification dans les LBM. De plus les méthodes de référence font appel à de la PCR, technologie absente de la plupart des LBM. Un dépistage des infections à EHEC par la recherche des Shiga-toxines dans les selles pourrait être une alternative car plusieurs kits sont commercialisés.

Le CNR-ESS va poursuivre son étude de validation du test ImmunoCard STAT EHEC commercialisé par Meridian commencée en 2013 en testant un nombre d'échantillons de selles plus important et en essayant d'améliorer les conditions de conservation des EHEC dans les prélèvements de selles positifs de façon à constituer une coprothèque pour d'autres validations de kits.

- **Elaboration, mise à disposition, diffusion de guides techniques relatifs au diagnostic de ces infections destinés aux laboratoires de biologie médicale**

Le CNR-ESS-LA poursuit le travail d'information des laboratoires et de formation de stagiaires déjà entrepris. Deux articles sur le diagnostic des EHEC sont parus en 2013 dans la Presse Médicale et dans les Feuilles de Biologie.

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

- **Développement et mise en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches. Distinction des souches responsables de cas groupés de celles responsables de cas sporadiques et affiliation des souches aux différents clones**

- Génotypage des *E. coli* responsables de méningite néonatale (ECMN)

Les souches seront caractérisées par leur appartenance à un groupe phylogénétique, par leur empreinte de virulence et par leur antigène somatique.

- Le groupe phylogénétique sera déterminé par une PCR multiplex permettant de distinguer les 4 principaux groupes (A, B1, B2, D).

- Les empreintes de virulence comporteront la recherche par PCR des 10 gènes de virulence suivants :

- Adhésines : pfimbriae (*papC*, *papGII*, *papGIII*), Sfimbriae (*sfa/foc*)
- Toxines : hémolysines (*hlyC*), cytotoxique necrotising factor (*cnf1*)
- Systèmes de captation du fer : yersiniabactine (*fyuA*), aérobactine (*iucC*), salmocheline (*iroN*)
- Invasines : invasine brain endothelial cell (*ibeA*)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **8.1.2 Infections à *Shigella***

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

La validation de l'utilisation du séquençage haut-débit dans le cadre d'investigations d'épidémies se fera progressivement.

- **Identifier et typer les souches**

Nous allons poursuivre l'identification et le typage (par la méthode la plus adaptée) de toutes les souches adressées au CNR-ESS que ce soit dans le cadre de la surveillance ou dans le

cadre d'investigations. Notre capacité annuelle est de 10-15000 souches pour le sérotypage, 2000-3000 pour l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques, 1000 souches par an pour le MLVA et 500 souches pour le PFGE. Toutes les souches seront conservées indéfiniment en tube gélosé dans une pièce climatisée dédiée à la collection. Les souches précieuses ou fragiles c'est-à-dire les souches de *S. dysenteriae* de type 1, les souches ayant fait l'objet d'un séquençage complet, d'une analyse MLST ou CRISPR, les souches de référence des nouveaux sérotypes ou des nouveaux CRISPOL types possédant des résistances particulières aux antibiotiques seront conservées à -80°C dans l'unité BPE. La mise à disposition des souches se fera après accord des responsables du CNR dans le cadre d'un MTA (Material Transfer Agreement).

### **8.1.3 Infections à *Salmonella***

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

Le CNR-ESS va poursuivre les différents travaux entrepris dans le développement de nouvelles méthodes de typage et de sous-typage. La méthode CRISPR appliquée déjà à 1215 souches appartenant à 210 sérotypes va être appliquée à d'autres sérotypes. L'application directe par la méthode à haut débit basée sur la technologie xMAP de Luminex est mise en place en routine pour le sérotype Typhimurium et variant monophasique au CNR-ESS ainsi qu'à l'ANSES-LERQAP. L'utilisation du séquençage à haut-débit (technologie MiSeq) va être initiée. Les bases de données concernant les séquences des gènes des flagellines et les séquençotypes (MLST) vont être progressivement complétées.

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

Le réseau du CNR-ESS comprenait environ 35% des LBM de France métropolitaine en 2009. Plusieurs études réalisées au cours de ces dernières années ont montré sa stabilité. En 2008, l'arrêt de l'activité de sérotypage par le laboratoire Biomnis et la plupart des laboratoires regroupés et son transfert au CNR-ESS a permis d'obtenir une couverture géographique optimale, avec une couverture de plus 90% des LBM participants en 2013.

En décembre 2009, le CNR-ESS a changé de système d'exploitation des données de laboratoire passant du logiciel BactériCentre (1992, Patrick Grimont) vers Lagon (Epiconcept). Les bases de données BactériCentre 1992-2009 ont été transférées dans une base plus adaptée pour l'utilisation des algorithmes de détection des dépassements de seuil. Un nouveau logiciel est en cours de développement (site web « Voozanoo ») pour la déclaration en ligne des souches sérotypées localement (cela remplacera les fiches information). L'algorithme de détection des épidémies a été réécrit afin d'ajouter dans la surveillance les nouveaux sérotypes ou variants de *Salmonella*, l'analyse spécifique pour la classe d'âge < 1 an. Il est étendu aux données de sous-typage pour le sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques (CRISPOL type).

En 2012, une étude d'évaluation des délais de notification du système de surveillance des salmonelloses humaines, France 2007-2011 a été menée (Jones et al. Euro Surveill 2014). Le CNR *Salmonella* se basera sur les éléments émis de cette étude pour raccourcir les délais de transport vers le CNR et le délai de sérotypage du CNR.

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

Nous allons poursuivre l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide de méthodes standardisées (antibiogrammes suivant le CA-SFM et l'EUCAST et si nécessaire CMI par la technique des E-tests) pour une collection d'environ 2000 souches de *Salmonella* sélectionnées selon le sérotype, le suivi de certains clones multi-résistants, selon l'origine de l'acquisition (métropolitaine ou extra-métropolitaine) et selon les besoins d'investigations.

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

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

Le CNR-ESS continuera à utiliser en routine hebdomadaire le programme de détection basé sur les trois algorithmes et développé par l'InVS. Un algorithme similaire basé sur les CRISPOL-types est en cours de développement.

## 8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS)

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

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

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

Le CNR-ESS-LA va poursuivre sa participation à l'investigation des cas groupés en collaboration avec l'InVS.

Les souches EHEC d'origine humaine ou non seront étudiées de la façon suivante par :

\* **Rep-PCR (Diversilab)** par le LA-RD qui effectue cette méthode de façon courante dans le cadre d'investigations d'infections nosocomiales et à la demande de services extérieurs dans le cadre d'investigations d'épidémies.

### \* **Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)**

Le CNR-ESS et le LA-RD réalise la méthode PFGE standardisée (protocole PulseNet) avec l'enzyme *XbaI* (ou un second si nécessaire) dans un délai d'une semaine. Chaque série de 18 souches nécessitant 3-4 jours de manipulation. Les profils seront intégrés à la base de données BioNumériques du CNR. Les images TIFF ou les fichiers XML pourront être échangés avec d'autres laboratoires nationaux ou internationaux.

Le LA-RD réalise également le PFGE dans le cadre d'investigations d'infections nosocomiales et a utilisé cette méthode pour étudier la diversité génétique des souches françaises de *E. coli* O157:H7 (Bidet et al. J Med Microbiol 2005). Le LA-RD va poursuivre son activité de typage par PFGE dans le cadre du plan quinquennal comme cela a été réalisé précédemment. Le laboratoire associé a acquis une expérience en matière de comparaison des souches (Bonacorsi et al. Int J Med Microbiol 2009) et à ce titre, a obtenu, l'appel d'offre pour l'innovation technologique (STIC) de l'APHP en 2009 et est coordonnateur du projet : « évaluation médico-économique d'une méthode semi-automatique rapide de typage moléculaire bactérien dans le but de distinguer les cas épidémiques des cas sporadiques ».

Le LA-RD poursuivra une évaluation comparative de deux méthodes d'analyse globale du génome des souches EHEC : l'analyse par PFGE et la Rep-PCR.



### **\* Sérotypage moléculaire**

Le CNR-ESS réalisera le sérotypage moléculaire des *E. coli* non sérotypables par la méthode *rfb*-RFLP et le séquençage du gène de flagelline *fliC*. Si nécessaire une analyse MLST pourra être réalisée.

Le LA-RD réalisera le sérotypage par PCR multiplex, permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O104.

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

Le CNR-ESS-LA va poursuivre son expertise microbiologique lors d'investigations d'épidémies en collaboration avec l'InVS (pour le choix des souches épidémiques ou non épidémiques), l'ENV-Lyon (LNR) et l'ANSES- LERQAP Maisons-Alfort (pour analyser en parallèle les souches représentatives d'origine alimentaire). Il mettra en œuvre, le plus rapidement possible, la méthode la plus appropriée en fonction du sérotype en cause (MLST, MLVA, PFGE, CRISPR, autres techniques...) et utilisera pour valider la ou les méthodes, des souches épidémiques et non-épidémiques de sa collection de façon à déterminer si les souches étudiées sont reliées génétiquement.

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

Le réseau du CNR date des années 1950, c'est un réseau stable (environ 1400-1500 laboratoires participants), il possède une bonne couverture géographique et est relativement exhaustif. La dernière enquête CNR-AFSSAPS dans le cadre du contrôle national de qualité a montré que le CNR avait connaissance de 54% des isollements de *Shigella* et 66% des *Salmonella*. La mise en place du site web-Voozoo sera prochainement opérationnel et permettra de remplacer les fiches d'informations et raccourcira ainsi les délais d'information du CNR concernant l'isolement des souches de *Shigella* et *Salmonella*.

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

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

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

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

Le CNR-ESS-LA participe depuis plusieurs années au réseau européen de surveillance Enter-Net devenu ECDC-FWD qui est chargé de la surveillance internationale des infections gastro-intestinales humaines (*E. coli* entérohémorragiques, salmonelles, shigelles...). Le CNR-ESS-LA participe chaque année à des contrôles qualité externes internationaux sur le « sérotypage, détection de gènes de virulence et PFGE de souches STEC ou *E. coli* et salmonelles » organisés par ce réseau. Il participe également aux contrôles qualités qui concernent les méthodes de sous-typage (MLVA et PFGE pour les salmonelles). Par ailleurs, le CNR-ESS-LA transmet ses données trimestriellement via l'InVS à ce réseau européen et répond aux demandes d'informations qui lui sont adressées par l'ECDC-FWD ou par d'autres réseaux comme l'EFSA.

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

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

Dans le cadre des infections à *E. coli* extra-intestinaux, la surveillance épidémiologique se fera grâce au réseau national de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques...).

Le Pr E. Bingen était coordinateur de l'Observatoire national des méningites bactériennes de l'enfant. Cet observatoire a été créé à l'initiative du Groupe de Pathologie Infectieuse pédiatrique (GPIP) de la Société Française de Pédiatrie (SFP) et de l'association clinique et thérapeutique infantile du Val de Marne (ACTIV). Cet observatoire comprend un réseau de 259 services de pédiatrie et 168 services de bactériologie répartis dans toute la France.

Grâce à ce réseau, le recueil exhaustif des données cliniques auprès de chaque service de pédiatrie permettra de mieux caractériser la méningite à *E. coli*, notamment sur les antécédents familiaux, le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et des suites de couches, l'examen clinique à la naissance et le terme de l'enfant, les antécédents personnels, le tableau clinique au moment de la prise en charge de la méningite, l'évolution avec en particulier, l'apparition de complications et localisations parenchymateuses. Le bilan infectieux réalisé sera détaillé ainsi que l'antibiogramme de chaque souche. Enfin, la prise en charge thérapeutique sera étudiée en particulier avec le type, la dose et la durée des antibiotiques.

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

- **En contribuant à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, cas groupés, formes cliniques ou souches inhabituelles...**

Grâce au réseau de l'Observatoire national des méningites, le LA-RD signalera à l'InVS, toute augmentation significative de cas liés à un clone ainsi que la survenue de formes cliniques particulières ou de souches inhabituelles.

### **8.3 Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel**

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

# **Annexes**

## ANNEXE 1

### Annexe 1. Missions et organisation du CNR

#### 1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

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

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

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

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

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

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

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

- suivre les tendances évolutives temporelles des différentes espèces de *Shigella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyses de biologie médicale sur tout le territoire.
- suivre l'évolution de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques et des mécanismes de résistance en liaison avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.
- contribuer à la détection et l'investigation des cas groupés en lien avec l'InVS.
- contribuer à des études de recherche appliquée.
- participer, en lien avec l'InVS, aux réseaux de surveillance et d'alerte internationaux et en particulier européens.
- contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance, apparition de souches inhabituelles, etc...

Toutes ces missions sont possibles avec la collaboration de nombreux hôpitaux et laboratoires répartis dans toute la France et à une collaboration étroite avec l'InVS.

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

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

## 1.2 Les équipes

### 1.2.1 Le CNR-ESS : Effectif / Qualification du Personnel

#### - Effectif par catégories de fonctions

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

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

| Noms et Prénoms            | Poste                                                         | %<br>Activité | Taux<br>d'affectation<br>% | ETP  |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------|------|
| François-Xavier WEILL      | Cadre confirmé B                                              | 100           | 60                         | 0,60 |
| Malika GOUALI              | Cadre confirmé A                                              | 100           | 90                         | 0,90 |
| Simon LE HELLO             | Cadre confirmé A                                              | 100           | 90                         | 0,90 |
| Isabelle CARLE             | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 1,00 |
| Monique LEJAY-COLLIN       | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 0,93 |
| Corinne RUCKLY             | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 1,00 |
| Lucile LE CHEVALIER SONTAG | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 1,00 |
| Chrystelle ROUX            | Technicienne de laboratoire                                   | 100           | 50                         | 0,50 |
| Véronique GUIBERT          | Technicienne de laboratoire qualifiée                         | 100           | 100                        | 1,00 |
| Marie ACCOU-DEMARTIN       | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 0,80 |
| Laëtitia FABRE             | Technicienne supérieure de laboratoire 1 <sup>er</sup> degré  | 100           | 100                        | 1,00 |
| Martine GARNIER            | Technicienne supérieure de laboratoire 2 <sup>ème</sup> degré | 100           | 100                        | 1,00 |
| <b>TOTAL : 10,63</b>       |                                                               |               |                            |      |
| Laurence HAY               | Secrétaire 1 <sup>er</sup> degré                              | 100           | 100                        | 0,67 |
| Sylviane ETIEMBLE          | Aide de laboratoire                                           | 100           | 100                        | 0,33 |
| Annie PRETESAC             | Responsable de préparation                                    | 100           | 20                         | 0,20 |
| Patrick DENIS              | Agent de laboratoire                                          | 100           | 20                         | 0,20 |
| Fatimata TRAORE            | Aide de laboratoire                                           | 100           | 10                         | 0,10 |
| Françoise GUINANDIE        | Aide de laboratoire                                           | 100           | 20                         | 0,20 |
|                            |                                                               |               |                            | 1,60 |

### *Les responsables scientifiques*

#### **François-Xavier Weill**

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

#### **Simon Le Hello**

Docteur en pharmacie, DES de Biologie Médicale, DEA, ancien Interne de l'AP-HP.

#### **Malika Gouali**

Docteur en pharmacie, DEMS de Microbiologie, DESS en sécurité sanitaire des aliments.

### *Le personnel technique*

#### **\* Techniciens effectuant les analyses :**

- **Lucile Lechevalier-Sontag**, technicienne supérieure de laboratoire, licence en qualité. Expérience : 5 ans au CNR-ESS.
- **Laëtitia Fabre**, technicienne supérieure de laboratoire, Bachelor in Science (Kingston, RU), Master 2 de Microbiologie. Expérience : 12 ans au CNR-ESS.
- **Marie Accou-Demartin**, technicienne supérieure de laboratoire, Licence en Qualité (IP de Lille). Expérience : 12 ans au CNR-ESS.
- **Véronique Guibert**, technicienne de laboratoire qualifiée. Expérience : 18 ans au CNR-ESS.
- **Martine Garnier**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 10 ans au CNR des Borrelia. Expérience : 2 ans au CNR-ESS.
- **Corinne Ruckly**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 8 ans au CNR des méningocoques, 12 ans au CNR-ESS.
- **Monique Lejay-Collin**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 27 ans au CNR-ESS.
- **Isabelle Carle**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 26 ans au CNR-ESS.

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

- **Sylvie Issenhuth-Jeanjean**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 13 ans au CNR-ESS et au CCOMS.

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

- **Chrystelle Roux**, technicienne de laboratoire. Expérience : 29 ans.

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

- **Brigitte Chavinier-Jové**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 9 ans au CNR-ESS.



### *Le personnel administratif*

- **Laurence Hay**, secrétaire du CNR-ESS, enregistrement des dossiers et archivage. Expérience : 2 ans (départ du CNR le 30 août 2013).
- **Sylviane Etienne**, employée administrative du CNR-ESS, enregistrement des dossiers et archivage (depuis le 1<sup>er</sup> octobre 2013).
- **Marie Lemesle**, BTS Assistante Secrétaire Trilingue, secrétaire de l'unité BPE. Expérience : 1 an au CNR-ESS.

### **1.2.2 Le laboratoire associé (LA-RD) : Effectif / Qualification du Personnel**

#### **- Effectif par catégories de fonctions**

| Nom - Prénom                   | Libellé Emploi | ETP |
|--------------------------------|----------------|-----|
| M. BONACORSI Stéphane          | PU-PH          | 0,2 |
| Mme MARIANI-KURKDJIAN Patricia | PH             | 0,4 |
| Melle LIGUORI Sandrine         | ARC            | 1   |

### **1.3 Les locaux et équipements**

#### **1.3.1 CNR-ESS (Institut Pasteur)**

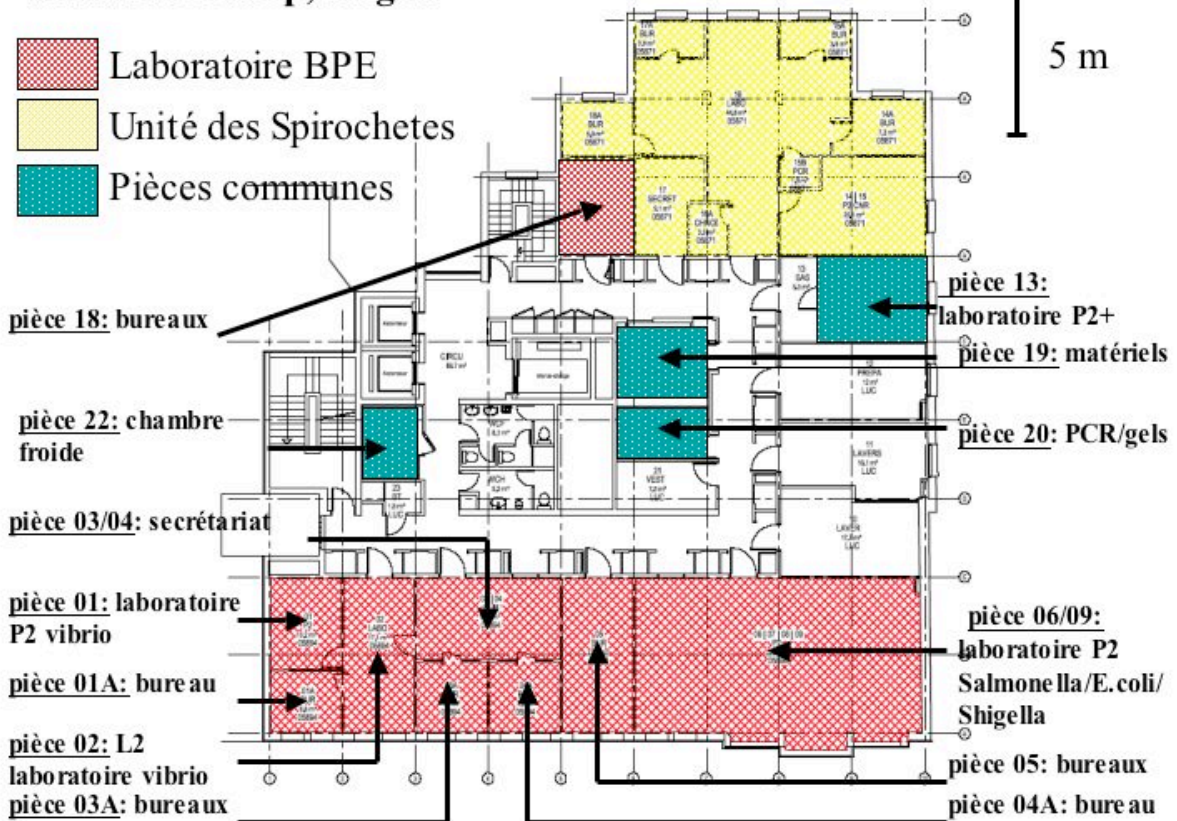
Le CNR-ESS, le CNR des Vibrions et du choléra, le CCOMS des *Salmonella* font partie de l'Unité d'Expertise et de Recherche des Bactéries Pathogènes Entériques dont les locaux se situent au 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biotop.

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

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

Pour réduire les coûts, le circuit des souches est commun pour tous les CNR de l'unité BPE (ouverture des paquets en P2+, enregistrement des informations épidémiologiques au secrétariat, local commun pour conserver les souches, pièce pour matériels et chambre froide communes).

### bâtiment Biotop, étage 3



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

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

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

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

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

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

Ces laboratoires ont été équipées par les deux unités.

Ces laboratoires seront fonctionnels au cours du deuxième trimestre 2014 et ne seront accessibles qu'au personnel des deux unités.

**Matériel, équipement du CNR-ESS :**

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

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

**Moyens extérieurs à la structure :**

- Collaboration importante avec la Plateforme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique de l'Institut Pasteur (PF8) jusqu'à sa fermeture en juillet 2013 pour les différents projets de recherche impliquant du séquençage à haut débit (Illumina), séquençages des amplicons (MLST, PCR de caractérisation des gènes de résistances aux antibiotiques), électrophorèse capillaire, gene Mapper (MLVA), Luminex (CRISPOL).
- Structures transversales notamment (CIBU, Plate-forme génomique Puces à ADN, séquences, Coordination épidémiologique), mais aussi les structures disponibles sur le campus (animaleries, etc....) et nécessaires aux missions du CNR.
- Réseau informatique de l'Institut Pasteur et le Centre d'Information pour la Biologie.
- L'assistance d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé en routine au CNR depuis novembre 2009 pour enregistrer les analyses et éditer les résultats.

### **1.3.2 LA-RD**

Le Laboratoire Associé est situé dans le Service de Microbiologie de l'Hôpital Robert Debré. Il comprend :

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

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

Matériel appartenant au laboratoire :

- Poste de sécurité microbiologique de type II
- Étuve
- Microscope
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur à -20°C

En commun :

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

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

- Accès à la structure universitaire EA 3105
- Utilisation d'un prestataire de service (Génome Express) pour le séquençage d'ADN

## **1.4 Démarche qualité**

### Le CNR-ESS

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 relative aux activités de biologie médicale.

Pour des raisons de coûts mais également d'harmonisation du système de management de la qualité, la démarche d'accréditation des différents CNR est considérée comme une accréditation multi-sites. L'ensemble des CNR faisant partie de ce que l'on a appelé : Le laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Sites (LREMS)

L'accréditation des activités analytiques au sein des différents CNR se fera en trois vagues en tenant compte de l'état d'avancement de leur système de management de la qualité.

C'est ainsi qu'en 2014, des activités analytiques ont été accrédités au sein des CNR des Leptospires, de la Coqueluche et autres bordetelloses, Corynebactéries, Virus Influenzae et la Rage. Le LREMS est accrédité par le COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 pour une partie de ses activités analytiques depuis le 21 mars 2014.

Le CNR-ESS fait partie de la 3<sup>ème</sup> vague des CNR et sera audité par le COFRAC en novembre-décembre 2015.

### Le LA-RD

Le Laboratoire Associé s'est également engagé dans une démarche Qualité pour ses activités spécifiques qui sont réalisées au sein du service de Microbiologie de l'hôpital Robert Debré qui a également choisi comme référentiel, le GBEA. De plus, en raison de l'obligation faite aux laboratoires de biologie de respecter la norme NF EN ISO 15189, le service de Microbiologie ainsi que le Pôle de Biologie de l'hôpital Robert Debré sont entrés dans la démarche d'accréditation pour 2013. Des procédures spécifiques à l'activité du laboratoire associé ont été rédigées : procédures générales, procédures pré-analytiques, analytiques et post-analytiques. Le dossier d'accréditation a été déposé au COFRAC en novembre 2012. La visite d'accréditation a eu lieu le 31 mars et le 1<sup>er</sup> avril 2014. Aucun écart critique n'a été relevé au cours de cette évaluation, seuls des axes d'amélioration ont été définis

## ANNEXE 2

### Annexe 2. Capacités techniques du CNR

#### 2.1 Pour *Salmonella*

##### 2.1.1 Liste des techniques de référence

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

###### *Bactériologie classique*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 7100 spacers différents ont été décrits par cette méthode ; ils sont accessibles sur le site web dédié (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Cette méthode originale a été mise au point au CNR-ESS (Fabre L *et al*, PloS One 2012).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

Le sérotypage est la méthode de référence du typage des *Salmonella*. Il permet de différencier 2579 sérotypes (FX Weill et PAD Grimont « formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* » 9<sup>ème</sup> édition, 2007). Un sérotypage complet est réalisé systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR-ESS. Pour les sérotypes les plus fréquents (trois sérotypes, Typhimurium et son variant monophasique, et Enteritidis représentent près de 70% des *Salmonella* isolées chez l'homme en France depuis 2011), une ou plusieurs techniques de sous-typage pré-citées et adaptées au sérotype en cause seront réalisées lors des investigations de cas groupés pour apprécier la clonalité des souches et leur lien avec une souche non

humaine de *Salmonella*. Parfois le profil de résistance aux antibiotiques peut être un marqueur épidémiologique utile.

### **2.1.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence**

Toutes les souches adressées au CNR-ESS depuis 1947 ont été conservées en tubes gélosés gardées à température ambiante. La collection du CNR-ESS comprend plus de 300.000 souches. L'ensemble de tous les sérotypes connus de *Salmonella* est conservé sous forme lyophilisée au Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur les *Salmonella* (CCOMS). Certaines souches possédant des résistances particulières aux antibiotiques sont conservées à -80°C. Les informations relatives aux souches sont disponibles sur des cahiers et sur des fichiers informatiques. La mise à disposition de ces souches se fait avec l'accord du ou des responsables du CNR-ESS sous forme de contrat MTA (Material Transfert Agreement).

### **2.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR**

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

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

- **L'analyse MLVA** pour le sérotype Typhimurium est standardisée et harmonisée depuis 2011. Le CNR-ESS aide à la mise en place et à l'harmonisation de cette technique pour les laboratoires français.

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



## 2.2 Pour *Escherichia coli*

### 2.2.1 Liste des techniques de référence

#### 2.2.1.1 au CNR-ESS

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

##### ***Bactériologie classique***

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

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

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

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

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

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

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

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

##### *b. Techniques d'identification des sérotypes de E. coli*

##### Le sérotypage classique

Le **sérotypage partiel** est effectué avec les antisérums O1, O2, O18, O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164 et H7. Il est très difficile d'obtenir des sérums spécifiques de bonne qualité pour le sérotypage des *E. coli*. Les sérums utilisés proviennent de différents fournisseurs (Eurobio, Sifin). Chaque sérum subit un contrôle qualité à réception.

##### Le sérotypage moléculaire

L'agglutination des souches de *E. coli* est la technique de base, mais cette méthode immunologique est très souvent mise en défaut pour *E. coli* en raison d'un nombre de sérotypes très élevé (plus de 170 antigènes O et 50 antigènes H connus) et le schéma

antigénique n'est pas exhaustif (à la différence des *Salmonella*). Pour les *E. coli* *stx*<sup>+</sup> et *Shigella*, le sérotypage moléculaire est utile quand les souches ne sont pas sérotypables (nouveaux sérotypes en l'absence d'antisérums spécifiques ou quand les souches sont autoagglutinables [rough]).

- **Le sérotypage moléculaire O des *E. coli* et *Shigella* par *rfb*-RFLP**, mis au point dans l'Unité BPE (Pr P.A.D. Grimont) consiste en une analyse des profils de restriction obtenus par amplification de la région génétique *rfb* (antigène O, environ 20kb) puis restriction enzymatique avec *Mbo*I. Les profils de restriction ainsi obtenus sont comparés à une base de données dans le logiciel BioNumerics contenant 250 profils déterminés pour 148 sérogroupe O de *E. coli* et 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes O déterminés de façon moléculaire sont notés R (et non « O »).

- **Le sérotypage moléculaire de l'antigène H par séquençage du gène *fliC***. Il permet de déterminer le « H » moléculaire (nommé « F ») par comparaison à la base de données de l'Unité BPE qui comprend les séquences de 92 sérotypes de *E. coli* et près de 40 sérotypes de *Shigella*.

#### *c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR*

La panoplie des gènes de pathogénicité présents chez *E. coli* est imposante. La détection par PCR (multiplex ou simplex) de tous ces gènes s'effectue sur souches isolées ou directement sur les selles. Les gènes suivants sont recherchés en priorité :

- Les gènes *stx* (*vt*) codant pour les Shiga-toxines ou Verotoxines chez les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ou EHEC) ou encore chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1).

Il nous est possible de sous-typer le gène *stx* en 6 variants par un système de PCR et restriction enzymatique.

- Le gène d'adhésion *eae* codant pour une adhésine « d'attachement et d'effacement aux cellules épithéliales, l'intimine responsable de la lésion ». Ce gène est reconnu comme facteur de pathogénicité important chez les STEC et les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC).

- Le gène *ehlyA* (*hlyA*) codant pour l'entérohémolysine. Ce gène est présent dans 90% des cas chez les STEC.

En fonction du contexte (suspicion d'épidémie liée à un des multiples pathovars entériques ou lors d'un tableau clinique sévère) plusieurs autres gènes de virulence peuvent être recherchés par PCR. Il s'agit des gènes de toxine *st* et *lt* des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des gènes *astA* et *aggR* des *E. coli* entéroaggrégants (EAgEC), des gènes codant pour les adhésines *PAP*, *SFA*, *AFA* chez des souches responsables de diarrhées ou uropathogènes (UPEC), des gènes *cnf1* et *aer* chez des souches responsables de septicémie.

#### *d. Techniques de sous-typage des *E. coli**

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée PulseNet). Méthode de référence à l'heure actuelle pour le sous-typage.

*e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des E. coli*

- L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et détermination de la CMI à tous les antibiotiques par la méthode E-test (BioMérieux),
- L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support).

*f. Sérodiagnostic lors des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU)*

Seule la recherche dans le sérum des patients d'anticorps anti-LPS (IgA et IgM) dirigés contre un panel de 23 sérogroupes de *E. coli* fréquemment associés à la survenue de SHU est effectuée. Le diagnostic se base sur la recherche d'anticorps anti-LPS car le taux d'anticorps anti-Shiga-toxine est trop faible pour être détectable.

La technique utilisée est celle du « **line-blot** » avec 8 LPS purifiés (O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157 de *E. coli*) ou 24 LPS (O1, O2, O4, O14, O26, O29, O55, O91, O103, O104, O105, O111, O113, O115, O118, O127, O128, O136, O145, O153, O157, O163, O164 de *E. coli* et O30 de *Salmonella*) est utilisée. La recherche est effectuée sur 2 sérums : le 1<sup>er</sup> prélevé le plus tôt possible après le début du SHU (J0) et le 2<sup>ème</sup> prélevé environ 15 jours après (J15). Cette méthode est très utile dans la surveillance des SHU quand la bactérie n'est plus retrouvée dans les selles.

2.2.1.2 Techniques du LA-RD

Elles sont, pour la plupart identiques, à celles du CNR –ECS :

*a. Diagnostic/identification*

- Mise en culture sur milieux spécifiques : Mac Conkey Sorbitol Cefixime Tellurite (BioMérieux), Milieu chromogène pour entérobactéries et milieu de Drigalski
- Agglutination par des antisérums (BioRad et Sifin)
- Identification biochimique sur galerie API20E (BioMérieux)
- PCR spécifique des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA*
- Groupage phylogénétique

*b. Typage*

- Sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145. Les sérotypes O104 et O121 ont été rajoutés à cette PCR multiplex
- RAPD, Rep -PCR
- PFGE
- Puces : 77 cibles et 11 sérotypes

### *c. Sensibilité aux anti-infectieux*

- étude par méthode de diffusion en milieu gélosé et méthode du E-test pour la détermination de la sensibilité à l'azithromycine

#### **2.2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

Lors d'investigations d'épidémies, la plupart des techniques exposées précédemment sont utilisables pour le suivi de l'épidémie. Pour *E. coli*, nous réalisons en priorité, le sérotypage (par agglutination ou moléculaire) et effectuons la recherche des gènes de virulence. Par la suite, l'empreinte génétique des souches est réalisée par PFGE.

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

#### **2.2.3 Collection de souches**

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

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *E. coli*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines,

Pour les autres souches, elles sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches des CNR.

Au LA-RD à l'hôpital Robert Debré, les souches sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une pièce dédiée. Plusieurs collections de souches humaines sont ainsi disponibles depuis 1987 :

- Les souches de *E. coli* responsables de SHU de l'enfant.
- Les souches de *E. coli* responsables de méningites néonatales.
- Les souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires de l'enfant.

#### **2.2.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS-LA**

Concernant le diagnostic des EHEC : un article a été rédigé en 2008 par l'InVS et le CNR-ECS-LA (Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Filliol I, Vaillant V et de Valk H. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : Aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue Francophone des Laboratoires. Mars 2008, n°400, p59-65). Cet article, toujours d'actualité permet aux laboratoires d'avoir toutes les informations et le schéma d'isolement concernant la détection des souches STEC.

Un autre article de référence est paru en janvier 2013 rédigé par le CNR-ESS (Gouali M et Weill FX) : Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. Jan 2013, Volume 42, N°1. 68-75). Cet article a l'avantage de rappeler les caractéristiques, la pathogénie, l'épidémiologie et les méthodes de diagnostic des infections à EHEC.

## 2.3 Pour *Shigella*

### 2.3.1 Liste des techniques de référence

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

##### **Bactériologie classique**

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

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

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

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

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

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

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

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

#### b. Techniques d'identification de *Shigella*

##### Le sérotypage classique

##### **\* *Shigella***

Le **sérotypage complet** par agglutination permet d'identifier 20 sérotypes de *S. boydii*, 17 sérotypes de *S. dysenteriae* et 6 sérotypes de *S. flexneri*. Les souches de *S. sonnei* sont divisées en 5 biotypes en fonction des caractères biochimiques. Les sérums utilisés sont commercialisés par Eurobio ou Sifin, quelques sérums spécifiques sont fabriqués dans l'Unité BPE.

##### Le sérotypage moléculaire

Celui-ci est utile quand les souches ne sont pas sérotypables (nouveaux sérotypes en l'absence d'antisérums spécifiques ou quand les souches sont autoagglutinables [rough]).

- **Le sérotypage moléculaire O des *E. coli* et *Shigella* par *rfb*-RFLP**, mis au point dans l'Unité BPE (Pr P.A.D. Grimont) consiste en une analyse des profils de restriction obtenus par amplification de la région génétique *rfb* (antigène O, environ 20kb) puis restriction enzymatique avec *Mbo*I. Les profils de restriction ainsi obtenus sont comparés à une base de données dans le logiciel BioNumerics contenant 250 profils déterminés pour 148 sérogroupes O de *E. coli* et 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes O déterminés de façon moléculaire sont notés R (et non « O »).

- **Le sérotypage moléculaire de l'antigène H par séquençage du gène *fliC***. Il permet de déterminer le « H » moléculaire (nommé « F ») par comparaison à la base de données de l'Unité BPE qui comprend les séquences de 92 sérotypes de *E. coli* et près de 40 sérotypes de *Shigella*.

*c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR des Shigella*

- Les gènes *ipah* et *ial*
- Le gène *stx* chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1).

*d. Techniques de sous-typage des Shigella*

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée PulseNet). Méthode de référence à l'heure actuelle pour le sous-typage.

*e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des Shigella*

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

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

**2.3.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

### **2.3.3 Collection de souches**

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

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

Pour les autres souches, elles sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches des CNR.

### **2.3.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS :**

Concernant les *Shigella*, la caractérisation biochimique suivie de la séroagglutination reste la seule méthode diagnostique utilisable en laboratoire.



## **2.4 Sélection de 10 publications représentatives de l'année 2013**



# Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study

Simon Le Hello, Dorothée Harrois, Brahim Bouchrif, Lucile Sontag, Dalèle Elhani, Véronique Guibert, Khalid Zerouali, François-Xavier Weill

## Summary

**Background** *Salmonella enterica* is a major global food-borne pathogen, causing life-threatening infections. Ciprofloxacin and extended-spectrum cephalosporins (ESCs) are the drugs of choice for severe infections. We previously reported a ciprofloxacin-resistant *S enterica* serotype Kentucky (S Kentucky) ST198-X1 strain that emerged in Egypt and spread throughout Africa and the Middle East from 2002 to 2008. We aimed to monitor recent trends in the location of transmission and antimicrobial resistance of this strain.

**Methods** We analysed isolates of S Kentucky collected by the French national surveillance system for salmonellosis in France from Jan 1, 2000, to Dec 31, 2011, and at two sites in Casablanca, Morocco, between Jan 1, 2003, and Dec 31, 2011. We analysed patterns of travel of patients infected with a ciprofloxacin-resistant strain of S Kentucky. We identified isolates showing resistance to ESCs or decreased susceptibility to carbapenems, characterised isolates by *Xba*I-pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing, and assessed mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs.

**Findings** 954 (1%) of 128 836 serotyped *Salmonella* spp isolates in France were identified as S Kentucky, as were 30 (13%) of 226 *Salmonella* spp isolates from Morocco. During 2000–08, 200 (40%) of 497 subculturable isolates of S Kentucky obtained in France were resistant to ciprofloxacin, compared with 376 (83%) of 455 isolates in 2009–11, suggesting a recent increase in ciprofloxacin resistance in France. Travel histories suggested S Kentucky infections originated predominantly in east Africa, north Africa, west Africa, and the Middle East, but also arose in India. We report several occurrences of acquisition of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-1, CTX-M-15), plasmid-encoded cephalosporinase (CMY-2), or carbapenemase (OXA-48, VIM-2) genes by ciprofloxacin-resistant isolates of S Kentucky ST198-X1 from the Mediterranean area since 2009. Many of these highly drug-resistant isolates were also resistant to most aminoglycosides, to co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole), and to azithromycin.

**Interpretation** The potential risk to public health posed by ciprofloxacin-resistant S Kentucky ST198-X1 warrants its inclusion in national programmes for the control of *S enterica* in food-producing animals, in particular in poultry.

**Funding** Institut Pasteur, Institut de Veille Sanitaire, Fondation pour la Recherche Médicale, French Government Investissement d'Avenir programme.

## Introduction

Antimicrobial drug-resistant bacteria present a serious challenge for the clinical care of patients and for public health in the 21st century.<sup>1</sup> Gram-negative superbugs, such as those resistant to extended-spectrum cephalosporins (ESCs) because of their ability to produce either extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or cephamycinases (AmpC), seem to have now eclipsed Gram-positive superbugs (ie, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp). Furthermore, the recent emergence of Enterobacteriaceae resistant to all  $\beta$ -lactam antibiotics, including ESCs and carbapenems, is of particular concern because carbapenems are in many cases the last option available for treatment of serious infection with ESC-resistant Gram-negative bacteria. Indeed, the development pipeline for new antimicrobial drugs with bactericidal activity against Gram-negative bacteria has now run dry.<sup>2,3</sup>

In a 2004 report entitled *Bad Bugs, No Drugs*, the Infectious Diseases Society of America imagined a catastrophic scenario with an explosive epidemic of 220 000 cases and 1730 deaths caused by a multidrug-resistant

non-typhoidal strain of *Salmonella* spp, which was resistant, in particular, to ESCs and fluoroquinolones. This choice was based on the following observations: first, *Salmonella enterica* is a prevalent zoonotic agent causing an estimated 1·7 million infections per year and resulted in 2800 deaths in high-income regions of North America in 2006;<sup>4</sup> second, *S enterica* can cause major food-borne outbreaks, such as one in the USA in 1994 associated with manufactured ice cream contaminated with *S enterica* serotype Enteritidis, which caused sickness in an estimated 224 000 people;<sup>5</sup> third, fluoroquinolones, including ciprofloxacin, and ESCs are the drugs of choice for treatment of severe *S enterica* infections and for people at risk of such infections (infants, the elderly, and immunocompromised patients); and fourth, infections with drug-resistant *Salmonella* spp are associated with increased morbidity and mortality.<sup>6</sup>

We previously reported the international emergence of a multidrug-resistant *S enterica* serotype Kentucky (S Kentucky) strain, identified as being multilocus sequence type (MLST) ST198 and as belonging to *Xba*I-pulsed field gel electrophoresis (PFGE) cluster X1.<sup>7</sup> S Kentucky ST198-X1 isolates are resistant to several antimicrobial

Lancet Infect Dis 2013;  
13: 672–79

Published Online

May 28, 2013

[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70124-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70124-5)

See [Comment](#) page 641

Institut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, France (S Le Hello PharmD, D Harrois PharmD, L Sontag BSc, D Elhani PhD, V Guibert, F-X Weill MD); Institut Pasteur du Maroc, Sécurité Alimentaire et Environnement, Casablanca, Morocco (B Bouchrif PhD); and Laboratoire de Microbiologie, CHU Ibn Rochd, Casablanca, Morocco (K Zerouali MD)

Correspondence to:

Dr François-Xavier Weill, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Institut Pasteur, 28 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France [francois-xavier.weill@pasteur.fr](mailto:francois-xavier.weill@pasteur.fr)

# Prevalence and characterization of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing clinical *Salmonella enterica* isolates in Dakar, Senegal, from 1999 to 2009

D. Harrois<sup>1,2,\*</sup>, S. Breurec<sup>2,3,\*</sup>, A. Seck<sup>2</sup>, A. Delauné<sup>1</sup>, S. Le Hello<sup>1</sup>, M. Pardos de la Gándara<sup>1</sup>, L. Sontag<sup>1</sup>, J.-D. Perrier-Gros-Claude<sup>2</sup>, J.-M. Sire<sup>2</sup>, B. Garin<sup>2,4</sup> and F.-X. Weill<sup>1</sup>

1) Institut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Paris, France, 2) Institut Pasteur de Dakar, Unité de Bactériologie Médicale et Environnementale, Dakar, Senegal, 3) Institut Pasteur de Bangui, Laboratoire de Biologie Médicale, Bangui, République Centrafricaine and 4) Institut Pasteur de Madagascar, Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Antananarivo, Madagascar

## Abstract

A total of 1623 clinical isolates of *Salmonella* belonging to 229 serotypes were received by the Senegalese Reference Center for Enterobacteria from January 1999 to December 2009. The most common serotypes were Enteritidis (19% of the isolates), Typhi (8%), Typhimurium (7%) and Kentucky (4%). A significant increase in the prevalence of resistance to amoxicillin (0.9% in 1999 to 11.1% in 2009) and nalidixic acid (0.9% in 1999 to 26.7% in 2009) was observed in non-typhoidal *Salmonella* serotypes. For critically important antibiotics, notably ciprofloxacin and extended-spectrum cephalosporins (ESCs), the rates of resistance were low: 0.3% and 0.5%, respectively. Seven ESC-resistant *Salmonella* strains and three additional ESC-resistant strains from Senegal (1990) and Mali (2007) were studied to identify the genetic basis of their antibiotic resistance. All ESC-resistant strains produced an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). These were CTX-M-15 ( $n = 6$ ; 2000–2008), SHV-12 ( $n = 3$ ; 2000–2001) and SHV-2 ( $n = 1$ ; 1990). A large IncHI2 ST1 pK29-like plasmid was found in six strains (three producing SHV-12 and three CTX-M-15), whereas IncN and IncF plasmids were found in three strains and one strain, respectively. The association of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr* was found in four ESBL-producing strains, leading to decreased susceptibility and even full resistance to ciprofloxacin (MIC range 0.75–2 mg/L) despite the absence of mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*. This association of ESBL and multiple PMQR mechanisms within the same strains is therefore a serious concern as it hampers the use of both ESCs and fluoroquinolones for severe *Salmonella* infections.

**Keywords:** AAC(6')-Ib-cr, antimicrobial resistance, CTX-M, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, IncHI2 plasmid, IncN plasmid, Qnr, *Salmonella enterica*, Senegal, SHV

**Original Submission:** 5 February 2013; **Revised Submission:** 3 July 2013; **Accepted:** 14 July 2013

Editor: R. Cantón

**Article published online:** 18 July 2013

*Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: O109–O116

10.1111/1469-0691.12339

**Corresponding author:** F.-X. Weill, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France  
**E-mail:** francois-xavier.weill@pasteur.fr

\*These authors contributed equally.

## Introduction

Human *Salmonella* infections are generally either typhoid fever, a systemic disease caused by *S. enterica* serotypes

Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B (non-*d*-tartrate-fermenting variant) and Paratyphi C, or gastroenteritis caused by a large number of non-typhoidal *Salmonella* (NTS) serotypes. Typhoidal serotypes are human-restricted whereas NTS have large animal reservoirs. Although most salmonellosis due to NTS is self-limiting, serious complications, including systemic infection and death, can occur. Such infections have consistently been reported as a leading cause of bacteraemia in Africa and are associated with a high risk of death [1]. As rates of resistance to all classes of antibiotics have increased throughout the world, conventional antibiotics such as ampicillin, chloramphenicol and cotrimoxazole are no longer



# The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain

Simon Le Hello<sup>1\*</sup>, Amany Bekhit<sup>1,2</sup>, Sophie A. Granier<sup>3</sup>, Himel Barua<sup>4</sup>, Janine Beutlich<sup>5</sup>, Magdalena Zając<sup>6</sup>, Sebastian Münch<sup>7</sup>, Vitali Sintchenko<sup>8</sup>, Brahim Bouchrif<sup>9</sup>, Kayode Fashae<sup>10</sup>, Jean-Louis Pinsard<sup>11</sup>, Lucile Sontag<sup>1</sup>, Laetitia Fabre<sup>1</sup>, Martine Garnier<sup>1</sup>, Véronique Guibert<sup>1</sup>, Peter Howard<sup>9</sup>, Rene S. Hendriksen<sup>12</sup>, Jens P. Christensen<sup>13</sup>, Paritosh K. Biswas<sup>4</sup>, Axel Cloeckaert<sup>14,15</sup>, Wolfgang Rabsch<sup>7</sup>, Dariusz Wasyl<sup>6</sup>, Benoît Doublet<sup>14,15</sup> and François-Xavier Weill<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>2</sup> Biochemistry Department, Faculty of Pharmacy, Minia University, Minia, Egypt

<sup>3</sup> Unité Caractérisation et épidémiologie Bactérienne, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Université Paris-Est, Anses, Maisons-Alfort, France

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Chittagong Veterinary and Animal Sciences University, Chittagong, Bangladesh

<sup>5</sup> Unit Antimicrobial Resistance and Resistance Determinants, National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance, Department Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

<sup>6</sup> Department of Microbiology, National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland

<sup>7</sup> National Reference Centre for *Salmonellae* and other Bacterial Enteric Pathogens, Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany

<sup>8</sup> Centre for Infectious Diseases and Microbiology – Public Health, University of Sydney, ICPMR, Sydney, NSW, Australia

<sup>9</sup> Institut Pasteur du Maroc, Sécurité alimentaire et Environnement, Casablanca, Maroc

<sup>10</sup> Department of Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

<sup>11</sup> Bio Chêne Vert, FINALAB, Châteaubourg, France

<sup>12</sup> WHO Collaborating Center for Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens and European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

<sup>13</sup> Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Copenhagen, Denmark

<sup>14</sup> Institut national de la recherche agronomique, UMR1282 Infectiologie et Santé publique, Nouzilly, France

<sup>15</sup> Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé publique, Tours, France

## Edited by:

Michel S. Zygmunt, Institut National de la Recherche Agronomique, France

## Reviewed by:

Kunihiko Nishino, Osaka University, Japan

Seamus Fanning, University College Dublin, Ireland

## \*Correspondence:

Simon Le Hello, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France  
e-mail: slehello@pasteur.fr

While the spread of *Salmonella enterica* serotype Kentucky resistant to ciprofloxacin across Africa and the Middle-East has been described recently, the presence of this strain in humans, food, various animal species (livestock, pets, and wildlife) and in environment is suspected in other countries of different continents. Here, we report results of an in-depth molecular epidemiological study on a global human and non-human collection of *S. Kentucky* ( $n = 70$ ). We performed *Xba*I-pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing, assessed mutations in the quinolone resistance-determining regions, detected  $\beta$ -lactam resistance mechanisms, and screened the presence of the *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). In this study, we highlight the rapid and extensive worldwide dissemination of the ciprofloxacin-resistant *S. Kentucky* ST198-X1-SGI1 strain since the mid-2000s in an increasingly large number of contaminated sources, including the environment. This strain has accumulated an increasing number of chromosomal and plasmid resistance determinants and has been identified in the Indian subcontinent, Southeast Asia and Europe since 2010. The second substitution at position 87 in *GyrA* (replacing the amino acid Asp) appeared helpful for epidemiological studies to track the origin of contamination. This global study provides evidence leading to the conclusion that high-level resistance to ciprofloxacin in *S. Kentucky* is a simple microbiological trait that facilitates the identification of the epidemic clone of interest, ST198-X1-SGI1. Taking this into account is essential in order to detect and monitor it easily and to take rapid measures in livestock to ensure control of this infection.

**Keywords:** *S. Kentucky*, ST198, SGI1, QRDR, MDR *Salmonella* dissemination, poultry

## INTRODUCTION

Despite the substantial progress made in preventing foodborne diseases, new pathogens have emerged, some of which have spread worldwide decade after decade (Tauxe, 1997). These pathogens include strains of multi-drug resistant (MDR) *Salmonella* (Arlet et al., 2006; Walsh and Fanning, 2008). Their treatment in

both animals and humans has become more difficult and the number of reports of foodborne infections and outbreaks of MDR *Salmonella* has increased (Angulo et al., 2000; Mølbak, 2005). The global spread of an MDR *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 in animals and humans since the 1990s (Threlfall, 2000; Mather et al., 2013) is a good example.

# Unusual increase in reported cases of Paratyphoid A fever among travellers returning from Cambodia, January to September 2013

M Tourdjman (m.tourdjman@invs.sante.fr)<sup>1</sup>, S Le Hello<sup>2</sup>, C Gossner<sup>3</sup>, G Delmas<sup>1</sup>, S Tubiana<sup>1</sup>, L Fabre<sup>2</sup>, A Kerléguer<sup>4</sup>, A Tarantola<sup>4</sup>, A Fruth<sup>5</sup>, I Friesema<sup>6</sup>, L Thorstensen Brandal<sup>7</sup>, J Lawrence<sup>8</sup>, I Fisher<sup>8</sup>, M Dufour<sup>9</sup>, F X Weill<sup>2</sup>, H de Valk<sup>1</sup>

1. Institut de veille sanitaire (InVS), Paris, France
2. Institut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des Escherichia coli, Shigella et Salmonella, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Paris, France
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden
4. Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia
5. Robert Koch Institute (RKI), Wernigerode, Germany
6. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands
7. Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway
8. Public Health England, London, United Kingdom
9. Institute of Environmental Science and Research, Enteric Reference Laboratory, Wellington, New Zealand

## Citation style for this article:

Tourdjman M, Le Hello S, Gossner C, Delmas G, Tubiana S, Fabre L, Kerléguer A, Tarantola A, Fruth A, Friesema I, Thorstensen Brandal L, Lawrence J, Fisher I, Dufour M, Weill FX, de Valk H. Unusual increase in reported cases of Paratyphoid A fever among travellers returning from Cambodia, January to September 2013. Euro Surveill. 2013;18(39):pii=20594. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20594>

Article submitted on 23 September 2013 / published on 26 September 2013

From January to September 2013, a marked increase in notifications of *Salmonella* Paratyphi A infections among travellers returning from Cambodia occurred in France. An investigation revealed 35 cases without a common source: 21 in France, five in Germany, three in the Netherlands, one in Norway, one in the United Kingdom, four in New-Zealand. Data suggest an ongoing event that should trigger further investigation. Travellers to Cambodia should observe preventive measures including good personal hygiene and food handling practices.

In the first eight months of 2013, numbers of *Salmonella* Paratyphi A infections among travellers returning to France from Cambodia increased markedly while several other countries also reported imported cases although to a lesser extent. Concurrently, an increase in *S. Paratyphi A* infections in Phnom Penh, Cambodia, starting in 2011 but with heightened numbers in 2013, was identified. Here we report mainly on the preliminary findings of the investigation of the French cases.

## Background

*Salmonella enterica* serotype Paratyphi A only affects humans and is a cause of paratyphoid fever. Paratyphoid fever can also be caused by *S. enterica* serotypes Paratyphi B d-tartrate non-fermenting or Paratyphi C, and remains a major cause of morbidity in countries with poor sanitation, with an estimated 5.5 million cases occurring annually [1]. In high-income countries, the majority of paratyphoid fever cases are imported from endemic regions. Transmission is faecal-oral, through consumption of contaminated food or water, as well as person-to-person. The incubation

period ranges from five to 21 days depending on the inoculum ingested. Acute illness is characterised by fever and malaise; other non-specific symptoms include headaches, abdominal pain, diarrhoea or constipation, maculopapular rash and enlarged spleen. Chronic carriage can occur following acute infection. Reported case-fatality rate is approximately 1% and can be lowered by prompt use of adequate antibiotic therapy [2,3]. Resistance to various drugs including ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and quinolones is increasing worldwide and effective treatment requires adapted antibiotic therapy [4,5]. Good personal hygiene and food handling practices are the only preventive measures as there is no effective vaccine against paratyphoid infection [6].

## Situation in France

In France, typhoid and paratyphoid fever have been notifiable diseases since 1903. In addition to mandatory reporting, clinical laboratories forward the isolates to the National Reference Centre for *Salmonella* (NRC) at the Pasteur Institute in Paris on a voluntary basis. Between 2003 and 2012, 272 cases of paratyphoid A fever were reported (annual range: 18–36), including only seven cases among travellers returning from Cambodia.

On 22 August 2013, the NRC notified the French National Institute for Public Health Surveillance (InVS) in Paris, about an unusual increase in the number of cases of paratyphoid A fever among travellers returning from Cambodia: from 1 January to 22 August 2013, 14 cases had been identified at the NRC. We initiated



## RESEARCH ARTICLE

# Comparative Genomics of Recent Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4: Short-Term Evolution of an Emerging Pathogen

Yonatan H. Grad,<sup>a,b</sup> Paul Godfrey,<sup>c</sup> Gustavo C. Cerquiera,<sup>c</sup> Patricia Mariani-Kurkdjian,<sup>d</sup> Malika Gouali,<sup>e</sup> Edouard Bingen,<sup>d,f†</sup> Terrence P. Shea,<sup>c</sup> Brian J. Haas,<sup>c</sup> Allison Griggs,<sup>c</sup> Sarah Young,<sup>c</sup> Qiangdong Zeng,<sup>c</sup> Marc Lipsitch,<sup>b,g</sup> Matthew K. Waldor,<sup>a,h</sup> François-Xavier Weill,<sup>e</sup> Jennifer R. Wortman,<sup>c</sup> William P. Hanage<sup>b</sup>

Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA<sup>a</sup>; Department of Epidemiology, Center for Communicable Disease Dynamics, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA<sup>b</sup>; Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>c</sup>; Laboratoire Associé au Centre National de Référence des *Escherichia coli* et *Shigella*, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France<sup>d</sup>; Institut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli* et *Shigella*, Paris, France<sup>e</sup>; Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France<sup>f</sup>; Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA<sup>g</sup>; Howard Hughes Medical Institute, Boston, Massachusetts, USA<sup>h</sup>

† Deceased.

J.R.W. and W.P.H. contributed equally to this article.

This paper is dedicated to the memory of Edouard Bingen and in honor of his three decades of work in the field of pediatric microbiology.

**ABSTRACT** The large outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS) caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 in Europe from May to July 2011 highlighted the potential of a rarely identified *E. coli* serogroup to cause severe disease. Prior to the outbreak, there were very few reports of disease caused by this pathogen and thus little known of its diversity and evolution. The identification of cases of HUS caused by *E. coli* O104:H4 in France and Turkey after the outbreak and with no clear epidemiological links raises questions about whether these sporadic cases are derived from the outbreak. Here, we report genome sequences of five independent isolates from these cases and results of a comparative analysis with historical and 2011 outbreak isolates. These analyses revealed that the five isolates are not derived from the outbreak strain; however, they are more closely related to the outbreak strain and each other than to isolates identified prior to the 2011 outbreak. Over the short time scale represented by these closely related organisms, the majority of genome variation is found within their mobile genetic elements: none of the nine O104:H4 isolates compared here contain the same set of plasmids, and their prophages and genomic islands also differ. Moreover, the presence of closely related HUS-associated *E. coli* O104:H4 isolates supports the contention that fully virulent O104:H4 isolates are widespread and emphasizes the possibility of future food-borne *E. coli* O104:H4 outbreaks.

**IMPORTANCE** In the summer of 2011, a large outbreak of bloody diarrhea with a high rate of severe complications took place in Europe, caused by a previously rarely seen *Escherichia coli* strain of serogroup O104:H4. Identification of subsequent infections caused by *E. coli* O104:H4 raised questions about whether these new cases represented ongoing transmission of the outbreak strain. In this study, we sequenced the genomes of isolates from five recent cases and compared them with historical isolates. The analyses reveal that, in the very short term, evolution of the bacterial genome takes place in parts of the genome that are exchanged among bacteria, and these regions contain genes involved in adaptation to local environments. We show that these recent isolates are not derived from the outbreak strain but are very closely related and share many of the same disease-causing genes, emphasizing the concern that these bacteria may cause future severe outbreaks.

Received 16 October 2012 Accepted 30 November 2012 Published 22 January 2013

**Citation** Grad YH et al. 2013. Comparative genomics of recent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: short-term evolution of an emerging pathogen. mBio 4(1): e00452-12. doi:10.1128/mBio.00452-12

**Editor** Fernando Baquero, Ramón y Cajal University Hospital

**Copyright** © 2013 Grad et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-Noncommercial-ShareAlike 3.0 Unported](#) license, which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Yonatan H. Grad, ygrad@hsph.harvard.edu.

The large outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS) caused by *Escherichia coli* O104:H4 (1, 2) in May through early July 2011 focused considerable attention on this previously rarely identified serogroup (1, 3–7). Over 3,800 cases of gastroenteritis were recorded in Germany and among individuals from other countries who had traveled to Germany (2), and a

small outbreak took place in France (3, 7). The fraction of patients who developed HUS (>20%) was considerably higher than observed in prior outbreaks of Shiga toxin-producing *E. coli*, such as *E. coli* O157:H7 (2). Epidemiological investigations suggested that the outbreak was caused predominantly by contaminated sprouts produced by a farm in Lower Saxony (8). Besides the magnitude of

# Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 Chromogenic Agar Media for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Stool Specimens

Malika Gouali, Corinne Ruckly, Isabelle Carle, Monique Lejay-Collin, François-Xavier Weill

Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France

The performance of CHROMagar STEC and CHROMagar STEC O104 (CHROMagar Microbiology, Paris, France) media for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) was assessed with 329 stool specimens collected over 14 months from patients with suspected STEC infections (June 2011 to August 2012). The CHROMagar STEC medium, after an enrichment broth step, allowed the recovery of the STEC strain from 32 of the 39 (82.1%) Shiga toxin-positive stool specimens, whereas the standard procedure involving Drigalski agar allowed the recovery of only three additional STEC strains. The isolates that grew on CHROMagar STEC medium belonged to 15 serotypes, including the prevalent non-sorbitol-fermenting (NSF) O157:H7, O26:H11, and O104:H4 serotypes. The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for the CHROMagar STEC medium were between 89.1% and 91.4%, 83.7% and 86.7%, 40% and 51.3%, and 98% and 98.8%, respectively, depending on whether or not *stx*-negative *eae*-positive *E. coli* was considered atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) or STEC that had lost Shiga toxin genes during infection. In conclusion, the good performance of CHROMagar STEC agar medium, in particular, the high negative predictive value, and its capacity to identify NSF O157:H7 as well as common non-O157 STEC may be useful for clinical bacteriology, public health, and reference laboratories; it could be used in addition to a method targeting Shiga toxins (detection of *stx* genes by PCR, immunodetection of Shiga toxins in stool specimens, or Vero cell cytotoxicity assay) as an alternative to O157 culture medium. This combined approach should allow rapid visualization of both putative O157 and non-O157 STEC colonies for subsequent characterization, essential for real-time surveillance of STEC infections and investigations of outbreaks.

Certain strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are important causes of food-borne disease in industrialized countries. The clinical manifestations of STEC infections range from mild diarrhea to severe and specific complications, such as hemolytic-uremic syndrome (HUS), which occurs primarily in young children (1, 2). These STEC strains associated with human infections are also called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Animals, and especially cattle, serve as reservoirs for STEC. Transmission occurs via ingestion of contaminated food or water, person-to-person contact, direct animal contact, and exposure to the environment. STEC strains are characterized by their ability to produce toxins related to those of *Shigella dysenteriae* type 1 (3): two types have been described among STEC isolates, Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2, respectively, encoded by the *stx*<sub>1</sub> and *stx*<sub>2</sub> genes carried on temperate bacteriophages (4, 5). Most STEC isolates also carry the chromosomally located locus of enterocyte effacement (LEE), a pathogenicity island, first described in enteropathogenic *E. coli* (EPEC). LEE promotes the development of attaching-and-effacing lesions in the host intestinal mucosa cells (6). One of the LEE genes, *eae* (for EPEC attaching and effacing), encodes intimin, an outer membrane adhesin essential for the intimate attachment of the bacteria to enterocytes. Other adherence and colonization factors, such as adhesins and pili, are present in LEE-negative STEC strains. The STEC O104:H4 strain responsible for a large outbreak of HUS in Germany and other European countries in 2011 displays a characteristic aggregative adhesion (AA) pattern caused by an enteroaggregative *E. coli* (EAEC) genetic background (7–11).

The laboratory identification of STEC requires screening for Shiga toxin genes or proteins in stool specimens, followed by culture, serotyping, and confirmation of the presence of the virulence genes (at least *stx*<sub>1</sub> and *stx*<sub>2</sub> and then *eae* and *aggR*) in isolated

colonies. Since the first reported STEC outbreak in 1982 (12), various methods for the detection of STEC, especially *E. coli* O157:H7, which is the most prevalent group of STEC, have been developed (13). STEC O157:H7 had been found to be non-sorbitol fermenting (NSF), and consequently, culture media containing sorbitol have been marketed and widely used. However, the identification of sorbitol-fermenting (SF) STEC O157:H7 (SF O157) strains, mainly in Germany (14–16), and the general increase of non-O157 STEC (generally SF) strains in clinical practice (17) have limited the use of sorbitol fermentation as a screening test for STEC. The development of a universal medium for STEC is difficult for many reasons, including the low STEC density and potential inhibitors in stool specimens and the absence of culture characteristics common to all the various unrelated *E. coli* lineages that have acquired *stx*-harboring bacteriophages (18). Recently, new chromogenic media not based on sorbitol fermentation were developed to improve the detection of O157 (19) or the most prevalent EHEC serogroups (20, 21). CHROMagar STEC medium (CHROMagar Microbiology, Paris, France) allows the growth and presumptive identification (mauve colonies) of ≈75% of STEC isolates in a vast collection of isolates encompassing 20 to 40 dif-

Received 28 November 2012 Returned for modification 12 December 2012

Accepted 22 December 2012

Published ahead of print 2 January 2013

Address correspondence to Malika Gouali, malika.gouali@pasteur.fr, or François-Xavier Weill, francois-xavier.weill@pasteur.fr.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.03121-12

Original article

# Shopper cards data and storage practices for the investigation of an outbreak of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 infections

## *Importance des cartes de fidélités et des habitudes de conservation des aliments dans l'investigation d'une épidémie d'infection à Escherichia coli O157:H7*

A.-S. Barret<sup>a,\*,1</sup>, M. Charron<sup>b,1</sup>, P. Mariani-Kurkdjian<sup>c</sup>, M. Gouali<sup>d</sup>, E. Loukiadis<sup>e</sup>,  
B. Poinet-Leroux<sup>f</sup>, A. Godron<sup>g</sup>, G. Gault<sup>b</sup>, M. Faure<sup>h</sup>, A. Mailles<sup>a</sup>, the group of investigators<sup>12</sup>

<sup>a</sup> Institut de veille sanitaire, département des maladies infectieuses, 12, rue du Val-d'Osne, 94415 Saint-Maurice cedex, France

<sup>b</sup> Cellule de l'InVS en région, département de coordination des alertes et des régions (DCAR), 33000 Bordeaux, France

<sup>c</sup> Centre national de référence des *E. coli* et *Shigella*, hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

<sup>d</sup> Centre national de référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

<sup>e</sup> Université de Lyon, Vet Agro Sup, Laboratoire national de référence pour les *E. coli*, 69280 Marcy-l'Étoile, France

<sup>f</sup> Direction générale de l'alimentation, 75732 Paris cedex 15, France

<sup>g</sup> Centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Unité de néphrologie pédiatrique, 33000 Bordeaux, France

<sup>h</sup> Direction générale de la santé, 75350 Paris SP 07, France

Received 30 January 2013; received in revised form 18 March 2013; accepted 24 May 2013

Available online 30 July 2013

### Abstract

**Introduction.** – An outbreak of shiga-toxin producing *Escherichia coli* infections occurred in southwest France in June 2012. The outbreak was investigated to identify the source of infection, and guide control measures.

**Methods.** – Confirmed outbreak cases were patients who developed bloody diarrhoea or haemolytic uremic syndrome (HUS) between 28 May and 6 July 2012, with *E. coli* O157 isolates showing indistinguishable patterns on pulse field gel electrophoresis (PFGE). A standardized questionnaire was administered to patients to document food consumption and other risk exposures. Their purchase was checked through their supermarket shopper card data.

**Results.** – Six patients (four with HUS and two with bloody diarrhea) were confirmed outbreak cases. Fresh ground beef burgers from one supermarket were the only common food exposure, identified by interviews and shopper card data. The PFGE profile of shiga toxin-producing *E. coli* O157 isolated from the suspected beef burgers was identical to those from the human cases. The suspected beef burgers were no longer on sale at the time of investigation but three patients confirmed as outbreak cases had deep-frozen some at home.

**Conclusion.** – Shopper card data was particularly useful to obtain precise and reliable information on the traceability of consumed food. Despite the expired use-by date, a recall was issued for the beef burgers. This contributed to preventing other cases among consumers who had deep-frozen the beef burgers.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Hemolytic uremic syndrome; Outbreak; Shopper card; Shiga-toxin producing *Escherichia coli*; Storage practices

\* Corresponding author.

E-mail address: [asbarret@hotmail.fr](mailto:asbarret@hotmail.fr) (A.-S. Barret).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

<sup>2</sup> Group of investigators: S. le Hello (Centre national de référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France), B. Bréchat (Cellule de l'InVS en région, Département de coordination des alertes et des régions (DCAR), 33000 Bordeaux, France), V. Servas (Cellule de l'InVS en région, Département de coordination des alertes et des régions [DCAR], 33000 Bordeaux, France), J. Harambat (Centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Unité de néphrologie pédiatrique, 33000 Bordeaux, France), E. Bingen (Centre national de référence des *E. coli* et *Shigella*, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France), P. Lehours (Centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Laboratoire de bactériologie, 33000 Bordeaux, France), P. Rolland (Cellule de l'InVS en région, Département de coordination des alertes et des régions [DCAR], 33000 Bordeaux, France), J. Simoes (Agence régionale de santé d'Aquitaine, 33000 Bordeaux, France), V. Vaillant (Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses, 12, rue du Val-d'Osne, 94415 Saint-Maurice Cedex), H. de Valk (Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses, 12, rue du Val-d'Osne, 94415 Saint-Maurice Cedex).



# Characterization of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Involved in Maternal-Fetal Colonization: Prevalence of *E. coli* ST131

André Birgy,<sup>a</sup> Patricia Mariani-Kurkdjian,<sup>a,b</sup> Philippe Bidet,<sup>a,b</sup> Catherine Doit,<sup>a,b</sup> Nathalie Genel,<sup>c</sup> Céline Courroux,<sup>a</sup> Guillaume Arlet,<sup>c,d</sup> Edouard Bingen<sup>a,b</sup>

Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Service de Microbiologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France<sup>a</sup>; Université Paris Diderot, Sorbonnes Paris Cité, Paris, France<sup>b</sup>; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Faculté de Médecine, Site Saint-Antoine, Laboratoire de Bactériologie, Paris, France<sup>c</sup>; Hôpital Tenon, Service de Bactériologie-Hygiène, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France<sup>d</sup>

Maternal-fetal *Escherichia coli* infections, such as neonatal bacteremia and meningitis, are important causes of morbidity and mortality. From 2006 to 2010, we studied newborns and their mothers who were colonized with *E. coli* in a French hospital in order to document (i) the epidemiology and genetic characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* strains, (ii) the prevalence of associated virulence genes, (iii) the prevalence of clone sequence type 131 (ST131), and (iv) the genetic relationship among ESBL-producing strains. Among the 2,755 *E. coli* cultures recovered from vaginal or neonatal samples, 68 were ESBL producers (2.46%). We found a wide diversity of ESBL genes, with the majority being *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, distributed among the 4 main phylogenetic groups. Genes encoding virulence factors were found in 90.7% of the isolates, with  $\geq 2$  virulence genes present in 76% of cases. The prevalence of ST131 among ESBL-producing *E. coli* isolates was 9.4% (6/64). Five of these 6 ST131 isolates possessed *bla*<sub>CTX-M-15</sub> enzymes (and also were resistant to quinolones), and one possessed *bla*<sub>CTX-M-2</sub> enzymes. Two possessed virulence genes, suggesting the presence of pathogenicity island II<sub>96</sub> (PAI II<sub>96</sub>)-like domains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) revealed a high level of genomic diversity overall, except for 3 closely related isolates belonging to clonal group ST131. Repetitive PCR showed that the six ST131 isolates were closely related to ST131 control strains ( $>95\%$  similarity). This study shows a high prevalence of ESBL-producing *E. coli* strains and clonal group ST131 in the French maternal-fetal population. These results suggest a widespread distribution of ESBL enzymes in the community and highlight the early transmission between mothers and neonates. These findings are worrisome, especially for this particularly vulnerable population.

In the past decade, there has been an alarming increase in antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), due at least in part to the overuse of broad-spectrum cephalosporins.

The majority of ESBLs identified in clinical isolates during the 1980s to 1990 were of the SHV or TEM type (1). However, since the mid-2000s, CTX-M ESBLs, originating from environmental *Kluyvera* spp., have gained prominence and are considered pandemic enzymes. CTX-M has been identified in several members of the *Enterobacteriaceae* family, and especially in *Escherichia coli*, which has replaced *Klebsiella* spp. as the principal ESBL-producing member of the *Enterobacteriaceae* (2–4).

ESBL enzymes are important causes of cephalosporin treatment failure. *E. coli* strains carrying these enzymes were initially responsible mainly for nosocomial infections, but they have now disseminated into the community. One of the best examples of this trend is the global spread of *E. coli* clone sequence type 131 (ST131), expressing CTX-M enzymes (5). Maternal-fetal *E. coli* infections, such as neonatal bacteremia and meningitis, are important causes of morbidity and mortality (6).

The epidemiology of ESBL-producing *E. coli* strains in adults is well documented (1, 7). In the neonatal period, most studies have focused on hospital-acquired colonization or infection with ESBL-producing *E. coli* strains (8), leaving aside the epidemiology of community carriage (9). It is necessary to know more about community-acquired infections and particularly about maternal-neonatal transmission to implement empirical therapy (e.g., use of carbapen-

ems in maternity wards where the prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* is high).

Here, we studied colonized newborns and their mothers who were hospitalized at Robert-Debré Hospital (Paris, France) from 2006 to 2010 in order to document (i) the epidemiology and genetic characteristics of ESBL-producing *E. coli* strains, (ii) the prevalence of associated virulence genes, (iii) the prevalence of ST131, and (iv) the genetic relation among ESBL-producing strains.

## MATERIALS AND METHODS

**Setting.** We studied samples collected from newborns and/or their mothers at Robert-Debré Pediatric Hospital in Paris, France, over a 5-year period (February 2006 to December 2010). On average, 3,000 women gave birth in our institution each year between 2006 and 2010. Clinically indicated vaginal swabs were obtained from women during the period of childbirth. Birth samples (from gastric fluid, the outer ear, meconium, or the placenta) were taken routinely ( $<3$  h after birth) to detect colonization/infection. This study included all *E. coli*-positive samples collected

Received 11 December 2012 Returned for modification 13 February 2013

Accepted 15 March 2013

Published ahead of print 20 March 2013

Address correspondence to Guillaume Arlet, guillaume.arlet@tnn.aphp.fr.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.03255-12

# A Conserved Virulence Plasmidic Region Contributes to the Virulence of the Multiresistant *Escherichia coli* Meningitis Strain S286 Belonging to Phylogenetic Group C

Chloé Lemaître<sup>1,2\*</sup>, Farah Mahjoub-Messai<sup>1,2\*</sup>, Damien Dupont<sup>1,2\*</sup>, Valérie Caro<sup>3</sup>, Laure Diancourt<sup>3</sup>, Edouard Bingen<sup>1,2</sup>, Philippe Bidet<sup>1,2</sup>, Stéphane Bonacorsi<sup>1,2\*</sup>

**1** Equipe d'accueil EA3105, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **2** Laboratoire de Microbiologie, AP-HP, Hôpital Robert Debré, Paris, France, **3** Genotyping of Pathogens and Public Health, Institut Pasteur, Paris, France

## Abstract

Recent isolation of the non-K1 *Escherichia coli* neonatal meningitis strain S286, belonging to phylogroup C, which is closely related to major group B1, and producing an extended-spectrum beta-lactamase, encouraged us to seek the genetic determinants responsible for its virulence. We show that S286 belongs to the sequence O type ST23<sub>O78</sub> and harbors 4 large plasmids. The largest one, pS286colV (~120 kb), not related to resistance, contains genes characteristic of a Conserved Virulence Plasmidic (CVP) region initially identified in B2 extra-intestinal avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains and in the B2 neonatal meningitis *E. coli* strain S88. The sequence of this CVP region has a strong homology (98%) with that of the recently sequenced plasmid pChi7122-1 of the O78 APEC strain Chi7122. A CVP plasmid-cured variant of S286 was less virulent than the wild type strain in a neonatal rat sepsis model with a significant lower level of bacteremia at 24 h ( $4.1 \pm 1.41$  versus  $2.60 \pm 0.16$  log CFU/ml,  $p = 0.001$ ) and mortality. However, the mortality in the model of adult mice was comparable between wild type and variant indicating that pS286colV is not sufficient by itself to fully explain the virulence of S286. Gene expression analysis of pS286colV in iron depleted environment was very close to that of pS88, suggesting that genes of CVP region may be expressed similarly in two very different genetic backgrounds (group C versus group B2). Screening a collection of 178 human A/B1 extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains revealed that the CVP region is highly prevalent (23%) and MLST analysis indicated that these CVP positive strains belong to several clusters and mostly to phylogroup C. The virulence of S286 is explained in part by the presence of CVP region and this region has spread in different clusters of human A/B1 ExPEC, especially in group C.

**Citation:** Lemaître C, Mahjoub-Messai F, Dupont D, Caro V, Diancourt L, et al. (2013) A Conserved Virulence Plasmidic Region Contributes to the Virulence of the Multiresistant *Escherichia coli* Meningitis Strain S286 Belonging to Phylogenetic Group C. PLoS ONE 8(9): e74423. doi:10.1371/journal.pone.0074423

**Editor:** Ulrich Dobrindt, University of Münster, Germany

**Received:** March 28, 2013; **Accepted:** August 1, 2013; **Published:** September 26, 2013

**Copyright:** © 2013 Lemaître et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by the "Fondation pour la Recherche Médicale" for CL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

*Escherichia coli* is an inhabitant of the intestines of warm-blooded animals but is also a major cause of extra-intestinal diseases such as urinary tract infection, septicemia and meningitis in human or colibacillosis in poultry [1]. In pathogenic *E. coli*, different combinations of acquired virulence genes are characteristic of different pathotypes [1]. The acquisition of virulence determinants occurs preferentially in defined genetic backgrounds, which may correspond to the different major phylogenetic groups composing the species [2,3].

Most human extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains belong to phylogenetic groups B2 and D, whereas strains belonging to groups A and B1 may be either commensal or intestinal pathogens and are rarely responsible for extraintestinal infections [3–7]. For instance, the prevalence of groups A and B1 is respectively 8% and 2% among neonatal bacteremia and

meningitis strains [3] and in a collection of 161 *E. coli* strains responsible for bacteremia in adults, rates of groups A and B1 were 20% and 7% respectively [8]. This contrasts with the prevalence of groups A and B1 among avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains which may reach 38–71% and 1.8–15.5% respectively, according to different studies [9–11]. ExPEC strains are characterized by several virulence factors, including adhesins, invasins, protectins and toxins, as well as several uptake systems for essential nutrients such as iron (iron-uptake systems) [12,13]. Most A and B1 ExPEC strains harbor fewer virulence factors and show lower experimental virulence than strains belonging to groups B2 and D [6,10].

Extraintestinal virulence genes are frequently clustered in chromosomal genomic regions acquired by horizontal transfer and termed pathogenicity islands, or on large plasmidic regions [14–16]. One such plasmidic region has been recently described in detail in several *E. coli* strains. Seven sequenced plasmids, one of human, five of avian and one from environmental origin were

# In Vitro Interaction between Cefixime and Amoxicillin-Clavulanate against Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infection

We read with interest the article by Campbell et al. (4) suggesting that the combination of clavulanate and oral expanded-spectrum cephalosporins (OESCs) could be an interesting therapeutic option for urinary tract infection (UTI) due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), for which no or few oral antibiotic compounds are available (4). However, among the OESCs tested in that study, cefdinir and cefpodoxime may not be the best options. Indeed, among the OESCs, cefixime has the lowest MICs and the best pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters for *E. coli* (9, 11). Even if the serum concentrations of all OESCs are low ( $C_{\max}$ , 1.5 to 4.5  $\mu\text{g/ml}$ ), the serum concentrations of free cefixime are estimated to be greater than the *E. coli* MIC<sub>90</sub> for more than 50% of the time (11). Furthermore, two randomized trials of oral cefixime versus sequential intravenous-oral antibiotic treatment for acute pyelonephritis in children supported the use of this compound for febrile UTI (2, 10). Here we tested *in vitro* the combination of cefixime and amoxicillin-clavulanate (AC) to assess whether this combination could be useful for UTI due to ESBL-producing *E. coli*.

The isolates tested in this study were 64 previously characterized *E. coli* strains harboring ESBL obtained from 2009 to 2011. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method and interpreted according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (5). Isolates were screened for ESBL production by the double-disk synergy test with an extended-spectrum cephalosporin (cefotaxime, ceftazidime) and AC (7). Multiplex PCR was used to characterize  $\beta$ -lactamase genes, including *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, and *bla*<sub>OXA-1</sub>, by previously described methods and primers and then sequencing (6). The MICs of cefixime and AC were determined by the Etest method (AB bioMérieux, Solna, Sweden). The Etest has also been used to evaluate the activity of the antimicrobial combination of cefixime and AC: for the evalu-

ation of synergy, one AC strip is placed on an agar plate for 1 h and then removed and a second cefixime strip is placed on top of the gradient of the first agent (1, 3, 12). The MIC of the combination was interpreted as the value at which the inhibition zone intersected the scale on the Etest strip. (Fig. 1). Synergy was evaluated by calculating the fractional inhibitory concentration index (1).

Table 1 presents the distribution of MIC<sub>50</sub>s and MIC<sub>90</sub>s of cefixime and AC and their combination according to ESBL, TEM-1, and OXA-1 genes. Among the 64 ESBL-producing *E. coli* isolates, 85% carried CTX-M genes and 15% carried TEM-52 or SHV-12 ESBL genes. With the combination, synergy was obtained for 60 out of 64 strains, additivity was obtained for 2 strains, and indifference was obtained for 2 strains. Results did not differ when cefixime was placed first and AC second.

Based on the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing breakpoint of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 93% of the ESBL-producing *E. coli* strains were resistant to cefixime alone (8). In contrast, the combination was active against more than 90% of these strains. The MIC<sub>50</sub> of the combination was 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , which was comparable to the MIC<sub>50</sub> for non-ESBL-producing *E. coli* (11).

Our study shows that AC can protect the activity of cefixime *in vitro* and the *in vitro* Etest can easily detect the synergy of these agents, which is practical for routine use in clinical laboratories. A simple approach would be to determine the MIC of the combina-

Published ahead of print 25 April 2012

Address correspondence to Edouard Bingen, edouard.bingen@rdb.aphp.fr.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00526-12

TABLE 1 Activities of cefixime and AC alone and together versus ESBL-producing *E. coli* according to  $\beta$ -lactamase gene content<sup>a</sup>

| ESBL group      | No. of isolates | Cefixime          |                   |          | AC                |                   |        | Cefixime-AC       |                   |           |
|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|-------------------|-----------|
|                 |                 | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | Range    | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | Range  | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | Range     |
| Overall         | 64              | 6                 | >64               | 0.50->64 | 4                 | 8                 | 1.5-24 | 0.25              | 0.75              | 0.09-24   |
| CTX-M-1         | 10              | 4                 | >64               | 1->64    | 4                 | 8                 | 3-24   | 0.25              | 0.38              | 0.09-16   |
| CTX-M-1, TEM-1  | 9               | 3                 | 8                 | 1.5-32   | 6                 | 6                 | 4-6    | 0.38              | 0.5               | 0.19-0.75 |
| CTX-M-3         | 1               |                   |                   | 64       |                   |                   | 6      |                   |                   | 25        |
| CTX-M-14        | 11              | 4                 | 8                 | 0.50-12  | 4                 | 6                 | 2->64  | 0.25              | 0.25              | 0.09-4    |
| CTX-M-14, TEM-1 | 5               | 2                 | 6                 | 0.50-8   | 4                 | 6                 | 4-6    | 0.19              | 0.25              | 0.09-0.50 |
| CTX-M-15        | 6               | >64               | >64               | 4->64    | 6                 | 12                | 3-12   | 0.38              | 0.5               | 0.25-0.50 |
| CTX-M-15, TEM-1 | 2               |                   |                   | 8->64    |                   |                   | 2-6    |                   |                   | 0.09-0.50 |
| CTX-M-15, OXA-1 | 5               | >64               | >64               | >64      | 8                 | 12                | 6-24   | 0.5               | 2                 | 0.38-24   |
| CTX-M-27, TEM-1 | 2               |                   |                   | 24->64   |                   |                   | 4-6    |                   |                   | 0.25-0.50 |
| CTX-M-32        | 2               |                   |                   | 32->64   |                   |                   | 4-24   |                   |                   | 0.50-2    |
| CTX-M-57        | 1               |                   |                   | >64      |                   |                   | 3      |                   |                   | 0.25      |
| TEM-52          | 5               | 1                 | 4                 | 0.50->64 | 2                 | 4                 | 1.5-24 | 0.09              | 0.19              | 0.09-12   |
| SHV-12          | 5               | 6                 | 12                | 4-16     | 3                 | 4                 | 2-4    | 0.19              | 0.25              | 0.19-0.38 |

<sup>a</sup> Values are in micrograms per milliliter. When the number of isolates is <5, only the range is given.