Bilan des activités 2011 du Centre Collaborateur de l'OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella*

A) Localisation du Centre

Le Centre Collaborateur de l'OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella* (CCOMS) est localisé à l'Institut Pasteur dans l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques dirigé par le Dr. François-Xavier Weill. Les responsables du CCOMS sont également responsables du Centre National Français de Référence des *Salmonella*.

B) Composition du centre

Responsable : Dr. François-Xavier Weill, MD, PhD

Responsable adjoint : Dr. Simon Le Hello, PhD, MSc

Collaboratrice principale : Mme Sylvie Issenhuth-Jeanjean, technicienne supérieure

C) Activités de référence en 2011

- ◆ Expertise de 228 souches de *Salmonella* provenant de 14 laboratoires nationaux de référence (France, Allemagne, Belgique, Irlande, Norvège, Suède, Danemark, Finlande, Bulgarie, Israël, Etats-Unis d'Amérique, Canada, Singapour, Nouvelle-Zélande)
- ◆ Identification de 13 nouveaux sérotypes et de 13 nouveaux variants de sérotypes connus. La confirmation se fait en collaboration avec deux autres laboratoires (National *Salmonella* Reference Laboratory, CDC, Atlanta, USA, Dr. Patricia Fields et Abteilung Mikrobiologischer Verbraucherschutz, Hygiene Institut Hamburg, Germany, Prof. Peter Roggentin)
- ◆ Expédition de 33 souches pour la production ou le contrôle d'antisérums pour le sérotypage vers les Etats-Unis d'Amérique, le Canada, l'Irlande, l'Italie et l'Australie.

D) Activités de soutien au programme Global Salm Surv de l'OMS

D)-1 Participation à l'organisation et ou à l'enseignement

Atelier OMS Global Foodborne Infections Network Level I, St-Petersburg, Russia, November 14-19, 2011 (2 conférences et travaux pratiques). Enseignant du CCOMS: FX Weill.

D)-2 Participation au contrôle de qualité externe pour le sérotypage (EQAS)

Le CCOMS contrôle les souches de l'EQAS.

Le CCOMS sert de "jump station" pour l'envoi des colis vers l'Afrique francophone: en 2011, 168 souches expédiées vers 11 laboratoires de 10 pays.

E) Activités de recherche

E)-1 Multi Locus Sequence Typing

Le CCOMS continue son inventaire de la biodiversité des *Salmonella* par la technique moléculaire de multilocus sequence typing (MLST). Il s'agit de déterminer après amplification génomique, la séquence de 7 gènes conservés (dits « de ménage »). Cette méthode pouvant être une alternative future au sérotypage permet également de comprendre les relations phylogénétiques entre sérotypes. Les données issues du MLST sont basées sur des séquences et sont donc facilement échangeables entre laboratoires ayant accès à cette technologie de plus en plus utilisée. Cette méthodologie est également utilisée lors de résultats de sérotypage difficilement analysables ou non-discriminants (souches rough, immobiles ou monophasiques).

A l'heure actuelle, 1977 souches (appartenant aux sous-espèces *enterica* [n=1473], *salamae* [n=203], *arizonae* [n=47], *diarizonae* [n=141], *houtenae* [n=66] et *indica* [n=14] de l'espèce *enterica* et à l'espèce bongori [n=33]) appartenant à 663 sérotypes ont été analysées par MLST. Les résultats ont été transférés sur le site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Cork (groupe de Mark Achtman). L'ensemble des sérotypes de *Salmonella* sera analysé au cours des prochaines années. Un premier travail sur 4257 souches appartenant à 554 sérotypes a été publié en 2012 (Achtman et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. Plos Pathogens 2012)

E)-2 Séquençage des gènes codant les flagellines

Le sérotypage classique étant basé sur l'analyse antigénique des facteurs somatiques O et des facteurs flagellaires H, le CCOMS continue une analyse extensive des séquences des gènes (*fliC* et *fljB*) codant pour les antigènes H. A l'heure actuelle, 936 souches ont été analysées simultanément pour leur contenu allélique des gènes *fliC* et *fljB* et pour leur type MLST.

E)-3 Mise au point d'une technique de typage/sous-typage des *Salmonella* en une seule étape par analyse des polymorphismes des loci CRISPR

Nous avons identifié des séquences nucléotidiques courtes (taille moyenne de 32 nucléotides), nommées spacers, au sein des 2 régions CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) du génome de *Salmonella* et qui sont corrélées avec le sérotype de la souche. Quand plusieurs souches d'un même sérotype étaient étudiées, la composition en spacers pouvait varier entre les souches (perte de certains spacers, acquisition de nouveaux) et cette variabilité au sein d'un même sérotype était concordante avec les méthodes traditionnelles de sous-typage (électrophorèse en champ pulsé, lysotypie).

Jusqu'à ce jour, nous avons inventorié l'ensemble de ces spacers chez 1000 souches de 300 sérotypes de *Salmonella* (dont les plus fréquents chez l'homme et dans l'industrie agroalimentaire). Plus de 6000 spacers différents ont été décrits. Un site web contenant la base de données a été créé en 2008 (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>).

Nous avons des contacts avec des industriels pour pouvoir développer un test de typage/sous-typage pour toutes les salmonelles en moins de 48 heures basé sur le polymorphisme des régions CRISPR par une méthode de séquençage à haut-débit de type ionPGM.

En attendant une première application sous forme d'un sous-typage à haut débit du sérotype Typhimurium (et de son variant monophasique) a été développée en utilisant la technique xMAP de Luminex. Cette méthode appelée CRISPOL permet de sous-typer 96 souches en une journée et avec une très grande facilité d'échange de résultats. A l'heure actuelle, 320 types CRISPOL ont été définis après typage de 3700 souches. Un premier travail d'inventaire des loci CRISPR sur 783 souches appartenant à 130 sérotypes et d'analyse CRISPOL de 2200 souches de Typhimurium a été publié en 2012 (Fabre et al.

CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. Plos One 2012).

E)-4 Participation à une étude de séquençage de génomes représentatifs des différentes populations de *S. enterica* sérotype Paratyphi A

Cette étude collaborative (Sanger Institute, Cork University, Institut Pasteur) a pour objectif de séquencer entièrement plus de 100 génomes de *S. enterica* sérotype Paratyphi A puis de définir un groupe de Single Nucleotide Polymorphisms permettant de réaliser une étude de génétique des populations sur une collection plus large de cette bactérie.

E)-5 Participation à une étude de séquençage de génomes représentatifs des différentes sous-espèces de *Salmonella*

Cette étude collaborative (Sanger Institute, Institut Pasteur) a pour objectif de séquencer entièrement 50 génomes de *Salmonella* appartenant à toutes les sous-espèces non-*enterica* puis de définir ces sous-espèces sur le plan génomique.

E)-6 Etude des mécanismes émergents de résistance aux antibiotiques

De nombreuses études d'analyse des populations bactériennes et de leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques sont menées au CCOMS. Notre attention se porte principalement sur les *Salmonella* résistantes aux traitements de première intention (céphalosporines de 3^{ème} génération, carbapénèmes et quinolones).

E)-6 Publications scientifiques des responsables du CCOMS en 2011 sur les *Salmonella*

1. **Le Hello S**, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Nielsen EM, Whichard JM, Bouchrif B, Fashae K, Granier SA, Jourdan-Da Silva N, Cloeckert A, Threlfall EJ, Angulo FJ, Aarestrup FM, Wain J, **Weill FX**. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. **Journal of Infectious Diseases**. 2011;204(5):675-84.
2. Holt KE, Phan MD, Baker S, Duy PT, Nga TV, Nair S, Turner AK, Walsh C, Fanning S, Farrell-Ward S, Dutta S, Kariuki S, **Weill FX**, Parkhill J, Dougan G, Wain J. Emergence of a globally dominant IncHI1 plasmid type associated with multiple drug resistant typhoid. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2011 Jul;5(7):e1245.
3. **Accou-Demartin M**, Gaborieau V, Song Y, Roumagnac P, Marchou B, Achtman M, **Weill FX**. *Salmonella enterica* Serotype Typhi with nonclassical quinolone resistance phenotype. **Emerging Infectious Diseases**. 2011 Jun;17(6):1091-4.
4. Bugarel M, Granier SA, **Weill FX**, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **BMC Microbiology**. 2011;11:151.
5. Moissenet D, **Weill FX**, Arlet G, **Harrois D**, Girardet JP, Vu-Thien H. *Salmonella enterica* serotype Gambia with CTX-M-3 and armA resistance markers: nosocomial infections with a fatal outcome. **Journal of Clinical Microbiology**. 2011;49(4):1676-8.

6. **Pardos de la Gándara M**, Seral C, Castillo García J, Rubio Calvo C, **Weill FX**. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragossa, Spain (2001-2008). **Microbial Drug Resistance**. 2011;17(2):207-13.
7. Thiolet JM, Jourdan-Da Silva N, Reggiani A, De Valk H, Coignard B, **Weill FX**. Nationwide pseudo-outbreak of *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*, France. **Clinical Microbiology and Infection**. 2011;17(6):915-8.