



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Laboratoire associé au CNR
Clostridioides difficile



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

* *
* *

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2021 Année d'exercice 2020

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme
Nadine DELARUE, Laure DIANCOURT, Julie GERMOND, Christelle MAZUET, Jean SAUTEREAU

Laboratoire associé *Clostridioides difficile*
Frédéric BARBUT, Jeanne COUTURIER, Cécile GATEAU, Killian LE NEINDRE

Juin 2021

SOMMAIRE

Résumé analytique (version française)	6
Résumé analytique (version anglaise).....	7
<u>LIVRE I RAPPORT ANNUEL DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME.....</u>	8
1- MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME.....	9
2- ACTIVITES D'EXPERTISE	9
2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2020	10
2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	10
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	10
2-4 Collections de matériel biologique	10
2-5 Activités d'expertise	10
2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis <i>Clostridioides difficile</i>)..	10
2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme	11
2-6 Activités de séquençage génomique (WGS, NGS...).....	12
2-6-1 Accès aux plateformes de séquençage de l'Institut Pasteur	12
2-6-2 Accès à une expertise bio-informatique	12
2-6-3 Appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique.....	13
2-6-4 Stockage et dépôt des données brutes	13
3- ACTIVITES DE SURVEILLANCE	13
3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	13
3-1-1 Surveillance du botulisme.....	13
3-1-1-1 Réseau de partenaires.....	13
3-1-1-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du botulisme.....	14
3-1-1-3 Botulisme agro-alimentaire et environnemental	16
3-1-1-4 Botulisme animal.....	17
3-1-2 Surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis <i>Clostridioides difficile</i>)17	17
3-1-2-1 Souches d'origine humaine.....	17
3-1-2-2 Souches d'origine vétérinaire.....	19
3-1-2-3 Souches d'origine alimentaire.....	19
3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (hormis <i>Clostridioides difficile</i>).....	20
3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	23
3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisée	23
4- ALERTE.....	23
5- ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	24
5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	24
5-1-1 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé.....	24
5-1-2 Activités de conseils aux professionnels de santé	24
5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	24
5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public)	24
6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR. 24	24
6-1 Activités de recherche	24
6-1-1 Activités de recherche sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i>	24
6-1-2 Activités de recherche sur les bactéries anaérobies.....	26

6-2 Publications et communications 2020	28
6-2-1-1 Publications nationales	28
6-2-1-2 Publications dans des revues internationales à comité de lecture	28
6-2-1-3 Congrès, workshops, séminaires.....	28
7- COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	28
8- PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2021-2022	30
8-1 Bactériologie anaérobie	30
8-1-1 Expertise en bactériologie anaérobie	30
8-1-1-1 Identification et typage des souches de bactéries anaérobies	30
8-1-1-2 Typage toxinique des souches de bactéries anaérobies.....	30
8-1-1-3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies notamment Bacteroides du groupe fragilis.....	31
8-1-1-4 Description d'une nouvelle espèce apparentée à Clostridium chauvoei.....	31
8-1-1-5 Projet FED-AMR: The role of free extracellular DNA in dissemination of antimicrobial resistance over ecosystem boundaries along the food/feed chain.....	31
8-1-1-6 Projet ClostAbat : Characterization of the Clostridium perfringens and Clostridium difficile hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses »	32
8-2 Botulisme	32
8-2-1 Diagnostic du botulisme	32
8-2-2 Reconstitution des stocks de sérums neutralisant les toxines botuliques.....	33
8-2-3 Développement de nouvelles méthodes de mise en évidence et de caractérisation des toxines botuliques	33
9- TABLEAUX.....	34
10- ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	44
10-1 Missions et objectifs majeurs	44
10-2 Equipe	44
10-3 Locaux et équipements	44
10-3-1 Locaux	44
10-3-2 Equipements	46
10-4 Collections de matériel biologique	46
10-5 Démarche qualité	47
11- ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	49
11-1 Liste des techniques de référence	49
11-2 Collection de souches et sérums de référence	49
12- ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS.....	51
12-1 Permanence du CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme	51
12-2 Autorisation MOT	51
12-3 Autorisations d'exercer la biologie médicale	51
12-4 Résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo	51
12-5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N	51
12-6 Autres remarques à destination du comité des CNR	52
<u>LIVRE II RAPPORT ANNUEL DU LABORATOIRE ASSOCIE <i>Clostridium difficile</i></u>	<u>53</u>
1- Missions et organisation du CNR	54
2- Activités d'expertise.....	54
2-1 Évolutions des techniques	55
2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	55

2-3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	55
2-4	Collections de matériel biologique	55
2-5	Activités d'expertise	55
2-6	Activités de séquençage	56
3-	Activités de surveillance.....	56
3-1	Description du réseau de partenaires	57
3-2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	57
3-3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	64
3-4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	65
3-4-1	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France	65
3-4-2	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens.....	66
3-4-3	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	66
4-	Alerte.....	67
5-	Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	67
5-1	Conseil et expertise aux professionnels de santé	67
5-1-1	Enseignements sur <i>Clostridioides difficile</i>	67
5-1-2	Activités de formations continues	68
5-1-3	Stagiaires accueillis	68
5-1-4	Liste des guides élaborés	68
5-1-5	Modalités et cibles de diffusion.....	69
5-2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	70
5-3	Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	70
6-	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	70
6-1	Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	70
6-1-1	<i>Clostridium difficile</i> chez les enfants prématurés : relations avec le microbiote intestinal.....	70
6-1-2	Etude COMBACT-CDI : Etude COMBACT-CDI (Combating Bacterial Resistance in Europe- <i>Clostridium difficile</i> infections) relative à l'épidémiologie des infections à <i>C. difficile</i> et leur impact clinique en Europe.	71
6-1-3	Evaluation du test Solana et Sophia (Quidel) pour la détection des souches toxigènes de <i>C. difficile</i>	72
6-1-4	Evaluation multicentrique du Revogene (GenePOC).....	73
6-1-5	Evaluation de la dissémination environnementale de <i>C. difficile</i> à partir des toilettes.....	73
6-1-6	Effet du rayonnement UV-C généré par des lampes au xénon sur les spores de <i>C. difficile</i> et les BHRé.....	74
6-1-7	Etude DAFNE : Observatoire de l'utilisation de la fidaxomicine en France	75
6-1-8	Impact de la cellulose microcristalline sur le diagnostic des infections à <i>C. difficile</i>	75
6-2	Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	76
6-2-1	Publications nationales	76
6-2-2	Publications internationales	76
6-2-3	Communications nationales	77
6-2-4	Communications internationales.....	77
6-2-5	Conférences sur invitations	78
7-	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	78

7-1-1	Collaboration, Dr Le Maréchal, ANSES Laboratoire de Ploufragan : Projet DiaBloClo : Caractérisation de souches de <i>C. botulinum</i> et <i>C. difficile</i> au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.....	78
7-1-2	Collaboration avec l'Unité SBCL, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments (ANSES, Olivier Firmesse) et l'Unité HQPAP, laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Dr LeMaréchal) Projet DIFALIBO	79
7-1-3	Soumission d'une ANR par le Dr O. FIRMESSE (département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments) : projet CLOSTABAT (« Characterization of the <i>Clostridium perfringens</i> and <i>Clostridium difficile</i> hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses »).....	80
7-1-4	Projet de thèse de sciences avec le Dr Poquet Isabelle (Institut Micalis, INRAe, Domaine de Vilvert, Bât 442, 78352 Jouy-en-Josas Cedex) sur : « <i>Clostridioides difficile</i> chez les Equidés : rôle des biofilms dans la colonisation, le portage asymptomatique ou la virulence, et la persistance des infections » (CLODIFFEQUI).....	80
8-	Programme d'activité pour les années 2021-2022	81
8-1	Apport du whole genome sequencing (WGS) dans la compréhension de l'épidémiologie des infections à <i>Clostridium difficile</i>.	81
8-2	Etude CLOCIDIA	82
8-3	Mise au point et apport du typage CRISPR à l'étude épidémiologique de <i>C. difficile</i> (collaboration avec O. Soutourina, I2BC UMR 9198, Université Paris -Saclay)	83
8-4	Portage asymptomatique de <i>C. difficile</i> : prévalence, facteurs de risque et relations avec le microbiote intestinal (Collaboration avec B. Dupuy, Institut Pasteur).	83
9-	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	85
9-1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	85
9-2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	85
9-3	Locaux et équipements	85
9-4	Collections de matériel biologique	87
9-5	Démarche qualité du laboratoire	87
10-	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	88
10-1	Liste des techniques de référence	88
10-2	Liste des techniques recommandées par le CNR	88
11-	Annexe 3 : Autres informations	89
11-1	Permanence du CNR	89
11-2	Autorisations MOT	89
11-3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	89
11-4	Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	89
11-5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition des budgets MIGAC ou Santé publique France (texte libre)	89
11-6	Autres remarques à destination du comité des CNR (texte libre)	89

DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET Christelle MAZUET.....

DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET Frédéric BARBUT.....

RESUME ANALYTIQUE (VERSION FRANÇAISE)

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

En 2020, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 119 échantillons de sérum, 111 selles et 14 échantillons alimentaires. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année reste classique malgré le contexte sanitaire lié à la crise Covid : 7 foyers confirmés (et 2 foyers très suspects) de botulisme impliquant 11 patients (et 8 cas suspects) ont été identifiés. 17 patients ont été hospitalisés dont 8 en service de réanimation.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (5 foyers confirmés sur 7, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 2 foyers suspects bien que non confirmés).

Deux foyers (2 cas) de botulisme infantile (1 type A et un type Bf) ont également été identifiés.

Une suspicion clinique (1 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection IM de toxine botulique pour le traitement d'une malformation chez un enfant de 13 ans n'a pas été confirmée biologiquement.

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (4 foyers sur 5 dont un type Bf). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour deux foyers uniquement.

En 2020, 153 souches ou prélèvements primaires pour recherche de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR. Les 114 souches d'origine humaine identifiées se répartissent en 21 genres différents, 40 espèces nommées et 1 souche représentant une nouvelle espèce potentielle. Bien que les bactéries anaérobies restent en général sensibles aux traitements antibiotiques, le suivi de l'évolution de la résistance effectué par le CNR confirme que certaines espèces (particulièrement les *Bacteroides* du groupe *fragilis*) sont de plus en plus résistantes notamment aux bêta-lactamines incluant les carbapénèmes.

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

Au cours de l'année 2020, **345** prélèvements ont été reçus par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 262 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxigènes ; 5,1% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 2 autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 14/020/077 (11,7%) et le 078/126 (7,6%).

L'année 2020 a été marquée par une stabilisation du nombre de souches 027 épidémiques reçues par le CNR. Les 6 souches épidémiques provenaient de 5 départements.

RESUME ANALYTIQUE (VERSION ANGLAISE)

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

In 2020, the CNR proceeded to the biological diagnosis of human botulism from 119 serum, 111 stools and 14 food samples. The number of outbreaks and cases of botulism observed in France this year remains classic despite the Covid crisis: 7 confirmed outbreaks (and 2 suspicious ones) of botulism involving 11 patients (and 7 suspected cases) have been identified. 17 patients were hospitalized including 8 in intensive care unit. Food-born botulism remains the most common form (5 out of 7 confirmed outbreaks, and strong suspicion of a food origin for 2 suspected although unconfirmed). Two outbreaks (2 cases) of infant botulism (1 type A and 1 type Bf) have also been identified. A clinical suspicion (1 case) of iatrogenic type A botulism following IM injection of botulinum toxin for the treatment of a malformation in a 13-year-old child has not been biologically confirmed.

As usual in France, most of the food-born outbreaks were of type B (4 out of 5 outbreaks). The contaminated food could be confirmed for only two outbreaks.

In 2020, 153 strains or primary samples for testing for anaerobic bacteria were recorded by the NRC. The 114 strains of human origin identified fall into 21 different genera, 40 named species and 1 strain representing a potential new specie.

Although anaerobic bacteria remain generally sensitive to antibiotic treatments, the monitoring of the evolution of resistance carried out confirms that certain species (particularly *Bacteroides* of the *fragilis* group) are increasingly resistant, in particular to beta-lactams including carbapenems.

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

In 2020, **345** samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 262 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 5.1% were identified as PCR-ribotype 027. The 2 other predominant PCR-ribotypes were 014/020/077 (11.7%) and 078/126 (7.6%).

This year was marked by a stabilization in the number of epidemic 027 strains received by the NRL. Only 6 epidemic strains from 5 departments have been characterized.

LIVRE I

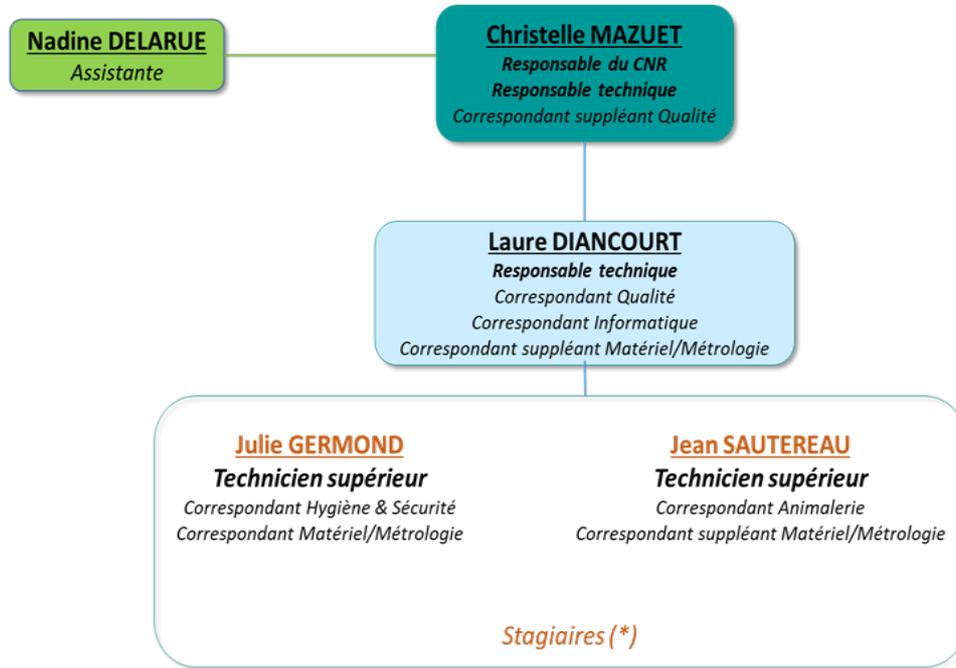
CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



1-MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME

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

Organigramme 2020 du CNR



MOT : les personnes dont le nom est souligné sont habilitées MOT
 (*) manipulation de MOT (après autorisation délivrée par l'ANSM) sous le contrôle du détenteur de l'autorisation MOT et selon le thème du travail.

2-ACTIVITES D'EXPERTISE

Éléments clefs de l'année 2020 en termes de production d'expertise

- > Nombre classique de foyers/cas de botulisme humain malgré le contexte sanitaire.
 Les données du CNR sont en adéquation avec les DO de SpF.
 Pas de défaut de remontée de signalement lié à la crise Covid.
 - > 2 TIAC à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus* en collectivité militaire en janvier 2020 et en EHPAD en février 2020 (vs 12 en 2019) :
 Effet crise Covid-19 ? (Signaux non remontés et/ou absence de TIAC ?)
 - > 114 souches d'origine humaine reçues en 2020 (vs 217 en 2019 soit une diminution de 47%) :
 Effet crise Covid-19 ?
- NB : en 2019, 95 souches et prélèvements analysées en lien avec la TIAC de l'EHPAD de Lherm)

Les descriptions des techniques et marqueurs disponibles sont présentées en **annexe 2**.

2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2020

N/A

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

Sans objet

2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

2-4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**

2-5 Activités d'expertise

2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés en 2020 sont donnés dans le tableau suivant :

ORIGINE	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
Humaine	114 (124)
Vétérinaire	13 (14)
Alimentaire	12
Environnementale	1
Autres (collection, industrielle, recherche...)	2
TOTAL	142 (153)

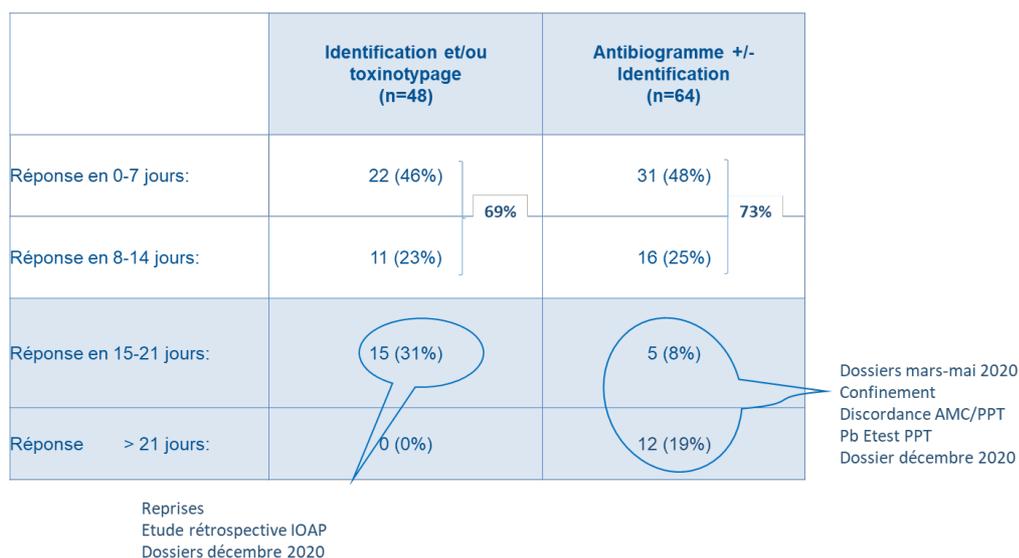
Soit un nombre équivalent de **souches isolées** envoyées par les laboratoires de biologie médicale par rapport aux années précédentes (141 en 2019 et 128 en 2018) malgré le contexte sanitaire lié au covid-19.

Contrairement aux années précédentes et fort probablement du fait de l'épidémie de Covid, le CNR a par contre été très peu sollicité en 2020 en première intention pour orienter, identifier et isoler des germes anaérobies à partir de **prélèvements primaires** humains dans le cadre de TIAC : 10 prélèvements de ce type reçus en janvier et février 2020 (contre 76 en 2019, 73 en 2018 et 16 en 2017).

Le CNR s'est fixé pour objectif de rendre les résultats d'identification, de toxinotypage et/ou d'antibiogramme des souches humaines dans un délai maximum de 15 jours. Pour 2020, le détail du délai de rendu de résultats écrits figure dans le tableau ci-dessous.

Délais de rendu de résultats écrits:

SOUCHES HUMAINES (n=112)



2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2020 est le suivant:

Botulisme humain		
	sérums (recherche de toxine botulique)	119
	selles (recherche de toxine botulique et de <i>Clostridium botulinum</i>)	111
	sérums (recherche d'anticorps neutralisants les toxines botuliques)	4
Echantillons agro-alimentaires		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	12
	autres	64
Echantillons environnementaux		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	0
	autres	20
Botulisme animal		
	échantillons biologiques	82
Echantillons d'aliment pour animaux		
	échantillons	104
Essais Inter Laboratoires		5
TOTAL		521

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

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

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

L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

En 2020, le CNR a ainsi séquençé le génome complet de la totalité des souches de bactéries anaérobies non MOT reçues ou isolées, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (*ie* séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60...* en plus des tests standards de bactériologie anaérobie). L'objectif de séquencer l'intégralité des souches de bactéries anaérobies reçues au CNR a donc été atteint cette année. Les délais d'obtention et d'analyse des séquences ne sont cependant pas toujours compatibles avec les besoins des cliniciens si bien que nous continuons de recourir régulièrement aux techniques de PCR classiques pour l'identification et le toxinotypage.

Cas particulier du séquençage des Microorganismes et Toxines (MOT) : *Clostridium botulinum*, étant classé dans la liste I des MOT soumis à réglementation, le séquençage de son génome ne peut être réalisé que sur une plate-forme dont les locaux, l'activité sur le MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. C'était le cas jusqu'en 2018 de la Plate-Forme 1 – Génomique du pôle Biomics de l'Institut Pasteur et pour *Clostridium botulinum*. La technologie utilisée était également de type Illumina avec accès à différentes machines : MiSeq, NextSeq 500, HiSeq. Les librairies ont été réalisées avec le kit TruSeq PCRfree (Illumina). Cette collaboration comprenait également l'analyse bio-informatique : extractions du gène de la neurotoxine, des gènes des protéines associées aux complexes botuliques ainsi que des gènes de maison permettant d'établir le profil MLST de la souche et d'analyser sa variabilité génétique.

Depuis 2018, cette plateforme ayant emménagé dans de nouveaux locaux avec de nouveaux personnels, l'autorisation de l'ANSM n'était plus valable et cette nouvelle structure « OMICS » n'a pas fait le choix de déposer un dossier auprès de l'ANSM pour obtenir l'autorisation de séquencer des MOT. Une solution a été trouvée en 2019 auprès du pôle de génotypage de la CIBU. Des premiers génomes de *Clostridium botulinum* ont été séquençés avec succès, des ajustements du pipeline d'analyses bio-informatiques sont encore nécessaires.

2-6-2 Accès à une expertise bio-informatique

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNRs, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les

hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié.

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

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

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

En 2020, 37 souches de *Clostridium botulinum* (12 isolées en 2018, 18 en 2019 et 7 en 2020) ont ainsi pu être séquencées par le PGP de la CIBU (cf. 2-6-1).

Nous avons également régulièrement recours au séquençage génomique de souches de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et *Bacillus cytotoxicus* dans le cadre d'investigations de TIAC.

2-6-4 Stockage et dépôt des données brutes

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

3-ACTIVITES DE SURVEILLANCE

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

3-1-1 Surveillance du botulisme

Éléments clefs de l'année 2020 en termes de surveillance du botulisme

Nombre classique de foyers/cas de botulisme humain malgré le contexte sanitaire.

Les données du CNR sont en adéquation avec les DO de SpF.

Pas de défaut de remontée de signalement lié à la crise Covid.

3-1-1-1 Réseau de partenaires

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

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

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

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

◆ **Analyse des cas de botulisme humain en 2020**

En 2020, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 119 échantillons de sérum, 111 selles et 14 échantillons alimentaires. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 7 foyers confirmés (et 2 foyers très suspects) de botulisme impliquant 11 patients (et 8 cas suspects) ont été identifiés. 17 patients ont été hospitalisés dont 8 en service de réanimation.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (5 foyers confirmés sur 7, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 2 foyers suspects bien que non confirmés).

Deux foyers (2 cas) de botulisme infantile ont également été identifiés.

Une suspicion clinique (1 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection IM de toxine botulique pour le traitement d'une malformation chez une enfant de 13 ans n'a pas été confirmée biologiquement.

Un bilan du nombre de foyers et cas des 10 dernières années est synthétisé dans le tableau ci-dessous :

Année	Foyers (cas) déclarés
2020	7 (11)
2019	9 (11)
2018	7 (11)
2017	3 (4)
2016	11 (20)
2015	14 (22)
2014	4 (11)
2013	11 (19)
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (4 foyers sur 5). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour deux foyers uniquement : il s'agissait d'une conserve artisanale de foie gras et d'un pesto de fabrication familiale. Les aliments suspectés dans les 3 autres foyers confirmés étaient également des préparations familiales ou artisanales.

Description détaillée des foyers (Tableau 4-Chapitre 9)

- un foyer (2 cas) pour lequel la présence de toxine botulique *botulinum* de type B a été mise en évidence dans les sérums des deux patients (1 père hospitalisé en réanimation et son fils de 9 ans avec des symptômes plus légers). Les recherches de toxine botulique et de *Clostridium botulinum* dans les selles réceptionnées uniquement pour l'adulte étaient négatives (12 jours après le début des

symptômes). L'analyse d'un pot de miel artisanal d'origine serbe s'est également révélée négative. La consommation de salaisons serbes de préparation familiale serait plus probablement à l'origine de ces cas sans qu'aucune analyse n'est pu être réalisée sur ces charcuteries, en absence de restes disponibles.

- un foyer familial (3 cas dont 1 grave) de type B lié à la consommation d'une conserve artisanale de foie gras d'oie contenant une quantité très élevée de toxine botulique (20 000 DL/g). Le diagnostic biologique de botulisme a été confirmé à partir du sérum et/ou selles des 3 patientes. Des souches de *Clostridium botulinum* de type B4 ont été isolées à partir des selles de 2/3 cas ainsi que du foie gras contaminé. Cette observation est assez inhabituelle, les foyers de type B4 étant en France généralement associés à la consommation de charcuteries à base de porc (jambons crus, saucissons...).

- un foyer (1 cas) de type B pour lequel la présence de *Clostridium botulinum* de type B2 a été mise en évidence dans les selles du patient. Il n'a pas été détecté de toxine botulique ni dans le sérum ni dans les selles. L'aliment suspecté d'être à l'origine de ce cas est une conserve artisanale de "Boles de Picolat » (haricots blancs, viande hachée de bœuf, de veau et de porc, œufs, ail, persil, oignons, tomates, carottes, olives vertes, cèpes séchés) achetée chez un traiteur ; il n'y avait cependant pas de reliquat du plat disponible pour confirmation et aucune non-conformité n'a été identifiée par la DDPP lors de l'inspection du producteur de ces conserves.

- un foyer (2 cas) confirmé par la présence de toxine botulique de type A dans le sérum des deux patientes. Les analyses réalisées à partir des selles n'ont pas été contributives et il ne restait pas de pâté en bocal d'origine artisanale à analyser, seul aliment à risque identifié au cours de l'enquête alimentaire. Les deux cas ont développé des symptômes légers (ataxie, ptosis, diplopie) rapidement résolutifs qui seraient vraisemblablement passés inaperçus ou mésinterprétés chez une personne isolée.

- 1 foyer (1 cas) pour lequel la présence de toxines botuliques de type B (200 DL/g) et F (20 DL/g) et de *Clostridium botulinum* bivalent Bf a été révélée dans une sauce pesto de préparation familiale consommée par une jeune enfant de 9 ans. Une souche de *Clostridium botulinum* de type Bf a également été isolée des selles du cas ; il n'a pas été détecté de toxine botulique circulante ou préformée dans les selles. Les derniers foyers de botulisme alimentaire de type Bf remontent à 2011 et étaient liés à la consommation de tapenades d'olives vertes. Deux cas de botulisme infantile de type Bf ont également été diagnostiqués en 2013.

- Le botulisme alimentaire a été fortement suspecté cliniquement dans 2 foyers (3 cas), mais n'a pas été confirmé biologiquement par la présence de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* dans les sérums et/ou les prélèvements de selles et alimentaires. De nombreuses conserves dont des sardines périmées dans un premier foyer (1 cas grave) et également une conserve industrielle de sardines pour le second foyer (2 cas) ont été considérés comme potentielle source contaminante. Pour ce dernier foyer, un *Bacillus cereus* possédant les gènes des toxines diarrhéiques (Nhe) et émétique (ces) a été isolé d'un plat de lentilles retrouvé dans le réfrigérateur des patientes sans qu'elles se souviennent de la date de consommation.

Il faut souligner cette fois encore et pour la troisième année consécutive, une suspicion clinique de botulisme iatrogène consécutive à l'injection IM de toxine botulique pour le traitement d'une malformation chez une enfant de 13 ans. La toxine botulique n'a pas été retrouvée dans le sérum de la patiente.

Les deux cas de botulisme infantile diagnostiqués en 2020 ont concernés deux petites filles de 2 mois l'une colonisée par un *Clostridium botulinum* de type A1(B) et l'autre de type Bf. La première enfant était strictement allaitée par sa mère, sans information sur la consommation de miel ou de tisanes, ni d'éventuels travaux dans l'environnement proche. Les échantillons de miel, lait en poudre et eau consommés par le deuxième cas étaient tous négatifs. L'analyse du pot de miel a révélé la présence de nombreuses spores de bactéries anaérobies ; un *Clostridium sporogenes* (espèce non neurotoxigène apparentée à *Clostridium botulinum*) et un *Clostridium perfringens* ont notamment été isolés, confirmant le potentiel danger de la consommation de cet aliment par les jeunes enfants. La notion de gros travaux en cours (immeuble en construction) proche du domicile

ayant été évoquée par la famille, une potentielle origine environnementale de ce cas peut être suspectée. L'origine de ces cas, comme la majorité des cas de botulisme infantile, reste cependant inexplicée. Des investigations environnementales autour des cas de botulisme infantile seraient utiles et précieuses pour mieux comprendre le mode de contamination de ces enfants.

Un troisième cas de botulisme infantile a été suspecté chez un petit garçon d'un mois nourrit artificiellement et hospitalisé en réanimation sous ventilation assistée pour des malaises récidivants d'allure obstructive haute sur probables troubles de la déglutition. Il n'a pas été retrouvé de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* dans les selles de l'enfant mais du *Bacillus cereus* possédant les gènes des toxines diarrhéiques (Nhe) et émétique (ces).

Diagnostic différentiel des affections avec un tableau de paralysie flasque et/ou de troubles dysautonomiques

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

En 2020, 16 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Lambert-Eaton, Miller Fisher), de polyradiculonévrites ou de myasthénies. A la suite de nos résultats négatifs en identification de botulisme et évoquant une autre origine des paralysies et diminution des sécrétions (origine auto-immune ou autre), les analyses complémentaires menées par les laboratoires demandeurs permettent de confirmer un diagnostic autre. Cette année, une seule demande d'analyse de botulisme nous a été adressée dans le cadre d'une recherche de causes de mort inexplicée du nourrisson (vs 5 en 2019, 10 en 2018 et 9 en 2017). Cette analyse s'est à nouveau révélée négative (Tableau 5 – chapitre 9).

Recherche et titrage d'anticorps anti-toxine botulique A

La toxine botulique, essentiellement le type A, est largement utilisée dans le traitement de certaines affections neurologiques comme les dystonies. Certains sujets deviennent non-répondeurs à la toxine botulique par développement d'anticorps neutralisants (Tableau 10 – chapitre 9).

4 échantillons de sérum ont été analysés en 2020 ; aucun n'était neutralisant de la toxine botulique de type A.

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

Des échantillons d'aliments nous sont adressés dans le cadre de foyers avérés ou suspects de botulisme humain. Ces échantillons nous sont envoyés par les agents chargés des enquêtes d'hygiène alimentaire pour le compte des Agences Régionales de Santé et Directions Départementales de la Protection des Populations ou parfois sur réquisition de la Préfecture de Police ou du Tribunal lors d'enquête judiciaire. Occasionnellement, nous recevons des échantillons alimentaires ou environnementaux de la part d'industriels pour des contrôles de fabrication ou d'enquêtes sur le botulisme animal. Les résultats sont présentés aux Tableaux 6 à 9 – Chapitre 9. Seul un prélèvement environnemental réalisé dans le cadre d'une investigation de foyers récurrents de botulisme aviaire au Portugal s'est révélé positif pour *Clostridium botulinum* de type C/D.

3-1-1-4 *Botulisme animal*

Le diagnostic du botulisme animal est généralement réalisé par les laboratoires vétérinaires départementaux ou régionaux ainsi que par le Laboratoire National de Référence (LNR) du botulisme aviaire de Ploufragan (ANSES) avec lequel nous collaborons étroitement. Les demandes d'analyse de botulisme animal que nous recevons proviennent de laboratoires vétérinaires départementaux ou privés et concernent essentiellement des confirmations d'examen réalisés en première intention, de typage de botulisme ou d'analyses de foyers et de cas litigieux en soutien au LNR. Notre rôle consiste principalement en une activité d'expertise basée sur des confirmations ou infirmations de premières analyses et de typage de botulisme. Les analyses concernant le botulisme animal sont résumées au Tableau 11 – Chapitre 9

Botulisme bovin. Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2020, un total de 44 échantillons (foie, rumen, contenu intestinal) représentant 10 foyers ont été analysés. Le botulisme de type mosaïque D/C a été confirmé dans 1 unique foyer.

Botulisme des oiseaux sauvages. Chaque année en France et dans toute l'Europe occidentale, les oiseaux sauvages, en particulier les canards et autres oiseaux aquatiques, paient un lourd tribut au botulisme, essentiellement en saison chaude et sèche. En 2020, 16 échantillons représentant 6 foyers ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 4 foyers (dont un au Portugal). Les souches de *Clostridium botulinum* des oiseaux sauvages correspondent toutes au type mosaïque C/D (incluant le foyer portugais), c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D (Tableau 11). Les souches de *Clostridium botulinum* mosaïque C/D sont distinctes de celles de type D/C retrouvées chez les bovins. Une contamination croisée entre les deux espèces ou une source environnementale commune aux deux espèces semble donc peu probable.

Botulisme des oiseaux d'élevage. Le botulisme est également fréquent dans les élevages industriels de volailles (poulets, dindes, canards...). Outre les pertes économiques, parfois très importantes en élevage, le botulisme aviaire représente un risque de santé humaine. Le CNR n'intervient maintenant que très rarement pour le diagnostic des oiseaux d'élevage, celui-ci étant assuré par le LNR. En 2020, 4 échantillons provenant de 3 élevages ont été analysés. Le botulisme n'a été confirmé pour aucun.

3-1-2 *Surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis Clostridioides difficile)*

Éléments clefs de l'année 2020 en termes de surveillance des infections à bactéries anaérobies (Hormis Clostridioides difficile)

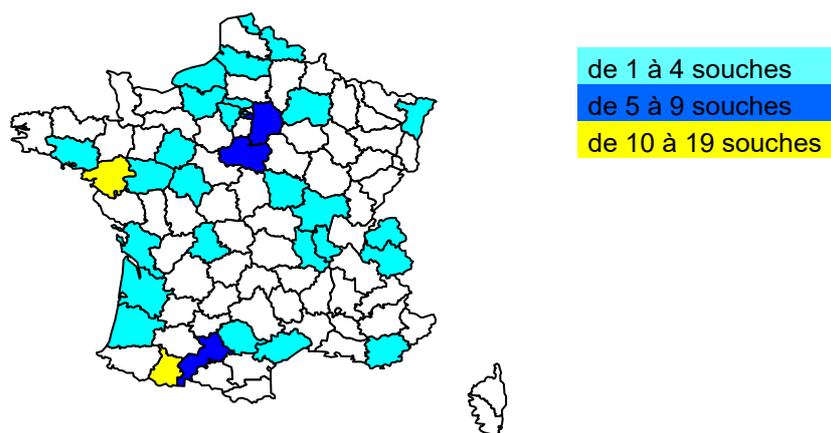
> 2 investigations de TIAC à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus* en collectivité militaire (janvier 2020) et en EHPAD en février 2020 (vs 12 en 2019) :
Effet crise Covid-19 ? (Signaux non remontés et/ou absence de TIAC)

> 114 souches d'origine humaine reçues en 2020 (vs 217 en 2019 soit une diminution de 47%) :
Effet crise Covid-19 ?

NB : en 2019, 95 souches et prélèvements analysées en lien avec la TIAC de l'EHPAD de Lherm)

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

L'origine géographique des demandes d'identification de souches d'origine humaine parvenues au CNR en 2020 est présentée ci-dessous.



Trente-trois départements métropolitains ont envoyé 124 souches isolées ou prélèvements primaires d'origine humaine au CNR. Les départements ultra-marins envoient également des souches régulièrement pour identification, toxinotypage ou antibiogramme (12 souches envoyées par les DROM et COM).

Les caractéristiques des patients pour lesquels le CNR a reçu une souche ou un prélèvement biologique sont décrits dans le tableau suivant :

	Hommes	Femmes	Total
N	59	65	124
Sexe ratio H/F			0,91
	Age (ans)		
Moyenne	56	61	59
Médiane	64	70	66,5
Intervalle	0-99	0-90	0-99

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

La distribution selon les sites d'infections des souches de bactéries anaérobies est présentée dans le tableau ci-dessous :

LOCALISATION	FREQUENCE
Hémoculture	37
Coproculture	32
Infection ostéo-articulaire	17
Infections cutanées et musculaires (abcès, suppurations, gangrènes)	10
Infection intra-abdominale	5
Gynécologie	3
Appareil digestif	2
Infection ORL (amygdale, sinus, etc...)	2
Urologie/néphrologie	2
Appareil respiratoire	1
Stomatologie	1
Système nerveux central	1
Non précisé	1
Total	114

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement d'hémoculture (37), de coprocultures (32) et d'infections ostéo-articulaires (17). Le reste des souches provenaient de différentes localisations : abcès, pus, plaies et autre infections cutanées et musculaires, infections intra-abdominales, gynécologie ...

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté avec 54/114 souches soit 47,4% suivi du genre *Bacteroides* (31/114=27,2%) – cf Tableau 1 (chapitre 9)

Au total les 114 souches identifiées se sont réparties en 21 genres différents de bactéries anaérobies.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 1 chapitre 9. Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage et/ou caractérisation de la pathogénicité.

Séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) et des génomes complets

Le CNR reçoit de plus en plus souvent des souches étiquetées « échec MALDI-TOF » pour une identification précise notamment par séquençage de l'ARNr 16S. Le CNR a également fait le choix de réaliser le séquençage des génomes complets de toutes les souches reçues et/ou isolées.

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

Les 10 souches anaérobies strictes d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font partie des espèces suivantes :

ESPECE	NOMBRE
<i>Clostridium botulinum</i>	2
<i>Clostridium perfringens</i>	4
<i>Clostridium chauvoei</i>	3
<i>Clostridium novyi</i>	1
TOTAL	10

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

En 2020, les 12 souches anaérobies strictes d'origine alimentaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font partie des espèces suivantes :

ESPECE	NOMBRE
<i>Clostridium botulinum</i>	2
<i>Clostridium sporogenes</i>	3
<i>Clostridium perfringens</i>	5
<i>Clostridium taeniosporum</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	1
TOTAL	12

Les souches de *Clostridium perfringens* isolées et/ou toxinotypées par le CNR proviennent d'aliments suspectés dans des TIAC excepté une souche isolée d'un pot de miel suspecté être à l'origine d'un cas de botulisme infantile de type Bf. Dans ce pot de miel, le CNR a également isolé une souche de *Clostridium sporogenes*.

La souche de *Clostridium taeniosporum* a été adressé au CNR en tant que *Clostridium sporogenes*. Ces deux espèces sont apparentées à *Clostridium botulinum* et les techniques de Maldi-Toff et/ou séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ne permettent pas de conclure sans équivoque : la recherche des gènes de neurotoxine par PCR et de la toxicité sur souris du surnageant de culture suivi du séquençage du génome complet a permis de confirmer le caractère non neurotoxigène et de requalifier cette souche.

3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (hormis *Clostridioides difficile*)

Depuis septembre 2019, le CNR réalise un antibiogramme de manière systématique à la réception ou à l'isolement d'une souche, suite à l'augmentation des demandes par les laboratoires, particulièrement pour le genre *Bacteroides*. En effet, certaines espèces, principalement appartenant aux genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêtalactamases ou des céphalosporinases, et sont de fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

En 2020, le CNR a donc réalisé 105 antibiogrammes avec pour chaque souche les données de séquençage des génomes associés.

Sur les 105 souches testées, 92 souches sont d'origine humaine (dont 6 souches de *C. botulinum*), 4 souches d'origine vétérinaire et 9 d'origine alimentaire (dont 2 souches de *C. botulinum*). Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Les résultats concernant les 92 souches sont repris dans les tableaux 2 et 3 - chapitre 9.

Les données d'antibiorésistance sont décrites ci-dessous :

Métronidazole

Le métronidazole demeure l'antibiotique donné en première intention pour lutter contre les infections à bactéries anaérobies. Il est donc important de suivre l'évolution des résistances.

Sur les 105 souches testées, 21 sont résistantes au métronidazole dont 4 souches du genre *Bacteroides* (3/4 porteuses d'un gène *nim*) et 3 souches de *Clostridium*.

Amoxicilline et Amoxicilline + Acide Clavulanique

Les résistances à l'amoxicilline sont observées essentiellement chez les bactéries anaérobies à Gram -, notamment du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. Le CA-SFM a d'ailleurs supprimé cet antibiotique pour les bactéries de ce genre.

Effectivement sur 34 souches résistantes à l'amoxicilline, le genre *Bacteroides* représente 82% des souches et 87.5% des souches de ce genre sont résistantes.

Pour la première fois, une souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* est porteuse du gène de bêta-lactamase blaOXA-34 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Neuf souches sont résistantes à l'association amoxicilline + acide clavulanique dont 7 souches appartenant au genre *Bacteroides*. Une souche de *Clostridium butyricum* est également résistante.

Pipéracilline + Tazobactam

La résistance à la Pipéracilline associée au tazobactam a été observée sur 9 souches dont 5 du genre *Bacteroides* (55,5%).

Imipenème

Quatre souches étaient résistantes à l'imipenème, toutes du genre *Bacteroides*. Deux souches ont le gène *cfiA* qui code pour une carbapénémase active sur cet antibiotique. La recherche d'autres gènes de résistance par Blast des génomes des deux autres souches contre la banque de données ResFinder n'a renvoyé aucun résultat.

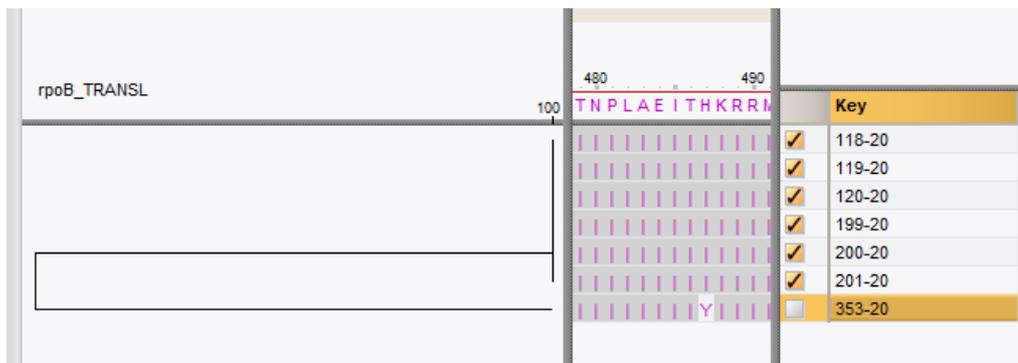
Clindamycine

La résistance à la clindamycine a été observée pour 30 souches sur les 105 testées. 19 souches appartiennent au genre *Bacteroides* soit 63% des souches contre 48% en 2019, 62,5% en 2018 et 26,7% en 2017.

Neuf souches du genre *Clostridium* sont résistantes à la clindamycine contre 10 en 2019 et une seule en 2018.

Rifampicine

Contrairement à 2019 où aucune résistance à la rifampicine n'avait été observée, en 2020, 4 souches sont résistantes. Une souche est de l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron*. En comparant la séquence du gène *rpoB* (mécanisme de résistance connu par mutation ponctuelle de la cible) des souches de *Bacteroides thetaiotaomicron* reçu en 2020, la résistance peut être expliquée par une modification : H487Y.



Moxifloxacine (Fluoroquinolone 3^{ème} génération)

Parmi les 12 souches résistantes à la moxifloxacine, 7 souches sont des Gram – dont 5 du genre *Bacteroides* et 2 du genre *Prevotella*. Parmi les anaérobies à Gram +, cette résistance est observée pour 5 souches, principalement dans le genre *Clostridium* (4).

Les mutations du gène *gyrA* sont en grande partie responsable de cette résistance.

Pour le genre *Bacteroides*, deux mutations sont décrites : S82F et F86L. Les 5 souches résistantes possèdent l'une de ces deux mutations (4 = S82F et 1 = F86L).

Pour le genre *Prevotella*, la comparaison du gène *gyrA* de toutes les souches, pour lesquelles nous avons le génome complet de la collection du CNR, montrent une mutation D211G qui pourrait expliquer cette résistance.

Vancomycine

Selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, la résistance à la vancomycine est recherchée uniquement pour les Gram +. Cette dernière a été observée pour 2 souches (1 *Bifidobacterium breve* et 1 *Lactobacillus rhamnosus*).

Chloramphénicol

Contrairement à l'année 2019 où 7 souches étaient résistantes, aucune résistance n'a été détectée en 2020.

Linézolide

La résistance au linézolide a été observée sur 3 souches dont 2 *Clostridium perfringens* (5/10 en 2019) et une souche de *Lactobacillus rhamnosus*.

Tigécycline

La résistance à la tigécycline a été observée sur 7 souches : 2 souches du genre *Clostridium* et 5 souches du genre *Bacteroides*.

En conclusion, le CNR confirme en 2020, comme les autres années, que le genre *Bacteroides* représentent la plus grande partie des souches résistantes aux antibiotiques.

Les données des génomes complets permettent d'établir un profil de « résistome » pour ce genre (Tableaux ci-dessous). Le génotype ne reflète pas systématiquement le phénotype de résistance à certains antibiotiques et laisse ouvert le champ des possibilités d'exploration des génomes du genre à la recherche de nouveaux gènes et/ou mécanismes de résistance (à l'imipénème par exemple). Cette analyse confirme par contre que la présence du gène *erm* confère systématiquement la résistance à la Clindamycine, celle du gène *nim* la résistance au Métronidazole et les mutations *gyrA* et *rpoB* la résistance à la Moxifloxacine et Rifampicine, respectivement.

Ces données doivent et seront consolidées chaque année.

Famille d'antibiotiques	β -lactamase de classe A	β -lactamase de classe D	Céphalosporinase	Carbapénémase	Macrolide/Lincosamide		
Gène de résistance (présence/mutation)	<i>cfxA</i>	<i>blaOXA-347</i>	<i>cepA</i>	<i>cfiA</i>	<i>erm</i>	<i>lsa(C)</i>	<i>mef(A)</i>
Antibiotique ciblé	Céfoxitine	Penicillines Céphalosporines	Céphalosporines Aminopénicillines Ticarcilline/Pipéracilline	Imipénème	Clindamycine		
Nombre de souches possédant le gène de résistance ou la mutation (%#)	16 (50%)	1 (3%)	8 (25%)	3 (9%)	18 (56%)	1 qui possède aussi le gène <i>erm</i>	2 dont 1 qui possède aussi le gène <i>erm</i>
Nombre de souches résistantes (% souches possédant le gène de résistance)	cf Tableau 3 Profil de résistance des <i>Bacteroides</i>			4 [§]	18 (100%)	1 qui possède aussi le gène <i>erm</i>	1 qui possède aussi le gène <i>erm</i>

Nombre total de souches analysées N=32

§ 1 souche possède le gène *cfiA* sans être résistante à l'imipénème et 2 souches sont résistantes à l'imipénème malgré l'absence du gène *cfiA*

*Antibiotiques ne faisant pas partie des listes standard et complémentaire du CA-SFM

Famille d'antibiotiques	Nitro-5-imidazolé	Cycline	Sulfonamide	Quinolone	Rifamycine
Gène de résistance (présence/mutation)	<i>nim</i>	<i>tet</i>	<i>sul2</i>	mutation <i>gyrA</i>	mutation <i>rpoB</i>
Antibiotique ciblé	Métronidazole	Tétracycline	Sulfaméthoxazole (+ Triméthoprimé)	Moxifloxacine	Rifampicine
Nombre de souches possédant le gène de résistance ou la mutation (%#)	4 (13%)	29 (91%)	1 (3%)	5 (16%)	1 (3%)
Nombre de souches résistantes (% souches possédant le gène de résistance)	4 (100%)	Données non disponibles*	Données non disponibles*	5 (100%)	1 (100%)

Nombre total de souches analysées N=32

*Antibiotiques ne faisant pas partie des listes standard et complémentaire du CA-SFM

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

La situation épidémiologique du botulisme fait l'objet d'une mise au point régulière avec Santé publique France, avec pour principal interlocuteur Mme Nathalie Jourdan da Silva. Des échanges avec SpF, les cliniciens concernés, l'ARS et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé sont établis pour chaque foyer identifié ou suspicion. Les données du CNR sont confrontées tous les ans aux déclarations obligatoires de cas de botulisme humains reçues par SpF. Des études communes présentant la situation du botulisme en France sont régulièrement publiées dans le Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH).

Contribution aux réseaux de surveillance européens et international

Notre laboratoire est régulièrement sollicité pour le diagnostic et la surveillance du botulisme dans les DROM comme La Réunion et Mayotte, et de plus en plus fréquemment dans d'autres pays européens (Suisse, Portugal, Espagne), d'Amérique du Sud, d'Afrique du Nord et l'Arabie Saoudite. Depuis août 2018, à la demande des autorités de santé suisse, le CNR réalise de façon formelle le diagnostic biologique de botulisme humain pour la Suisse, et s'est engagé à signaler les cas sur leur plateforme dédiée.

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

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

Sans objet

4-ALERTE

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

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

TIAC à *Clostridium perfringens*: Le CNR a participé aux côtés de SpF, DGS, ARS, DDPP, DGCCRF, DGAL, ANSES, OCLAESP ou les services de santé aux armées, à l'investigation de 2 TIAC à *Clostridium perfringens* survenues l'une en collectivité militaire (42 cas) en janvier, l'autre dans un EHPAD (2 décès).

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

5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

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

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

Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017 en début de mandat.

5-1-2 Activités de conseils aux professionnels de santé

Le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme a mis à disposition des numéros de téléphone (01 45 68 84 56 / 01 45 68 83 10), des adresses email (christelle.mazuet@pasteur.fr, laure.diancourt@pasteur.fr et cnranaerobies@pasteur.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, pré analytiques, interprétation des résultats). Des cahiers d'enregistrement/traçabilité/transmission des prestations de conseils délivrées aux professionnels de santé, vétérinaires, industriels, particuliers ont été mis en place à chaque poste téléphonique. Ainsi en 2020 (253 jours ouvrés), le CNR a répondu à plus de 220 emails et à 212 appels téléphoniques enregistrés (équivalent à l'an dernier).

5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Christelle Mazuet et Laure Diancourt ont été régulièrement en contact avec Nathalie Jourdan Da Silva et Alexandra Mailles pour l'investigation des suspicions de botulisme.

Christelle Mazuet est Expert du Groupe de Travail « Socle Botulisme » rattaché au Comité d'Experts Spécialisé « Santé et bien-être des animaux » de l'ANSES saisie par la Direction générale de l'alimentation pour effectuer une mise à jour des connaissances et une évaluation des risques en appui des mesures de gestion dans les filières avicole, bovine et en faune sauvage, lors de suspicions et de confirmations de cas de botulisme.

5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public)

N/A

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

6-1 Activités de recherche

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

Development of An Innovative and Quick Method for the Isolation of *Clostridium botulinum* Strains Involved in Avian Botulism Outbreaks.

Le Gratiet T, Poezevara T, Rouxel S, Houard E, **Mazuet C**, Chemaly M, Maréchal CL
Toxins (Basel). 2020;12(1):42. Published 2020 Jan 10. doi:10.3390/toxins12010042

Abstract

Avian botulism is a serious neuromuscular disease mainly caused by a type C/D botulinum neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* group III, one of the entwined bacterial species from the *Clostridium novyi* sensu lato genospecies. Its isolation is very challenging due to the absence of selective media and the instability of the phage carrying the gene encoding for the neurotoxin. The present study describes the development of an original method for isolating *C. botulinum* group III strains. Briefly, this method consists of streaking the InstaGene matrix extraction pellet on Egg Yolk Agar plates and then collecting the colonies with lipase and lecithinase activities. Using this approach, it was possible to isolate 21 *C. novyi* sensu lato strains from 22 enrichment broths of avian livers, including 14 toxic strains. This method was successfully used to re-isolate type C, D, C/D, and D/C strains from liver samples spiked with five spores per gram. This method is cheap, user-friendly, and reliable. It can be used to quickly isolate toxic strains involved in avian botulism with a 64% success rate and *C. novyi* sensu lato with a 95% rate. This opens up new perspectives for *C. botulinum* genomic research, which will shed light on the epidemiology of avian botulism.

Comparison of the antibody response of cattle vaccinated against type C and D botulinum neurotoxins with a traditional toxoid based vaccine and a recombinant vaccine

Luca Bano, Elena Tonon, Luca Zandonà, Ilenia Drigo, Andrea Bravo, Romina Brunetta, **Christelle Mazuet**, Joachim Frey

Article soumis pour publication

Abstract

Bovine botulism is a fatal disease that causes great economic losses, with nearly 100% lethality during outbreaks. The disease is sustained by botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum* commonly belonging to serotype C and D and vaccination is the most effective method to prevent botulism in cattle.

In the present study, we compared the immune response of bovines immunized with the recombinant heavy chain (Hc) domain of BoNT type C and D, with the immune response produced by a commercial toxoid based vaccine.

Ten bovines were vaccinated twice with a commercial bivalent (C/D) toxoid based vaccine (Botulism vaccine, Ondestepoort, SA), 10 bovines were vaccinated twice with a recombinant 50 kDa protein representing the Hc domain of BoNT types C and D, 5 bovines were injected with the adjuvant and 5 bovines were included in the study as negative control.

The immune response was investigated by means of two ELISA tests developed in-house using the immunogens (Hc of BoNT C and D) as capture antigens. A mouse protection assay was employed to measure the neutralizing antibodies elicited by the two different vaccines.

The group of bovines vaccinated with the recombinant vaccine showed an antibody response mean of 1.031 ELISA units (EU) for type C and 1.14 EU for type D. The means of the antibody response of control animals and animals inoculated with the only adjuvant were 0.171 EU and 0.097 EU respectively, when tested with Hc of type C as capture antigen, and 0.013 and 0.007 when tested with the Hc of type D. The mean of the antibody response of bovines vaccinated with the bivalent toxoid based vaccine was 0.737 EU for type C and 0.665 for type D.

Preliminary results of the mouse protection assay performed on a restricted number of sera evidenced that 5.5 LD₅₀ of BoNT C are neutralized with the sera of bovines vaccinated with the traditional toxoid based vaccine until the serum-dilution of 1:2. The same quantity of toxin was neutralized *in vivo* with the sera of bovines vaccinated with the recombinant sub-units until the dilution encompassed between 1:8 and 1:16. In the next future, the serum titre will be compared with type C and D reference antitoxins and expressed in international units.

Our results suggest a higher protective efficacy of the studied recombinant vaccine in comparison with the traditional toxoid based vaccine for the prevention of botulism in cattle.

Four new *C. botulinum* Group III closed genomes sequenced using Pacbio technologyCedric Woudstra, Tommi Mäklin, Yagmur Derman, Luca Bano, Hanna Skarin, **Christelle Mazuet**, Antti Honkela, Miia Lindström*Article soumis pour publication***Abstract**

Clostridium botulinum Group III is the anaerobic Gram positive bacteria producing the deadly neurotoxin responsible for animal Botulism. Here, we used long reads sequencing to produce four complete genomes from *Clostridium botulinum* Group III neurotoxin types C, D, C/D and D/C. The protocol to obtain high molecular weight DNA from *C. botulinum* Group III is described.

6-1-2 Activités de recherche sur les bactéries anaérobies**Peptoniphilus nemausus sp. nov. a novel Gram-positive anaerobic coccus isolated from human clinical samples and emended description of the genus Peptoniphilus**Fabien Aujoulata, **Christelle Mazuet**, Alexis Criscuolo, Michel R. Popoff, Cécilia Enault, **Laure Diancourt**, Estelle Jumas-Bilak, Jean-Philippe Lavigne, Hélène Marchandin*Article soumis pour publication***Abstract**

An unknown Gram-positive, anaerobic coccus was isolated from human surgical site infection. 16S rRNA gene sequencing revealed that *Peptoniphilus coxii* was the most closely related species to the clinical isolate. However, the 97.9% identity in the 16S rRNA gene sequence between the clinical isolate and the type strain of *Peptoniphilus coxii* suggested the clinical isolate to belong to a novel species in the genus *Peptoniphilus*. Whole genome sequence analysis showed average nucleotide index value of 84.75% and digital DNA-DNA hybridization value of 28.9% with the *P. coxii* type strain. Phylogenetic analyses showed an individualized branching within the genus *Peptoniphilus*. The strain displayed unique features among members of the genus *Peptoniphilus* as it was able to hydrolyze aesculin, and produced acetate as the major metabolic end-product without associated production of butyrate. Growth in microaerophilic conditions was observed. From all these data, the isolate is considered to belong to a novel species in the genus *Peptoniphilus*, for which the name *Peptoniphilus nemausus sp. nov.* is proposed. The type strain is 1804121828T (= LMG 31466T = CECT 9935T). The GenBank database was screened using a highly polymorphic partial sequence of the 16S rRNA gene of *P. nemausus* with the aim to learn about the habitat and lifestyle of the species; this revealed *P. nemausus* to be a particularly rare species associated to human skin. An emended description of the *Peptoniphilus* genus described by Ezaki et al. in 2001 is also proposed based on a review of characteristics reported for the 12 novel species successively validated since the genus description and for *P. nemausus*. Finally, the relationships among members of the genus *Peptoniphilus* were explored herein based on whole genome sequence analysis in order to clarify the taxonomic status of not yet validly published species with available genomic data.

Clostridial prosthetic joint infections: a serie of 16 casesLouise Manceau, Pascale Bémer, Justine Decroo, Paul Le Turnier, Vincent Crenn, Anne Jolivet-Gougeon, Chloé Plouzeau-Jayle, Marie-Frédérique Lartigue, Leslie Bouard, Rachel Chenouard, **Christelle Mazuet**, Stéphane Corvec, Anne-Gaëlle Leroy*Travail soumis à l'ECCMID 2021 et à l'EBJIS 2021*

Background: Little has been published regarding prosthetic joint infections (PJI) due to *Clostridium* species. Indeed, only nine cases have been reported in literature. We conducted a retrospective multicentric study to characterize every PJI caused by *Clostridium* sp., between 2003 and 2020, in six Western France hospitals.

Case(s) description: 16 patients were included during the study period. Four (25%) patients were male, median (IQR) ages at the time of prosthesis placement and at the time of infection were 77 years (71;84) and 84.5 years (79.5;86), respectively. Site of prosthesis was the hip (n=12), and the knee (n=4). Half of the patients (n=8) underwent at least one previous implant revision. Ten (62.5%) PJI were early- or delayed-onset infections as they occurred less than 3 months after the last surgery. When performed (n=14 patients), concomitant blood cultures were negative. *Clostridium perfringens* was the most involved specie (15/16, 93.7%), as part of polymicrobial infections in 7/15. Toxins production analysis (performed on 10 strains) identified toxinotypes A (n=5) and C (n=5). DAIR (debridement, antibiotics with implant retention) procedure was the most frequently performed surgical intervention (n=7). Despite variability among antimicrobials used, amoxicillin was the most commonly prescribed drug (n=8), alone or in association (n=5), with a median treatment duration of 11.5 weeks (6.75;12). When available (n=10), outcomes within the 24 following months were favorable (n=5) or dampened by relapse (n=1) or death due to PJI (n=4).

Discussion: Given the low incidence of this infection, our work represents the largest series of clostridial PJI reported to date and helps to highlight some specificities of these uncommon infections: (i) *C. perfringens* appeared as the most frequently *Clostridium* species involved, (ii) patients presented an advanced age at the time of prosthesis placement and infection, (iii) most of the infections were early- or delayed-onset infections, and (iv) these PJI are associated with a poor prognosis dampened by death or relapse. A prolonged antibiotic treatment up to 6 months and/or a complete arthroplasty exchange should be considered to improve the management of these clostridial PJI. Further prospective studies are needed to confirm these results.

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

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

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

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

Les objectifs:

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

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

En raison de la situation sanitaire liée à l'épidémie de Covid en 2020, le projet a pris du retard et une prolongation de 6 mois (ie fin juin 2021) a été accordée par la coordination européenne OH-

EJP. Les derniers travaux techniques sont en cours, le rapport final également en cours de rédaction et la journée de clôture du projet programmée fin juin.

6-2 Publications et communications 2020

6-2-1-1 Publications nationales

Sans objet

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

Development of An Innovative and Quick Method for the Isolation of *Clostridium botulinum* Strains Involved in Avian Botulism Outbreaks.

Le Gratiet T, Poezevara T, Rouxel S, Houard E, Mazuet C, Chemaly M, Maréchal CL
Toxins (Basel). 2020;12(1):42. Published 2020 Jan 10. doi:10.3390/toxins12010042

First Case of Bacteraemia Due to Carbapenem-Resistant *Bacteroides faecis*.

Kaeuffer, C.; Ruge, T.; **Diancourt, L.**; Romain, B.; Ruch, Y.; Jaulhac, B.; Boyer, P.H.
Antibiotics 2021, 10, 319. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030319>

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

- H2020_KO Meeting FED-AMR, Vienne, Autriche
- Journée d'échanges sur le botulisme animal
Web Conférence sur invitation : « Le botulisme humain en France »

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

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

- 1) Pour valider/comparer/confirmer/affiner les diagnostics biologiques des foyers de botulisme animal, et en particulier pour les bovins pour lesquels la confirmation biologique du diagnostic est très souvent problématique. Il faut souligner ici la difficulté que nous rencontrons à échanger simplement, rapidement et à moindre coût des prélèvements, souches et ADN du fait de la réglementation MOT/ANSM.
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications. Cette mise en commun des données de surveillance des différents acteurs a été reprise et élargie dans le cadre d'une demande de la DGAL d'actualisation des connaissances du botulisme animal et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.
- 3) Le CNR et le LNR coopèrent à l'investigation des foyers de botulisme bovin et aviaire, notamment des oiseaux sauvages en collaboration étroite avec l'ONCFS et le réseau SAGIR. En 2018 et 2019, l'ensemble des acteurs s'est fortement mobilisé autour du diagnostic simultané de 3 foyers de botulisme de type C/D et E dans la faune aviaire sauvage.

- 4) Christelle Mazuet fait partie du comité de thèse de l'étudiant de Caroline Le Maréchal (responsable du LNR) dont le sujet porte sur l'isolement et la caractérisation génétique des souches de *Clostridium botulinum* du groupe III.

Nous collaborons également régulièrement et plus facilement que par le passé avec l'unité SBCL (Staphylococcus, Bacillus & Clostridium) du laboratoire de sécurité des Aliments de l'ANSES-Maison Alfort :

- 1) Lors de l'investigation de TIAC à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus* pour confronter, comparer et analyser les souches isolées des aliments contaminés et celles isolées des prélèvements biologiques des victimes.
- 2) Dans le projet européen ToxDetect (cf supra)
- 3) Dans la soumission à l'ANR du projet ClostAbat (« Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses ») (cf infra).

9- TABLEAUX

TABLEAU 1

Répartition des souches d'origine humaine par genre et espèces

Période du 01/01/2020 au 31/12/2020

21 genres, 40 espèces, 1 espèce non nommée

Genre	Nombre (espèce)
<i>Actinomyces</i>	3 (<i>gerenseriae</i> (1), <i>naeslundii</i> (2))
<i>Bacillus</i>	2 (<i>cereus</i>)
<i>Bacteroides</i>	32 (<i>dorei</i> (1), <i>faecis</i> (3), <i>fragilis</i> (11), <i>ovatus</i> (1), <i>salyersiae</i> (1), <i>thetaiotaomicron</i> (12), <i>vulgatus</i> (2), <i>xylanisolvans</i> (1))
<i>Bifidobacterium</i>	1 (<i>breve</i>)
<i>Butyricimonas</i>	1 (sp.)
<i>Clostridium</i>	54 (<i>baratii</i> (1), <i>botulinum</i> (7), <i>butyricum</i> (1), <i>clostridioforme</i> (1), <i>hastiforme</i> (1), <i>paraputrificum</i> (1), <i>perfringens</i> (37), <i>sordellii</i> (1), <i>sporogenes</i> (2), <i>subtermanile</i> (1), <i>tetani</i> (2))
<i>Cutibacterium</i>	4 (<i>acnes</i>)
<i>Desulfovibrio</i>	2 (<i>fairfieldensis</i>)
<i>Dialister</i>	2 (<i>pneumosintes</i>)
<i>Eggerthella</i>	1 (<i>catenaformis</i>)
<i>Enterocloster</i>	1 (<i>boltae</i>)
<i>Erysipelatoclostridium</i>	1 (<i>ramosum</i>) ex. <i>Clostridium ramosum</i>
<i>Fusobacterium</i>	1 (<i>nucleatum</i>)
<i>Hungatella</i>	1 (<i>effluvii</i>)
<i>Lactobacillus</i>	3 (<i>delbrueckii</i> (2), <i>rhamnosus</i> (1))
<i>Mycoplasma</i>	1 (<i>hominis</i>)
<i>Paenibacillus</i>	1 (<i>dendritiformis</i>)
<i>Peptostreptococcus</i>	1 (<i>anaerobius</i>)
<i>Prevotella</i>	3 (<i>bivia</i>)
<i>Robinsoniella</i>	1 (<i>lpeoriensis</i>)
<i>Veillonella</i>	1 (<i>parvula</i>)

Profils de résistance (Nombre de souches R+) des bactéries anaérobies reçues ou isolées en 2020
Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

TABEAU 2
Bactéries à Gram +
N=64 souches

Espèce	Nombre de souches testées	Antibiotiques (charge du disque en µg)												
		Métronidazole (5)	Amoxicilline (20)	Amoxicilline-acide clavulanique (20/10)	Imipénème (10)	Clindamycine (2)	Rifampicine (30)	Pipéracilline-tazobactam (30/6)	Linézolide (30)	Tigécycline (15)	Chloramphénicol (30)	Moxifloxacine (5)	Vancomycine (30)	
<i>Actinomyces gerencseiae</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Clostridium baratii</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium botulinum</i>	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium butyricum</i>	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium chauvoei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium hastiforme</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0
<i>Clostridium sordellii</i>	24	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium sporogenes</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium subterminale</i>	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium tetani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cutibacterium tetani</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cutibacterium acnes</i>	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eggerthia cateniformis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Enterocloster boltae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Erysipelato clostridium ramosum</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
<i>Hungatella effluvia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 3

**Bactéries à Gram -
N = 41 souches**

Espèce	Nombre de souches testées	Antibiotiques (charge du disque en µg)												
		Métronidazole (5)	Amoxicilline (20)	Amoxicilline-acide clavulanique (20/10)	Imipénème (10)	Clindamycine (2)	Rifampicine (30)	Pipéracilline-tazobactam (30/6)	Linézolide (30)	Tigécycline (15)	Chloramphénicol (30)	Moxifloxacine (5)		
<i>Bacteroides dorei</i>	1	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides faecis</i>	3	0	3*	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	11	2	11*	4	3	6	0	2	0	0	1	1	0	3
<i>Bacteroides ovatus</i>	1	0	1*	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides salyersiae</i>	1	0	1*	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>Bacteroides thetaotaomicron</i>	12	1	9*	0	1	9	1	1	1	0	0	1	0	1
<i>Bacteroides vulgatus</i>	2	1	1*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	1	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Butyrivimonas sp.</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Dialister pneumosintes</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Veillonella parvula</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Non recommandé par le CA-SFM pour le genre *Bacteroides*

LIVRE II

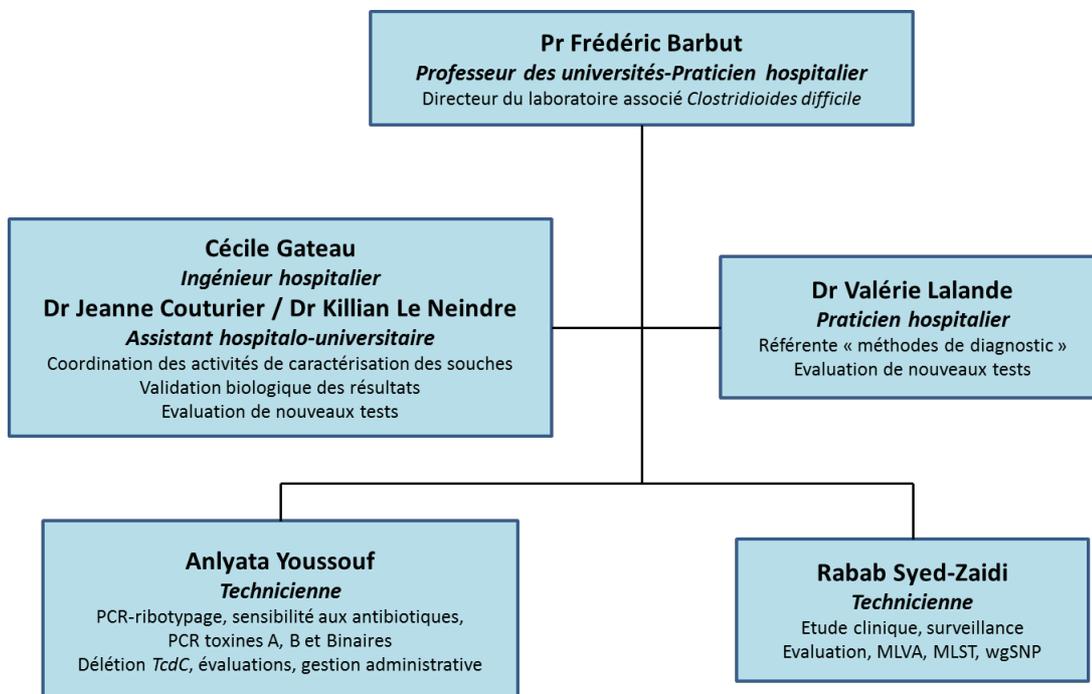
Laboratoire associé au CNR *Clostridium difficile*



1- MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Description détaillée présentée en **annexe 1**

Organigramme du laboratoire associé :



L'année 2020 a été marquée par le départ de Mme Gateau (Ingénieure Hospitalier). Un nouveau recrutement est en cours.

2- ACTIVITES D'EXPERTISE

Eléments clefs de l'année 2020 (en termes de production d'expertise)

Adaptation de la technique de PCR-ribotypage selon les recommandations européennes de l'ECDC ([Laboratory procedures for diagnosis and typing of human Clostridium difficile infection \(europa.eu\)](http://europa.eu)) et utilisation du site Web-Ribo pour identifier les PCR-ribotypes (<https://webribo.ages.at/>).

Coordination française du projet européen **COMBACT CDI**

Techniques et marqueurs disponibles, liste des techniques recommandées pour le laboratoire expert présentés en **annexe 2**.

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

2-1 Évolutions des techniques

Adaptation de la technique de PCR-ribotypage selon les recommandations européennes de l'ECDC (Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection (europa.eu) et utilisation du site Web-Ribo pour identifier les PCR-ribotypes (<https://webribo.ages.at/>).

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

- Evaluation des trousse Sophia et Solana (Quidel)
- Evaluation multicentrique du test Revogene (GenPoc)
- Comparaison des test Cdiff Quick Chek et Cdiff Quick check Complete (Abbott)
- Mesure de l'interférence de microbille de cellulose sur le diagnostic immunoenzymatique et moléculaire de *C. difficile*
- Evaluation de l'activité sporicide des UV-C (Xenex)

2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

2-4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**.

Pas d'évolution par rapport à 2019.

2-5 Activités d'expertise

En 2020, nous avons reçu 345 prélèvements au total contre 265 en 2019, ce qui représente une augmentation de 30,2 %.

Le **tableau I** présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2020 ainsi que les différentes caractérisations réalisées sur ces souches.

Le laboratoire associé s'est donné pour objectif de rendre les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours à partir de la date de réception de la souche isolée au laboratoire.

En 2020, la durée médiane de restitution était de 11 jours : ce délai s'explique par la réception de plus en plus fréquente de selles et non de souches isolées.

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

Année	2020
Nb de prélèvements reçus	345
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	316
Nb de souches toxigènes	262
Recherche du fragment A3 (%)	100
Recherche du fragment B1 (%)	100
Recherche de la toxine binaire (%)	100
Recherche délétion dans <i>tcdC</i> (%)	100
Antibiogramme (%)	100
PCR-ribotypage (%)	100

2-6 Activités de séquençage

Dans le cadre d'études épidémiologiques, le laboratoire associé a effectué **200** séquençages en 2020.

Le CNR a un accès à une plate-forme de séquençage (PIBnet interne à Institut Pasteur, mais aussi externe par eurofins genomics...). Les données de séquençage obtenues sont analysées par cgSNP ou wgMLST (Bionumerics 8). K. Le Neindre et R. Syed Zaidi ont suivi une formation spécifique sur la dernière version de BioNumerics. Les séquences sont stockées en interne en attente d'être publiées dans des revues à comité de lecture.

Les indications du séquençage sont :

- l'investigation d'épidémie
- la surveillance épidémiologique de certains clones
- la caractérisation fine de certaines souches atypiques de *C. difficile* (notamment au niveau de son PaLoc)

3-ACTIVITES DE SURVEILLANCE

Éléments clefs de l'année 2020 (en termes de surveillance)

Factors affecting reported *Clostridioides difficile* infection rates; the more you look the more you find, but should you believe what you see?

DAVIES K, DAVIS G, **BARBUT F**, ECKERT C, PETROSILLO N, PISAPIA R, GÄRTNER B, BERGER FK, REIGADAS E, BOUZA E, DEMONT C, WILCOX MH

Anaerobe. 2020 Apr;62:102178. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102178. Epub 2020 Feb 22. PMID: 32092415.

Characterization of *Clostridioides difficile* strains isolated from manure and digestate in five agricultural biogas plants.

LE MARÉCHAL C, GATEAU C, POEZEVARA T, COUTURIER J, ROUXEL S, SYED ZAIDI R, HOUARD E, POURCHER AM, DENIS M, BARBUT F.

Anaerobe. 2020 Apr;62:102180. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102180. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32092414.

3-1 Description du réseau de partenaires

Le laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » (Hôpital Saint-Antoine) assure une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

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

Il est à noter que de plus en plus de laboratoires envoient des souches de *C. difficile* pour confirmation du PCR-ribotype 027 lorsque le test GeneXpert a rendu une identification présomptive 027. Ces envois permettent également de surveiller la diffusion de la souche 027 épidémiques en France. D'autres laboratoires envoient des souches donnant des résultats discordants entre la recherche de toxines par PCR et les tests immuno-chromatographiques.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2020 (345 prélèvements)		
	oui	non	NR*
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	27	112	206
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	1	148	196
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	1	141	203
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	24	111	210
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	1	129	215
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	74	90	181

*NR : non renseignés

La suspicion d'épidémies ou de cas groupés constitue le motif le plus fréquent d'envoi des souches au laboratoire expert pour typage.

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

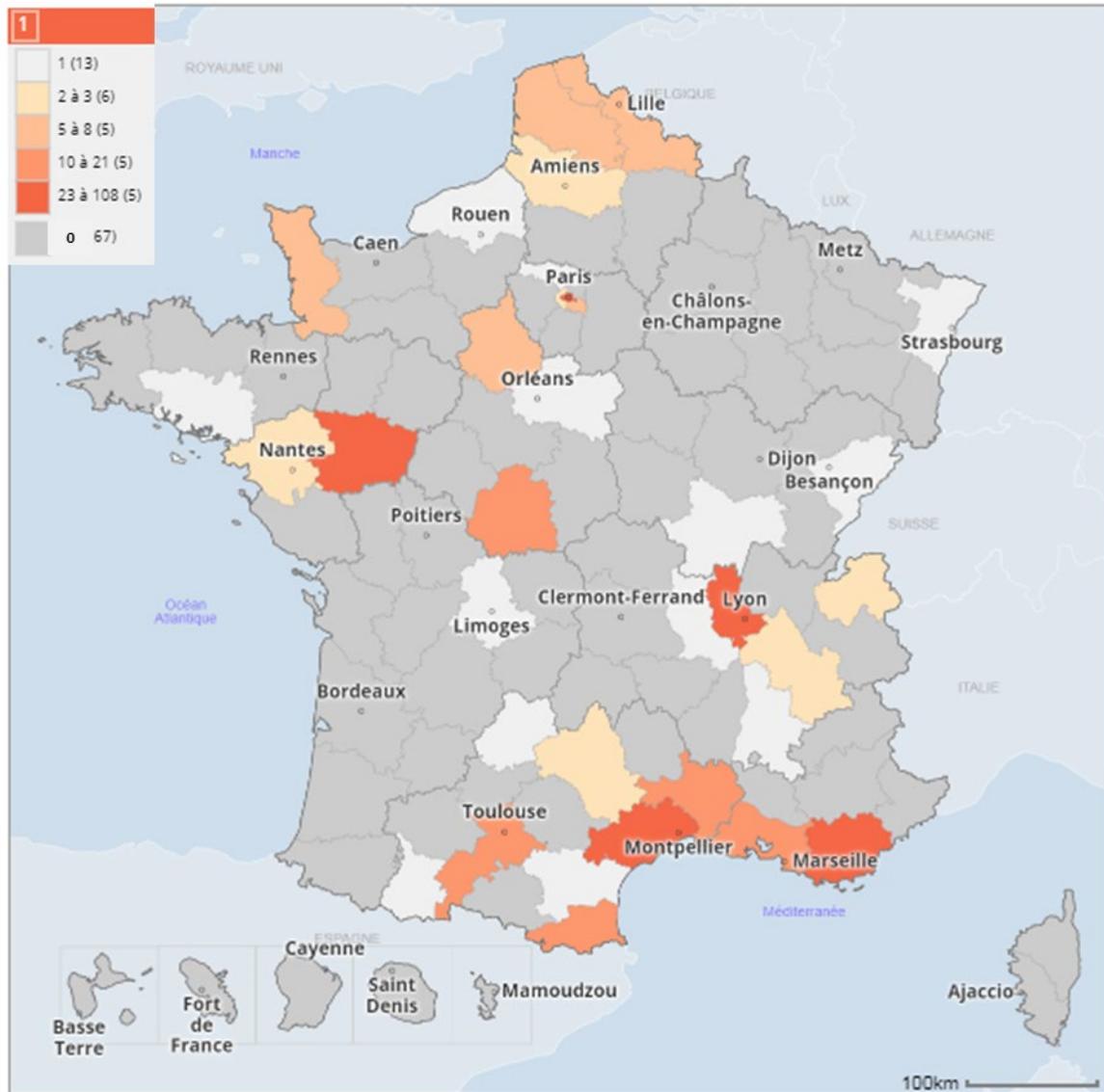
La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la **figure 1**.

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

En 2020, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient principalement de selles (98,9%). Cent quarante-deux souches (54,2%) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes, 116 (44,3%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 7 cas.

L'âge des patients chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représenté sur la **figure 2**. Au total, en 2020, 65,3% des patients ont plus de 65 ans (versus 69,2% en 2019).

Les souches 014, 015, 002 et 027 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 22,2% des souches toxigènes (**Tableau III**). Parmi les PCR-ribotypes « autres » les plus fréquemment retrouvés, on note le PCR ribotype 005 (n=12), le 023 (n=9) ainsi que le 081 (n=6).



© Géoclip 2019 - IGN GéoFla

Figure 1 : Répartition des prélèvements (n=345) envoyés par département, en 2020
A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement

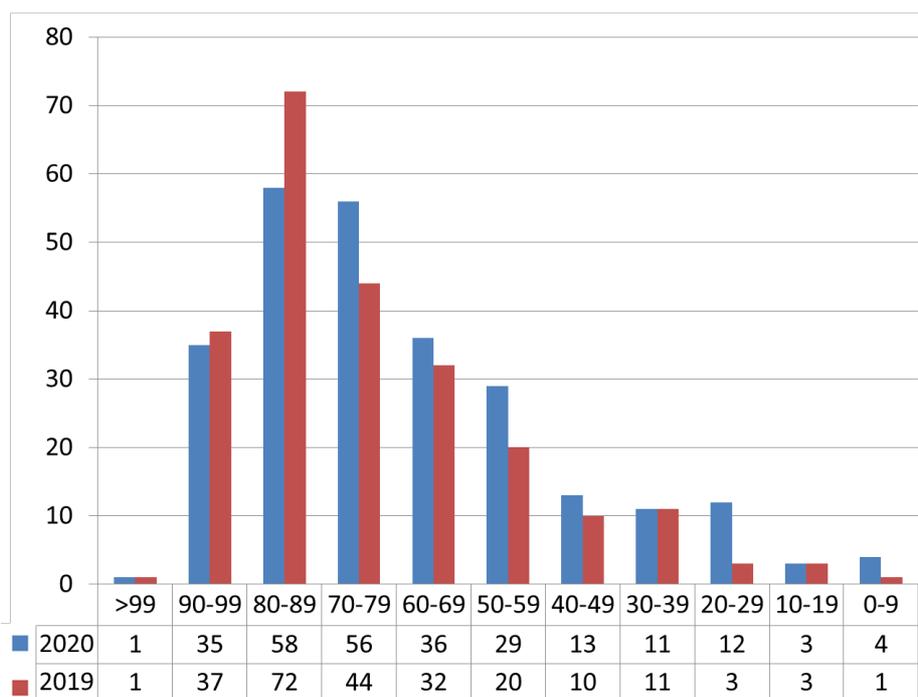


Figure 2. Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge (2019 et 2020)

Tableau III : Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2020

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)			
	2020	2019	2018	2017
027	16 (5,1)	11 (4,5)	14 (4,44)	37 (9,56)
014/020/077*	37 (11,7)	33 (13,5)	76 (23,82)	61 (15,76)
078/126**	24 (7,6)	26 (10,7)	33 (10,34)	29 (7,49)
002	15 (4,7)	15 (6,1)	18 (5,64)	31 (8,01)
001	6 (1,9)	1 (<1)	8 (2,51)	10 (2,58)
015	16 (5,1)	10 (4,1)	8 (2,51)	16 (4,13)
017	2 (<1)	6 (2,5)	3 (<1)	1 (<1%)
106	14 (4,4)	12 (4,9)	9 (2,82)	18 (4,65)
053	0 (<1)	0 (<1)	2 (<1)	4 (1,03)
autres	186 (58,9)	100 (41)	148 (46,40)	179 (46,25)
Non Déterminé	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)	1 (<1)
Total	316	244	319	387

*PCR ribotype 014, n=23
PCR ribotype 020, n=13
PCR ribotype 070, n=1

**PCR ribotype 078, n=11
PCR ribotype 126, n=13

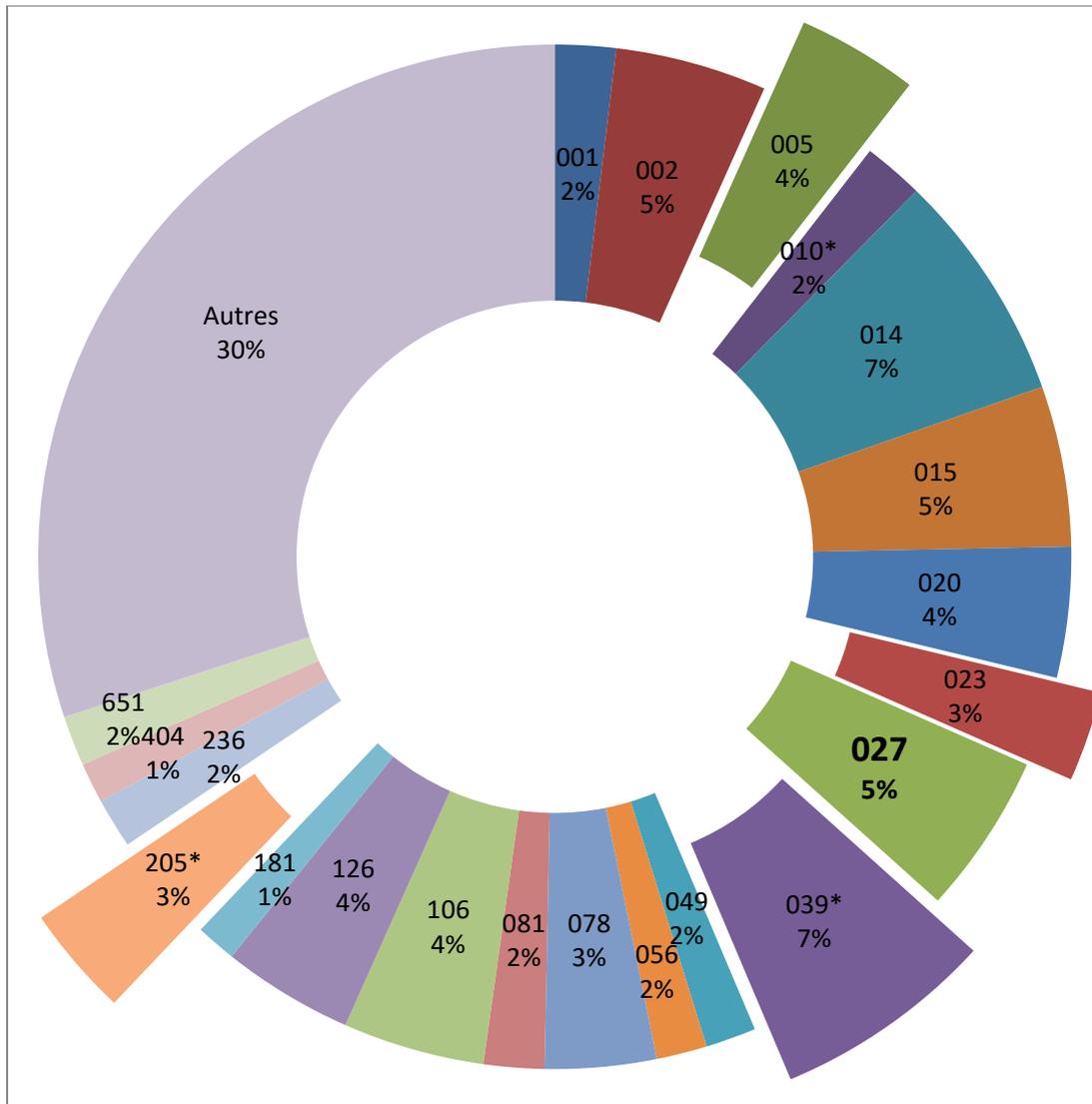


Figure 3. Répartition des PCR-ribotypes en 2020.

Les PCR-ribotypes non indiqués dans le tableau III avec plus de 8 souches sont mis en évidence par détachement du camembert. Les PCR-ribotypes non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

Parmi les 262 souches de *C. difficile* toxigènes, 16 (5,1%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, 10 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **historique** » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine (souches isolées dans 8 départements) (**figure 4b**). Les **6 souches épidémiques 027** ont été isolées dans le Pas-de-Calais (n=2), le Nord (n=1), la Loire-Atlantique (n=1), le Hérault (n=1) et en Eure-et-Loire (n=1) (**figure 4a**).

La souche 027 est présente sur tout le territoire. En 2019, 8 souches épidémiques 027 avaient été reçues au CNR contre 6 en 2020.

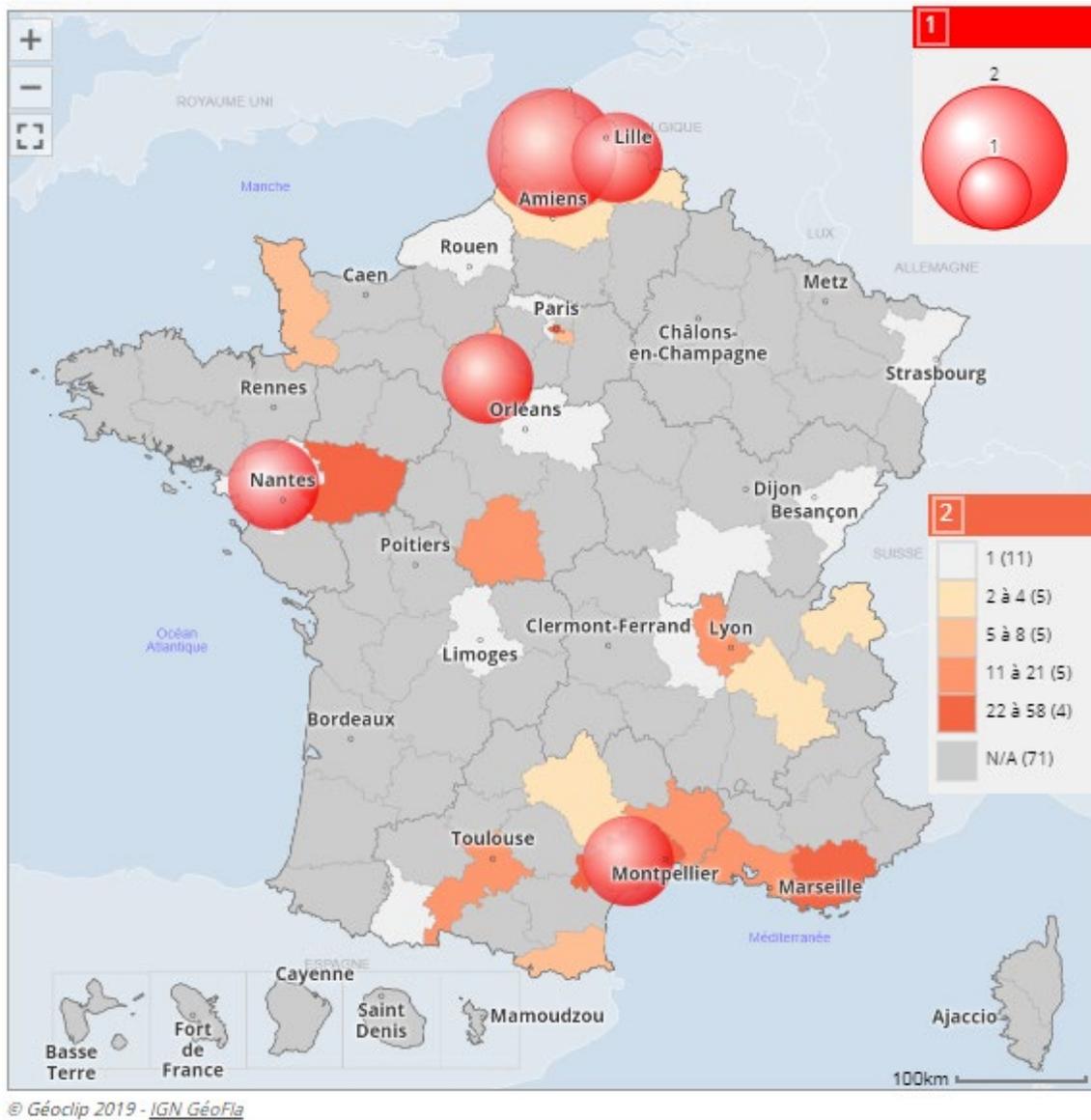
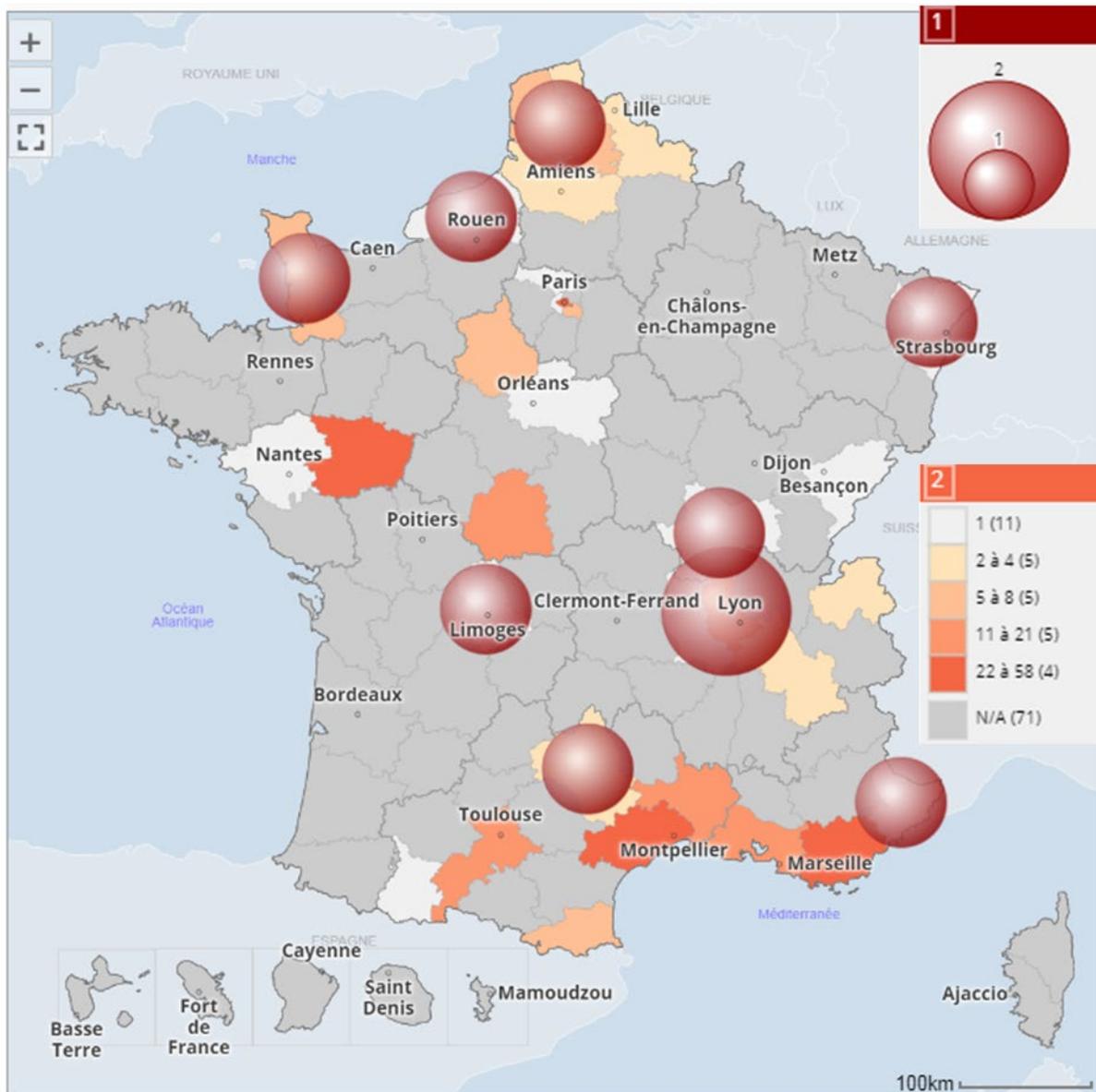


Figure 4a : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques (cercles rouges) en fonction des départements, en 2020. Les départements n’ayant pas envoyé des souches toxigènes sont représentés en gris.

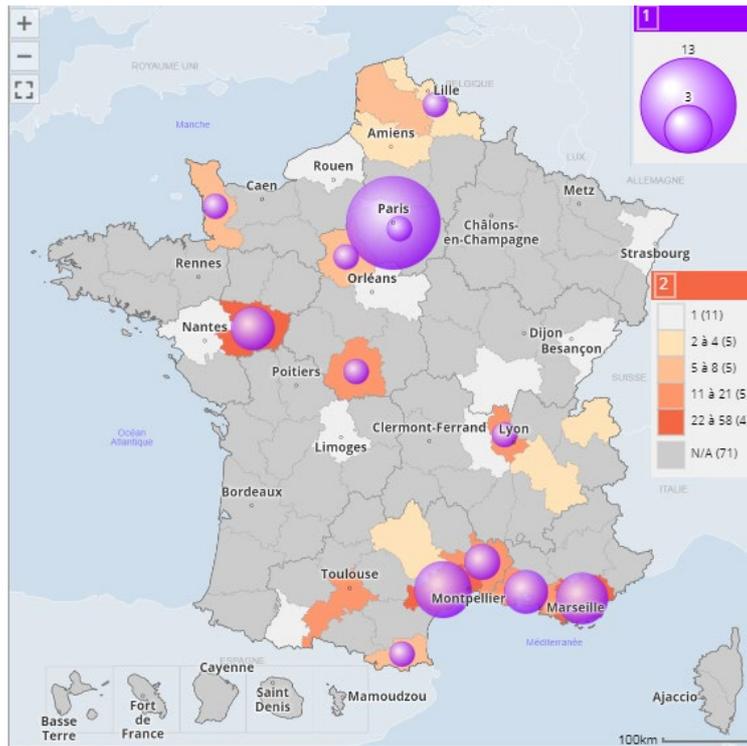
Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches toxigènes reçues au laboratoire est le 014/020/077, isolé sur tout le territoire (Figure 5). Les souches de PCR-ribotype 015 et 002 arrivent respectivement en 2^{ème} et 3^{ème} position (Excluant non-toxigène et RT027).



© Géoclip 2019 - IGN GéoFla

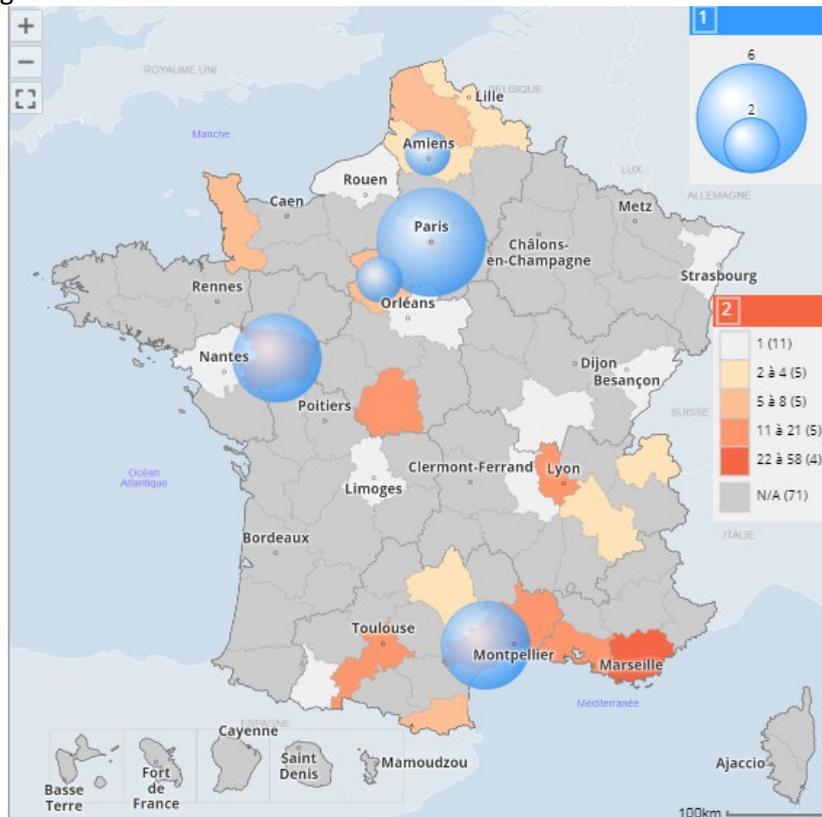
Figure 4b : Répartition des souches PCR-ribotype 027 Historique (cercles marron) en fonction des départements, en 2020. Les départements n'ayant pas envoyé des souches toxigènes sont représentés en gris.

Un nombre important de souches non toxigènes de PCR-ribotype 039 et 205 (Figure 3) a été identifié en 2020 provenant de l'investigation d'une épidémie d'entérococolite ulcéro-nécrosante dans un service de réanimation néonatalogie.



© Géoclip 2019 - IGN GéoFlis

Figure 5 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 (cercles violets) en fonction des départements, en 2020. Les départements n'ayant pas envoyé des souches toxigènes sont représentés en gris.



© Géoclip 2019 - IGN GéoFlis

Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 015 (cercles Bleu) en fonction des départements, en 2020. Les départements n'ayant pas envoyé des souches toxigènes sont représentés en gris.

Au cours de l'année 2020 une diminution de la proportion de souches non 027 possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (**Tableau IV**).

Tableau IV : Evolution de la proportion de souches toxigènes productrices de toxine binaire.

	2020	2019	2018
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	316	244	319
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	19,9% (63/316)	29,5 % (72/244)	24,1 % (77/319)
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	16	11	14
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs chez les souches non 027 (%)	15,7 % (47/300)	26,2 % (61/233)	20,7 % (63/305)

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

La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline (méthode des disques) a été testée pour 262 souches de *C. difficile* toxigènes en 2020. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 262 souches.

Les taux de résistance (R+) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm)¹ de 19,3 %, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm)¹ de 91,1 %, pour la moxifloxacine (diamètre < 21 mm)² de 7,3 %, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm)¹ de 6,3 % (**Tableau V**). On note une diminution de la résistance des souches de *C. difficile* aux 4 antibiotiques testés par rapport aux années précédentes.

Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine (CMI ≤ 2 mg/l)² et au métronidazole (CMI ≤ 4 mg/l)². La répartition des CMI pour les 262 souches toxigènes est présentée **figure 7**. Pour la vancomycine, la CMI50 est de 0,5 mg/L et la CMI90 est de 0,75 mg/L. Pour le métronidazole, la CMI50 est de 0,125 mg/L et la CMI90 est de 0,25 mg/L.

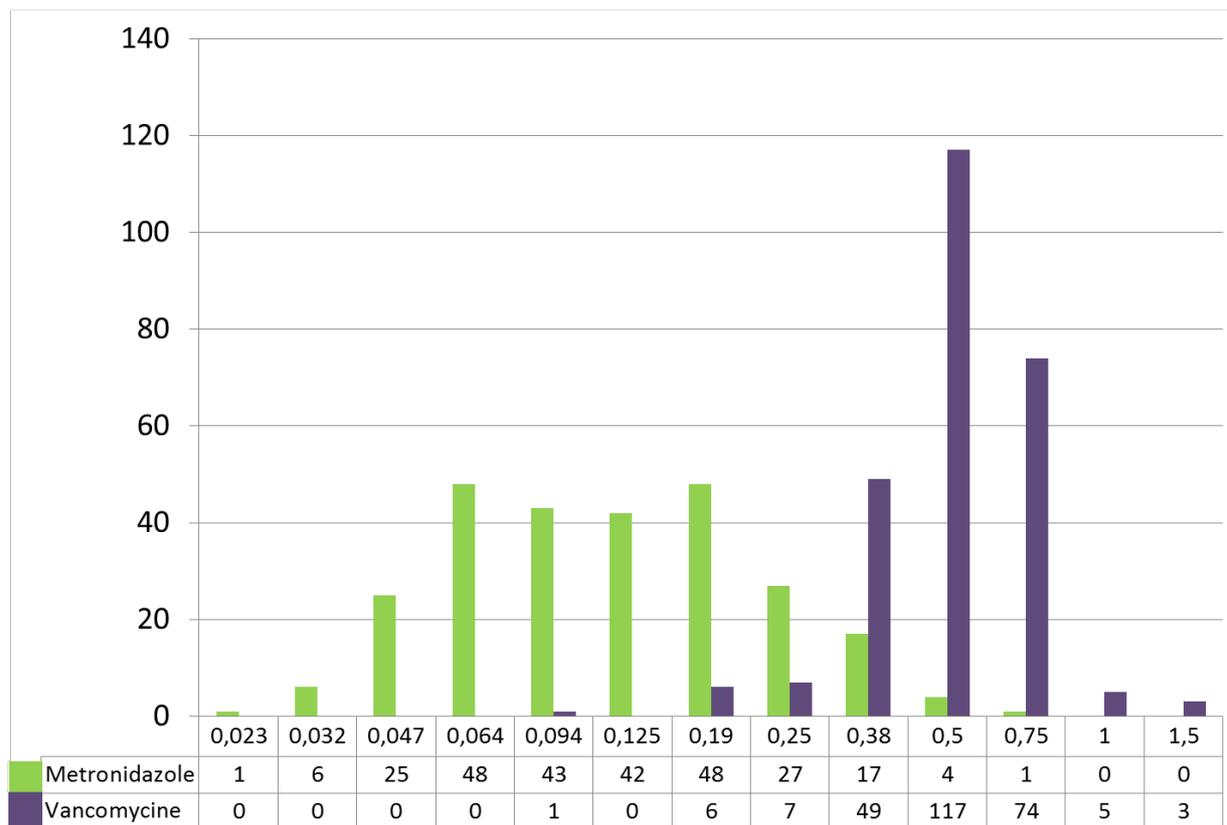
Tableau V : Pourcentage de résistance (R+) des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline
% de souches	<22 mm	<15 mm	<21 mm	<19 mm
2018	24,5	97,5	20,7	10,3
2019	25	91,8	17,2	12,7
2020	19,3	91,1	7,3	6,3

Figure 7 : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 262 souches toxigènes.

¹ Selon CASFM 2013

² Selon CASFM-EUCAST Octobre 2020



3-4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*).
- **F. Barbut** a participé en 2020 au projet européen « **Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections** » piloté par l'**ECDC** (Séquençage des souches de *C. difficile* de ST1).
- **F. Barbut** participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'**ECDC** sur la surveillance des infections à *C. difficile*. Il est notamment intervenu à un Workshop organisé par l'**ECDC** sur le diagnostic des infections à *C. difficile* en 2017 et 2019 **et** participe au projet

3-4-1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé (https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf). Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches et d'éditer un compte-rendu des résultats. L'identification des PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) se fait selon les recommandations européennes et repose sur la base de données Web-ribo.

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

Ce site est consultable dans sa totalité par Santé Publique France, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les CPIas et les ARS ont un accès restreint aux données de leur région. Ce

site est régulièrement mis à jour. Ce site anciennement hébergé par l'Institut Pasteur a été relocalisé en janvier 2016 au niveau de la société Epiconcept, sans que cela n'affecte le rendu ou la consultation des résultats.

3-4-2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

- **F. Barbut** a participé aux projets **LuCID2** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study) (Davies *et al.*- 2020).

- **F. Barbut** est le coordonnateur français de l'étude européenne **COMBACTE-CDI**. Il s'agit d'une étude **non interventionnelle** dont les objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire (VIPREY VF *et al.* Key differences in diagnosis and patient populations between community and in-patients *C. difficile* infection : results from Combatting bacterial resistance in Europe CDI (COMBACT CDI). Lancet Infect Dis. 2021, soumis

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

Surveillance par le réseau DIFTEC

DIFTEC® est un logiciel accessible gratuitement à partir du site diftec.fr ou diftec.net et est destiné aux professionnels de santé hospitaliers. Cet outil a pour finalité l'évaluation des pratiques diagnostiques et thérapeutiques des infections à *C. difficile* au niveau des établissements de santé.

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

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

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

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

HEMMENDINGER A, KHANAFER N. *et al.*..

Repeatable prevalence studies on *Clostridium difficile* infection cases: comparison of

patient's characteristics with other national and European surveillance systems. Anaerobes 2021, sous presse.

4-ALERTE

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

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

5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5-1-1 Enseignements sur *Clostridioides difficile*

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours
Universités Paris V, VI et VII	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours
Université Paris VI, UPMC	Réanimation	DU en soins infirmiers de réanimation et urgences vitales	Cours
Université Paris V, VII - Denis Diderot- Versailles - Saint-Quentin en Yvelines - Bordeaux II P. Broca	Infectiologie	DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse	Cours
Université Jules Verne de Picardie CHU d'Amiens	Hygiène	DU hygiène hospitalière et Prévention et Lutte contre les Infections Associées aux Soins	Cours
Sorbonne Université	Microbiologie	DU Microbiote et santé (Pr K. Clément)	Cours
Université de Grenoble	Microbiologie	DU Thérapeutiques et Microbiotes (Pr Murielle Cornet)	Cours

F. Barbut participe à des enseignements de formation continue en Microbiologie :

- **BioFormation** : « bactéries anaérobies » (3 jours) (enseignements labellisés par l'OGDPC destinés aux techniciens d'analyses médicales et biologistes).
- **Université Mérieux, Lyon** : « Formation sur les bactéries anaérobies (3 jours)

5-1-2 Activités de formations continues

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées-Année
Hôpital HEGP Staff de service Médecine interne (Pr Pouchot)	Médecine interne	médecin	Staff de service	1h 27/11/2020
Atelier éducation thérapeutique vis-à-vis des ICD	Toutes	Médecins, IDE,	Atelier	4 heures Février 2020

5-1-3 Stagiaires accueillis

Organisme Nom de l'Etudiant	Diplôme / Sujet	Année
Université de Paris Rabab Zyed Saidi	Projet tutoré L3 Comparaison de 3 méthodes immunoenzymatiques et immunochromatographiques détectant la GDH et les toxines A et B de <i>C. difficile</i>	2019-2020
Université de Paris Rabab Zyed Saidi	Projet tutoré L3 Evaluation <i>in vitro</i> d'un système de désinfection par rayonnement UV-C généré par une lampe au Xenon : mesure de l'activité vis-à-vis de 3 pathogènes nosocomiaux : <i>C. difficile</i> , <i>Citrobacter freundii</i> producteur de carbapénémase, et <i>E. faecium</i> résistant aux glycopeptides	2019-2020
Université Paris Descartes Virginie Courbin	Master 2 Microbiologie Apport du whole genome sequencing (WGS) dans la compréhension de l'épidémiologie des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	2020
Université de Paris Jeanne Couturier	Doctorat de sciences <i>Clostridium difficile</i> chez les enfants prématurés : dynamique de colonisation, caractérisation des souches et relations avec le microbiote intestinal ») (encadrement 50% avec Julio Aires)	Défendue en 2020

5-1-4 Liste des guides élaborés

BARBUT F., MEYNARD J.-L., MAURY E., SURGERS L., GATEAU C., COUTURIER J., ET ECKERT C.
Infections digestives à *Clostridium difficile*
In « Les essentiels en réanimation et médecine intensive »
[Offenstadt, Bollaert, CEMIR \(Collège des Enseignants en Médecine Intensive et Réanimation\)](#)
2020, chapitre 227, Editions Elsevier-Masson.

BARBUT F., LE MONNIER A, ECKERT C
Clostridium difficile
 REMIC, 2018

KUIJPER E., **BARBUT F.**

« *Clostridium* »

In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press 2019, pp 968-995

BARBUT F., DONSKEY CJ.

Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*

In "Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice",

Edited by David H. Persing *et al.*, 3rd Edition, Press, Washington, DC.
 10.1128/9781555819071.ch16 (p185-196).

TSCHUDIN-SUTTER S, KUIJPER E, DUROVIC A, VEHRESCHILD M, **BARBUT F**, ECKERT C, FITZPATRICK F, HELL M, NORÉN T, O'DRISCOLL J, COIA J, GASTMEIER P, VON MÜLLER L, WILCOX M, WIDMER A, on behalf of the Committee*

Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings

Clin Microbiol Infect. 2018 Oct;24(10):1051-1054.

Fiche EFFICATT . « *Clostridium difficile* » INRS 2018

5-1-5 Modalités et cibles de diffusion

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

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

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

Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017.

- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à santé publique France et aux Cpias. Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats qui est envoyé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- Site web RAISIN et de Santé Publique France : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>

- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » (http://invs.santepubliquefrance.fr//publications/2006/guide_raisin/conduite_clostridium_difficile.pdf)

5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

F. Barbut, C. Gateau ou J. Couturier ont été régulièrement en contact avec A. Carbonne et M. Colomb-Cotinat (Santé Publique France) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

Ils ont rédigé un article sur l'épidémiologie des infections à *C. difficile* qui résume toutes les sources d'informations permettant d'estimer l'incidence des ICD.

F. Barbut participe aux groupes de travail sur la transplantation fécale pilotés par l'ANSM d'une part et l'Académie de Pharmacie d'autre part. Il est membre du GFTF (Groupe Français de Transplantation Fécale), groupe dirigé par Harry Sokol et créé en 2016. Il est membre du premier Centre de Transplantation de Microbiote Fécal qui s'est créé à l'hôpital saint Antoine sous la responsabilité du Pr Harry Sokol.

5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

- Video « Hemato'K » Diarrhée chez le patient d'hématologie, plateau promotionnel-Astellas 2020
- Video « prévention santé », émission réalisée par Edimark (Février 2021) : Covid-19, prévention de la dissémination des bactéries multirésistantes aux antibiotiques et actualités sur les infections à *C. difficile*

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

6-1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6-1-1 *Clostridium difficile* chez les enfants prématurés : relations avec le microbiote intestinal.

Chez l'adulte, *Clostridium difficile* est un pathogène majeur responsable de diarrhées post-antibiotiques et de colites pseudomembraneuses. Les infections s'accompagnent de modifications du microbiote intestinal (MI). Chez les enfants de moins de 2 ans, le portage asymptomatique de *C. difficile* est très fréquent, mais les infections exceptionnelles. Aucune étude récente n'est disponible sur la colonisation par *C. difficile* et ses relations avec le MI chez le nouveau-né prématuré (NNP),

population particulièrement exposée du fait de traitements antibiotiques et d'un MI en voie de maturation.

Nous avons effectué une étude prospective longitudinale monocentrique incluant 121 NNP. Nous avons observé un taux élevé de colonisation par *C. difficile*, augmentant de 20 % à 61 % entre 1 semaine et 1 mois de vie. Pendant l'hospitalisation, un nombre limité de souches non toxigènes (NTCD) génétiquement reliées ont été isolées. Après la sortie de l'hôpital, les NNP étaient colonisés par une plus grande diversité de souches, à un taux plus faible, incluant des souches toxigènes. Deux clones de souches NTCD appartenant aux PCR-ribotypes (CE)032 et (CE)847 représentaient 78 % des souches. Nous avons émis l'hypothèse que ces clones pouvaient empêcher la colonisation par les souches toxigènes.

Nous avons ensuite recherché la présence de ces deux souches NTCD chez les NNP de deux cohortes multicentriques (N total=247). Nous avons confirmé que les souches (CE)032 et (CE)847 colonisaient des NNP de cadre spatio-temporel varié. Leur rôle protecteur vis-à-vis de l'infection à *C. difficile* (ICD) a été évalué dans un modèle de caecite du hamster due à la souche hypervirulente 027. Le taux d'ICD fatales a chuté de 100 % dans le groupe contrôle à 11 % et 44 % si une souche (CE)032 ou (CE)847 était préalablement administrée aux animaux. La souche (CE)032 prévenait efficacement la colonisation par la souche toxigène, avec seulement 2/9 animaux co-colonisés.

Enfin, nous avons étudié par séquençage à haut débit du gène codant l'ARNr 16S bactérien le MI de NNP appartenant aux deux cohortes multicentriques (N total=599). L' α -diversité était significativement supérieure chez les NNP colonisés par *C. difficile*. La β -diversité différait significativement entre les deux groupes d'enfants, avec une différence plus marquée à 1 mois qu'à 1 semaine de vie. Des taxons appartenant aux familles des *Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae* et *Oscillospiraceae*, ainsi que le genre *Veillonella* étaient significativement associés à la présence de *C. difficile*. Les *Bacteroidales* et *Bifidobacterium breve* étaient significativement associés à l'absence de *C. difficile*. Le risque de colonisation était plus élevé chez les NNP n'ayant pas reçu d'antibiotiques et ayant un âge gestationnel plus élevé.

FERRARIS L, COUTURIER J, ECKERT C, DELANNOY J, BARBUT F, BUTEL MJ, AIRES J.
Carriage and colonization of *C. difficile* in preterm neonates: A longitudinal prospective study.
PLoS One. 2019 Feb 20;14(2):e0212568. doi: 10.1371/journal.pone.0212568. eCollection 2019.
PMID: 30785934 Free PMC article.

COUTURIER J, FRANCONERI L, JANOIR C, FERRARIS L, SYED-ZAIDI R, YOUSSEF A, GATEAU C, HOYS S, AIRES J, BARBUT F.
Characterization of Non-Toxigenic *Clostridioides difficile* Strains Isolated from Preterm Neonates and In Vivo Study of Their Protective Effect.
J Clin Med. 2020 Nov 13;9(11):3650. doi: 10.3390/jcm9113650.

6-1-2 Etude COMBACT-CDI : Etude COMBACT-CDI (Combating Bacterial Resistance in Europe- Clostridium difficile infections) relative à l'épidémiologie des infections à *C. difficile* et leur impact clinique en Europe.

L'étude COMBACT-CDI est une étude non interventionnelle dont les objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire. Cette étude est financée par le programme Innovative Medicines Initiative (European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013))

Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des anaérobies a été chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Cette étude a été réalisée auprès de 22 laboratoires d'établissements hospitaliers. Le principe de cette étude était simple. Il s'agissait d'envoyer un

aliquot de toutes les selles envoyées pour coprocultures au laboratoire (indépendamment de la prescription de *C. difficile*) le 5 juin 2018 et le 9 octobre 2018 au centre hospitalier de Leeds (UK) pour recherche systématique de *C. difficile* et analyse des souches (PCR ribotypage, WGS). Il a ensuite demandé aux laboratoires de compléter, après avoir recueilli le consentement le patient, des données rétrospectives cliniques concernant l'évolution de certains patients infectés par *C. difficile* et de témoins négatifs.

VIPREY VF and al.

Key differences in diagnosis and patient populations between community and in-patients C. difficile infection: results from Combatting bacterial resistance in Europe CDI (COMBACT CDI). Lancet infect Dis. 2021, soumis

6-1-3 Evaluation du test Solana et Sophia (Quidel) pour la détection des souches toxigènes de *C. difficile*

Sofia 2 (Quidel) est un petit analyseur de paillasse qui utilise une détection de fluorescence avancée avec une source d'énergie LED ultraviolette. Le test Sofia 2 *C. difficile* est conçu pour détecter simultanément (mais séparément) la GDH et les toxines de *C. difficile*. Les résultats sont rapportés automatiquement à l'écran et peuvent être stockés dans Sofia 2, éventuellement imprimés sur une imprimante externe.

Quidel fournit également un test d'amplification dépendant de l'hélicase (TAAN) pour *C. difficile* (Solana *C. difficile*) qui détecte le gène *tcdA*.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives,) du test Sofia 2 *C. difficile* et de Solana *C. difficile* par rapport à la culture (pour GDH et NAAT) et la culture toxigène (pour les toxines) (procédures de référence). Cette étude prospective a été réalisée à partir de 400 échantillons de selles diarrhéiques de patients suspects d'infections à *C. difficile*.

Performances of Sophia for GDH detection

Parameter	Estimation (%)	CI 95%
Sensitivity	91.23	[83.88-98.57]
Specificity	96.88	[94.97-98.67]
Positive Predictive Value	82.54	[72.17-91.91]
Negative Predictive Value	98.53	[97.25-99.81]

Performances of Sophia for toxin detection

Parameter	Estimation (%)	CI 95%
Sensitivity	63.41	[48.67-78.16]
Specificity	99.17	[98.24-100-]
Positive Predictive Value	89.68	[78.57-100]
Negative Predictive Value	95.99	[94.00-97.98]

Performances of solana for cdtA detection

Parameter	Estimation (%)	CI 95%
Sensitivity	75.61	[62.46-88.75]
Specificity	99.72	[99.17-100]
Positive Predictive Value	96.88	[90.85-100]
Negative Predictive Value	97.27	[95.60-98.84]

6-1-4 Evaluation multicentrique du Revogene (GenePOC)

Les infections à *Clostridioides difficile* constituent une menace importante pour notre système de santé et des diagnostics rapides et précis sont essentiels pour mettre en œuvre les mesures de prévention et de contrôle des infections. Les tests d'amplification d'acide nucléique sont des outils de diagnostic fiables pour la détection de souches de *C. difficile* toxigènes directement à partir d'échantillons de selles. Dans cette évaluation multicentrique, nous avons déterminé les performances du test Revogene® *C. difficile* sur des échantillons de selles prélevés dans six sites différents en Europe. Les performances du test Revogene® *C. difficile* ont été comparées aux différentes méthodes de diagnostic de routine et, pour un sous-ensemble des échantillons, à la culture toxigénique. Au total, 2 621 échantillons de selles valides ont été testés et le test Revogene® *C. difficile* a montré une sensibilité / spécificité de 97,1% [93,3-99,0] et 98,9% [98,5-99,3] pour l'identification de l'infection à *C. difficile*. Par rapport à la culture toxigénique, le test Revogene® de *C. difficile* a montré une sensibilité / spécificité de 93,0% [86,1-97,1] et 99,5% [98,7-99,9], respectivement. Ces résultats indiquent que le test Revogene® *C. difficile* est une aide robuste et fiable dans le diagnostic des infections à *Clostridioides difficile*.

SAMBRI V, GATEAU C, ZANNOLI S, DIRANI G, COUTURIER J, OP DEN BUIJS I, ROYMANS R, HALLET E., ARNOLD M, ZUMBERHAUS A, STEINER S, VAN DE BOVENKAMP J, ALTWEGG M, BERLINGER L, BARBUT F; revogene *C. Difficile* study group. Diagnosing *Clostridioides difficile* infections with molecular diagnostics: multicenter evaluation of revogene *C. difficile* assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Feb 15. doi: 10.1007/s10096-020-03829-4.

6-1-5 Evaluation de la dissémination environnementale de *C. difficile* à partir des toilettes

Environ 5% des infections associées aux soins sont dues à des microorganismes de l'environnement. Nous avons investigué 2 séries de cas groupés (la première liée à une souche de *Citrobacter freundii* productrice de carbapénémase OXA 48 entre 2016 et 2018 et la seconde liée à une souche de *Legionella pneumophila* en 2016) dont la source probable était les toilettes. Par ailleurs, une autre étude a montré que 11,32% des prélèvements de l'environnement (dont l'air) des chambres de patients ayant une diarrhée à *Clostridium difficile* étaient contaminés par des spores de *C. difficile*. L'objectif de cette étude expérimentale était d'évaluer le rôle potentiel des toilettes dans la dissémination environnementale de ces bactéries lors du tirage de la chasse d'eau. 100 ml d'une suspension de densité comprise entre 2 et 4 McFarland de chacune des bactéries étudiées (*C. freundii*, *C. difficile*, *L. pneumophila*) ont été versés dans le siphon d'une toilette. L'eau du siphon a été aussitôt prélevée et les bactéries ont été numérotées par dilution sériée. Après avoir tiré la chasse d'eau, la contamination environnementale a été évaluée en disposant 15 boîtes de Pétri (milieux sélectifs et spécifiques de chacune des bactéries étudiées) autour des sanitaires à distance variable par rapport à la lunette des toilettes. L'air (1 m³) a été également prélevé par impaction à l'aide d'un

biocollecteur. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37°C pendant une durée et sous des atmosphères adaptées à chacune des bactéries.

Au total, 13 (*C. freundii*) à 15 (*L. pneumophila* et *C. difficile*) séries d'expériences ont été réalisées pour chacune des bactéries. Les prélèvements d'air (n=102) étaient positifs dans 76,7%, 57,2%, et 4% des cas respectivement pour *C. difficile*, *L. pneumophila* et *C. freundii* tandis que les prélèvements de surface (n=615) étaient positifs dans 18,7%, 27,5% et 15,4% des cas. La fréquence de contamination augmentait avec le niveau de contamination des siphons. Si la lunette des toilettes a été fréquemment retrouvée positive, des prélèvements éloignés de plusieurs mètres des toilettes l'étaient également.

Ces résultats expérimentaux montrent que les toilettes génèrent des micro-aérosols de gouttelettes contaminées et sont responsables d'une contamination environnementale dont l'intensité varie selon la nature de la bactérie. Cette observation souligne l'importance d'équiper les toilettes d'abattants et d'informer les patients afin de prévenir cette contamination.

J. COUTURIER, M. RABATE, D. NESA, M. ADAM, L. PRAT, S. JOLIVET, F. BARBUT

Evaluation de la dissémination des bactéries à partir des toilettes : résultats d'une étude expérimentale. Congrès de la Société Française d'Hygiène hospitalière, 2020, présentation orale

6-1-6 Effet du rayonnement UV-C généré par des lampes au xénon sur les spores de *C. difficile* et les BHRé

Dans la gestion des infections associées aux soins, la maîtrise du risque infectieux environnementale est indispensable et nécessite un bio-nettoyage rigoureux. Cette maîtrise est d'autant plus importante vis à vis des Bactéries Hautement Résistantes émergente (BHRé) pouvant amener à une situation d'impasse thérapeutique et vis-à-vis de *Clostridioides difficile*, espèce sporulée particulièrement résistante dans l'environnement. L'utilisation d'un système semi-automatique de désinfection par UV-C en complément du bio-nettoyage classique est de plus en plus courante aux Etats-Unis. Nous avons évalué par la méthode des porte-germes, l'activité bactéricide du dispositif Xenex® (ABmedica®), générant un rayonnement UV-C pulsé généré par une lampe au xénon (PX-UV-C), sur 2 souches de BHRé et sur les spores de *C. difficile*.

Les souches bactériennes utilisées sont des souches cliniques : une *K. pneumoniae* OXA 48, un *E. faecium* Van A et une souche de *C. difficile* de PCR-ribotype 027 épidémique hypervirulent. Deux types de porte-germe ont été évalués : en polychlorure de vinyle (PVC) et en Inox. Les porte-germes ont été utilisés en tant que support des souches. L'activité bactéricide du dispositif a été estimée en comparant les inocula sur les porte-germes exposés et non-exposés aux rayonnements UV-C. Quatre porte-germes (exposés) ont été disposés dans une chambre (table, sol, tête de lit et salle de bain). Le dispositif Xenex® a été disposé successivement sur deux positions. Sur chacune de ces positions, un cycle de désinfection de 5 (Inox) à 10 (PVC) minutes a été effectué. Tous les porte-germes ont été ensuite traités pour être dénombrés. La quantité de bactéries a été comparée à celle d'un porte germe non exposé.

Comme attendu, l'activité bactéricide la plus importante est vis-à-vis de l'entérobactérie, mais reste néanmoins limité (facteur de réduction de l'ordre d'un log10). Cette activité est globalement constante quel que soit le temps d'exposition, le support ou la position du porte-germe dans la chambre.

L'activité retrouvée vis-à-vis de la souche d'ERG est nulle mais cohérente entre nos différents supports.

Le dispositif Xenex® possède une activité sporicide envers *C. difficile*, habituellement difficile à éliminer de l'environnement. Cette activité reste néanmoins assez faible (facteur de réduction de l'ordre de 0,58 log10). L'activité sporicide semble être dépendante de la position du porte-germe.

6-1-7 **Etude DAFNE : Observatoire de l'utilisation de la fidaxomicine en France**

Soutien financier : laboratoire Astellas

La fidaxomicine est un antibiotique macrocyclique utilisé pour les infections à *C. difficile* (ICD). Deux essais de phase 3 randomisés double-aveugle ont montré que la fidaxomicine était non inférieure à la vancomycine pour le traitement des ICD et entraînait significativement moins de récurrences que la vancomycine. Peu de données sont disponibles sur son utilisation en routine en France.

Une étude observationnelle prospective multicentrique longitudinale a été conduite auprès de 27 sites entre septembre 2014 et août 2017. Ont été inclus les patients adultes avec un diagnostic microbiologique d'ICD. Le choix du traitement était laissé à l'initiative du médecin traitant. L'objectif principal était de décrire les caractéristiques des patients traités par fidaxomicine. L'objectif secondaire était d'étudier les caractéristiques des patients non traités par fidaxomicine et qui ont été inclus dans un registre pendant 3 périodes de 1 mois en 2015, 2016 et 2017. Pour les patients recevant la fidaxomicine, un autre objectif secondaire était de préciser le nombre et le délai des récurrences au cours des 3 mois qui ont suivi la fin du traitement.

Au total 447 patients avec une ICD (294 traités par fidaxomicine et 150 recevant un autre traitement) ont été inclus. Les patients traités par fidaxomicine ou une autre molécule étaient immunodéprimés dans respectivement 39.1% et 26% des cas, avaient une récurrence dans 36.3% et 9.3% des cas et une ICD sévère dans 59.2% et de 35.8% des cas. Parmi les 281 patients traités par fidaxomicine et pour lesquels un suivi a été possible, 259 (92.2%) ont été guéris cliniquement et 16.3% ont présenté une récurrence dans les 3 mois qui ont suivi. Les effets indésirables sont survenus dans 40.9% des cas, les effets sévères dans 27.7% des cas mais les effets secondaires liés à la fidaxomicine seulement dans 5.4% des cas.

Cette étude montre qu'en condition réelle d'utilisation, la fidaxomicine s'avère efficace et bien tolérée pour les traitements des ICD, notamment chez les patients immunodéprimés, les patients âgés de plus de 65 ans et les patients ayant une forme sévère d'ICD.

GUERY B, BERGER P, GAUZIT R, GOURDON M, BARBUT F

A prospective, observational study of fidaxomicin use for Clostridioides difficile infection in France

Journal of International Medical Research, 2021, accepté

6-1-8 **Impact de la cellulose microcristalline sur le diagnostic des infections à *C. difficile***

Collaboration avec les laboratoires DA Volterra

Le but de l'étude était d'évaluer l'impact de l'ajout de « cellulose microcristalline » (MCC) (sphères VIVAPUR®) (180 mg / g de concentration finale) sur les méthodes de diagnostic de l'ICD (test immuno-enzymatique [EIA] pour la détection de la glutamate déshydrogénase [GDH]] et des toxines A / B et tests d'amplification des acides nucléiques [TAAN]). Ces billes de microcellulose seront données comme placebo dans un essai de phase III mesurant l'efficacité du DAV 132 dans la prévention des ICD.

Au total, 16 échantillons de selles provenant de patients porteurs de *C. difficile* et 10 contrôles (patients exempts de *C. difficile*) ont été enrichis de cellulose microcristalline pour atteindre une concentration finale de 180 mg / g de selles. Chaque échantillon de selles (positif et négatif) a été divisé en 3 aliquots de 1 g (selles molles) ou 1 ml (selles liquides). Un aliquot a été

mélangé directement avec 180 mg de MCC. Un deuxième aliquot a été mélangé avec 180 µl de tampon phosphate pH6. Un troisième aliquot a été mélangé à 180 MCC pré-incubés dans du tampon phosphate pH 6 pendant 3 heures. Après incubation, l'excès de tampon a été jeté avant de mélanger le MCC dans les selles. Chaque selle a été testée avec le GenXpert C. diff (Cepheid) et le Quick Chek complete EIA (Abbot). Les CT ont été enregistrés pour chaque test d'amplification d'acide nucléique.

Les résultats indiquent que les billes de cellulose microcristalline n'interfèrent pas avec les méthodes diagnostiques immuno-enzymatiques ou moléculaires de *C. difficile*.

6-2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6-2-1 Publications nationales

6-2-2 Publications internationales

SAMBRI V, GATEAU C, ZANNOLI S, DIRANI G, **COUTURIER J**, OP DEN BUIJS I, ROYMANS R, HALLET E, ARNOLD M, ZUMBERHAUS A, STEINER S, VAN DE BOVENKAMP J, ALTWEGG M, BERLINGER L, **BARBUT F**; revogene *C. difficile* study group.

Diagnosing *Clostridioides difficile* infections with molecular diagnostics: multicenter evaluation of revogene *C. difficile* assay.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Jun;39(6):1169-1175.

DAVIES K., DAVIS G., **BARBUT F.**, ECKERT C., PETROSILLO N., PISAPIA R., GÄRTNER B., BERGER FK, REIGADAS-RAMIREZ E., BOUZA E., DEMONT C., WILCOX MH

Factors affecting reported *Clostridium difficile* infection rates; the more you look the more you find, but should you believe what you see?

Anaerobes 2020, Apr;62:102178. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102178. Epub 2020 Feb 22.

LE MARÉCHAL C, GATEAU C, POEZEVARA T, COUTURIER J, ROUXEL S, **ZYED-SAIDI R**, HOUARD E, POURCHER AM, DENIS M, **BARBUT F**.

Characterization of *Clostridioides difficile* strains isolated from manure and digestate in five agricultural biogas plants.

Anaerobe. 2020 Apr;62:102180. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102180. Epub 2020 Feb 21.

GUERY B, **BARBUT F**, TSCHUDIN-SUTTER S.

Diagnostic and therapy of severe *Clostridioides difficile* infections in the ICU.

Curr Opin Crit Care. 2020 Oct;26(5):450-458. doi: 10.1097/MCC.0000000000000753.

DJUIKOUÉ IC, TAMBO E, TAZEMDA G, NJAJOU O, MAKOUJOU D, SOKENG V, WANDJI M, TOMI C, NANFACK A, DAYOMO A, LACMAGO S, TASSADJO F, SIPOWO RT, KAKAM C, DJOKO AB, ASSOBN CN, ANDREMONT A, **BARBUT F**.

Evaluation of inpatients *Clostridium difficile* prevalence and risk factors in Cameroon.

Infect Dis Poverty. 2020 Aug 31;9(1):122. doi: 10.1186/s40249-020-00738-8.

COUTURIER J, FRANCONERI L, JANOIR C, FERRARIS L, **SYED ZAIDI R.**, **YOUSOUF A.**, GATEAU C., HOYS S., AIRES J., **BARBUT F**

Characterization of non toxigenic strains of *C. difficile* isolated from preterm neonates and in vivo study of their protective effect.

Journal of Clinical Medicine, 2020 Nov 13;9(11):3650. doi: 10.3390/jcm9113650

KHANAFER N, HEMMENDINGER A, GUERY B, VACHÉE A, ROGUES AM, GRAVET A, BOUTOILLE D, VANJAK D, **BARBUT F**, VANHEMS P. Establishment of a French surveillance system of *Clostridioides difficile* infection: comparison of patient's characteristics with other national and European data. Anaerobe. 2021 Feb 1;69:102329. doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102329. Online ahead of print

GUERY B, BERGER P, GAUZIT R, GOURDON M, **BARBUT F**
A prospective, observational study of fidaxomicin use for *Clostridioides difficile* infection in France. Journal of International Medical Research, 2021, soumis

VIPREY VF and **COMBACT-CDI study group**

Key differences in diagnosis and patient populations between community and in-patients *C. difficile* infection : results from Combatting bacterial resistance in Europe CDI (COMBACT CDI). Lancet infect Dis. 2021, soumis

DERONGS L, DRUILHE C, LE MARÉCHAL CA, **BARBUT F**, HEURTEVENT L, BUFFET J, MARTIN L, ZIEBAL C, POEZEVARA T, ROUXEL S, HOUARD E, POURCHER AM
Influence of operating conditions on the persistence of indicator bacteria and of two pathogenic clostridia in semi-continuous mesophilic anaerobic reactors
Watste management, 2021 soumis

6-2-3 Communications nationales

LE MARECHAL C, MARAULT M, MARTIN L, **GATEAU C**, POEZEVARA T, **COUTURIER J**, ROUXEL S, **SYED-ZAIDI R**, **YOUSSEUF A**, KOOH P, **BARBUT F**, FIRMESSSE O
Détection et caractérisation de souches de *Clostridioides difficile* d'origines alimentaires et animales en France (DIFALIBO)
Journée de l'ANSES

COUTURIER J., M. RABATE, D. NESA, M. ADAM, L. PRAT, S. JOLIVET, **F. BARBUT**

Evaluation de la dissémination des bactéries à partir des toilettes : résultats d'une étude expérimentale.
31ème Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière
Nantes, 3-5 juin 2020 (congrès reporté mais conférence acceptée)

COURBIN, J. COUTURIER, C. GATEAU, R. SYED ZAIDI, A. YOUSSEUF et F. BARBUT
Détermination du taux de transmission intra-hospitalier de *Clostridioides difficile*
40ème RICAI (live) 14-15 décembre 2020

6-2-4 Communications internationales

COUTURIER J, FRANCONERI L, JANOIR C, FERRARIS L, HOYS S, AIRES J, **BARBUT F**

Nontoxicogenic *Clostridioides difficile* strains against *C. difficile* colonisation: an experimental study
30th ECCMID Paris (France) , 18-21 Avril 2020 (Communication orale acceptée mais congrès reporté)

GUILLEMARD E, POIREL M, SCHÄFER F, QUINQUIS L, ROSSONI C, KEICHER2, FRANK WAGNER C, HANIA SZAJEWSKA H, **BARBUT F**, DERRIEN M, MALFERTHEINER P,
Multi-strain fermented milk promotes gut microbiota recovery after helicobacter pylori therapy: a randomised, double-blind, controlled trial *
International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health
(Communication orale)

N° IPC20-0061, 11/11/2020

LE MARECHAL C., L. MARTIN, C. GATEAU, T. POEZEVARA, J. COUTURIER, S. ROUXEL, M. MARAULT, R. SYED-ZAIDI, P. KOOH, O. FIRMESE, M. CHEMALY, F. BARBUT

Detection and characterization of *Clostridioides difficile* isolated from animals in France

7th International *Clostridioides difficile* symposium (virtual)

Septembre 2020, Poster

6-2-5 Conférences sur invitations

BARBUT F.

Clostridioides difficile infections: how to diagnose? How to treat?

Joint meeting of the SSI and SSHH

Geneva, 2-4 septembre 2020.

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

7-1-1 Collaboration, Dr Le Maréchal, ANSES Laboratoire de Ploufragan : Projet DiaBloClo : Caractérisation de souches de *C. botulinum* et *C. difficile* au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.

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

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

Le projet DiaBoClo a pour objectifs de :

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

Le projet DiaBoClo permettra de connaître les caractéristiques (sensibilité aux antibiotiques, typage des souches via l'utilisation de méthodes de référence et du séquençage des génomes d'une

sélection de souches) des souches de *C. botulinum* et de *C. difficile* qui circulent dans la filière bovine et qui sont susceptibles d'être disséminées dans l'environnement lors de l'épandage des fumiers ou des digestats de méthanisation.

LE MARÉCHAL C, GATEAU C, POEZEVARA T, COUTURIER J, ROUXEL S, ZYED-SAIDI R, HOUARD E, POURCHER AM, DENIS M, BARBUT F.

Characterization of *Clostridioides difficile* strains isolated from manure and digestate in five agricultural biogas plants.

Anaerobe. 2020 Apr;62:102180. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102180. Epub 2020 Feb 21.

PMID: 32092414,

7-1-2 Collaboration avec l'Unité SBCL, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments (ANSES, Olivier Firmesse) et l'Unité HQPAP, laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Dr LeMaréchal) Projet DIFALIBO

Clostridioides difficile est un pathogène émergent depuis le début des années 2000 en santé humaine au niveau mondial, représentant actuellement la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales chez les adultes. Le nombre d'infections à *C. difficile* a également augmenté au niveau communautaire chez des personnes qui ne présentent pas de facteurs de risque classiques. Les sources potentielles de contamination à l'origine des infections à *C. difficile* communautaires considérées à ce jour sont : l'environnement, les animaux, les aliments, les contacts humains. Peu de données sont actuellement disponibles en France concernant les souches de *C. difficile* qui pourraient être retrouvées dans les différents réservoirs de contamination à l'origine des infections humaines communautaires, que ce soit en termes de prévalence ou de caractérisation.

L'objectif du projet DIFALIBO est d'évaluer la prévalence de *C. difficile* dans les aliments impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et dans différents réservoirs animaux. Un total de 564 échantillons d'aliments impliqués dans des TIAC (241 plats cuisinés, 103 végétaux, 78 viandes et ovoproduits, 43 féculents, 43 produits laitiers, 30 produits de la mer, 23 légumes, 3 d'origine inconnue) et de 1033 échantillons de fèces d'animaux (130 bovins, 567 porcs, 83 animaux de compagnie, 190 volailles, 33 cliniques, 30 dans un élevage multi-filière) ont été testés par méthode culturale. Les souches ont été caractérisées par PCR ribotypage (PR), par PCR multiplex pour les différents facteurs de virulence (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*), et leur sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par diffusion en milieu gélosé. *C. difficile* a été détecté dans 1 aliment (0,17%) (fromage au lait cru de vache) et dans 218 (21,1%) échantillons d'origine animale. Dix isolats (à partir de l'aliment contaminé) et 99 isolats d'origine animale ont ensuite été caractérisés par le CNR *C. difficile*. Pour le fromage au lait cru, les 10 isolats prélevés ont tous les mêmes caractéristiques indiquant probablement la présence d'une seule souche dans cet aliment. Cette souche possède les gènes codant pour les toxines A, B et binaire, appartient au PCR-ribotype 126 (PCR-ribotype retrouvé également en santé humaine), est sensible à la vancomycine, au métronidazole et à la moxifloxacine, et présente une résistance à l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. Pour les isolats d'origine animale, toutes les souches présentent le gène codant pour la toxine A, 96 % le gène codant pour la toxine B (souches appartenant au toxinotype 11) et 73% le gène codant pour la toxine binaire. Les PCR-Ribotypes 126 et 78 sont les ribotypes majoritaires retrouvés dans les échantillons d'origine porcine (81%), les PCR-ribotypes retrouvés chez les autres espèces animales sont beaucoup plus variables. Toutes les souches sont sensibles à la vancomycine

et au métronidazole, 38% sont sensibles à l'érythromycine, 4 % à la clindamycine, 81% à la moxifloxacine et 36 % à la tétracycline.

Cette étude est la première réalisée à partir de l'analyse d'aliments impliqués dans des TIAC et la première en France portant sur l'évaluation des animaux comme réservoir de *C. difficile*.

LE MARECHAL C, MARAULT M, MARTIN L, GATEAU C, POEZEVARA T, COUTURIER J, ROUXEL S, SYED-ZAIDI R, YOUSSEF A, KOOH P, BARBUT F, FIRMESE O. *Prévalence et caractérisation des souches de Clostridioides difficile d'origines alimentaires et animales en France (DIFALIBO)*. Journée Interne ANSES, 2020 .

7-1-3 Soumission d'une ANR par le Dr O. FIRMESE (département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments) : projet CLOSTABAT (« Characterization of the Clostridium perfringens and Clostridium difficile hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses »).

Le laboratoire *C. difficile* associé au CNR des anaérobies est responsable d'un WP.

7-1-4 Projet de thèse de sciences avec le Dr Poquet Isabelle (Institut Micalis, INRAe, Domaine de Vilvert, Bât 442, 78352 Jouy-en-Josas Cedex) sur : « Clostridioides difficile chez les Equidés : rôle des biofilms dans la colonisation, le portage asymptomatique ou la virulence, et la persistance des infections » (CLODIFFEQUI).

Clostridium difficile est un entéro-pathogène anaérobie strict et sporulant de l'homme et des animaux qui émerge après un traitement antibiotique et cause des diarrhées et colites via ses toxines. La capacité des souches toxigènes à coloniser et à persister sans symptôme, qui pourrait impliquer des biofilms, pose des problèmes de rechutes et de dissémination. Dans un projet en cours avec l'Anses, des souches sont isolées des contenus intestinaux de #150 équidés autopsiés, leur profil toxigène ou non déterminé. Un diagnostic d'infection permet d'établir leur virulence in vivo, et de les classer en trois groupes ('non toxigènes', 'toxigènes portées' ou 'toxigènes causes d'infection'). La thèse débutera par le séquençage des génomes des souches, l'analyse des gènes de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilms, et l'évaluation, par comparaison aux souches d'origine humaine, de leur potentiel de transmission zoonotique. Les souches seront ensuite étudiées i) pour leur capacité à former de biofilms in vitro, ainsi que ii) pour leur mode de colonisation in vivo observé in situ, dans l'intestin de leur hôte équidé, mais aussi iii) du modèle souris mono-associées à trois souches, représentatives des groupes. Le projet permettra d'évaluer le rôle des biofilms dans le cycle de *C. difficile*, la colonisation, le portage et la persistance des infections.