



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Laboratoire associé au CNR
Clostridium difficile



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

*
* *

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2020 Année d'exercice 2019

CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme
Nadine DELARUE, Laure DIANCOURT, Julie GERMOND, Malika GOUALI, Christelle MAZUET, Jean SAUTEREAU

Laboratoire associé *Clostridium difficile*
Frédéric BARBUT, Cécile GATEAU, Jeanne COUTURIER

Septembre 2020

SOMMAIRE

Résumé analytique (version française)	6
Résumé analytique (version anglaise)	7
<u>Livre I RAPPORT ANNUEL DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME.....</u>	<u>8</u>
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 2019	9
2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses.....	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>Clostridium 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>Clostridium difficile</i>). 17	17
3-1-2-1 Souches d'origine humaine.....	17
3-1-2-2 Investigations de TIAC à <i>Clostridium perfringens</i> et <i>Bacillus cereus/cytotoxicus</i>	20
3-1-2-3 Souches d'origine vétérinaire.....	21
3-1-2-4 Souches d'origine alimentaire.....	21
3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (hormis <i>Clostridium difficile</i>)	22
3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	24
3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisée	24
4- ALERTE.....	24
5- ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	25
5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	25
5-1-1 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé.....	25
5-1-2 Activités de conseils aux professionnels de santé	25
5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	25
5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public)	25
6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR. 26	26
6-1 Activités de recherche	26
6-1-1 Activités de recherche sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i>	26

6-1-2	Activités de recherche sur les bactéries anaérobies.....	28
6-2	Publications et communications 2019	29
6-2-1-1	Publications nationales	29
6-2-1-2	Publications dans des revues internationales à comité de lecture	29
6-2-1-3	Congrès, workshops, séminaires.....	29
7-	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	30
8-	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2020-2021	31
8-1	Bactériologie anaérobie.....	31
8-1-1	Expertise en bactériologie anaérobie	31
8-1-1-1	Identification et typage des souches de bactéries anaérobies	31
8-1-1-2	Typage toxinique des souches de bactéries anaérobies.....	31
8-1-1-3	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies notamment Bacteroides du groupe fragilis.....	32
8-1-1-4	Projet ToxDetect : Development and harmonization of innovative methods for comprehensive analysis of food-borne toxigenic bacteria, ie. Staphylococci, Bacillus cereus and Clostridium perfringens	32
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	33
8-2	Botulisme.....	34
8-2-1	Diagnostic du botulisme	34
8-2-2	Développement de nouvelles méthodes de mise en évidence et de caractérisation des toxines botuliques	34
9-	TABLEAUX.....	35
10-	ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	47
10-1	Missions et objectifs majeurs.....	47
10-2	Equipe	47
10-3	Locaux et équipements.....	47
10-3-1	Locaux	47
10-3-2	Equipements	49
10-4	Collections de matériel biologique	49
10-5	Démarche qualité.....	50
11-	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	52
11-1	Liste des techniques de référence	52
11-2	Collection de souches et sérums de référence	52
12-	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS.....	54
12-1	Permanence du CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme.....	54
12-2	Autorisation MOT.....	54
12-3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	54
12-4	Résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo	54
12-5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N.....	54
12-6	Autres remarques à destination du comité des CNR	55
	Livre II RAPPORT ANNUEL DU LABORATOIRE associe <i>Clostridium difficile</i>	56
1-	MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE	57
2-	ACTIVITES D'EXPERTISE	57
2-1	Evolution des techniques au cours de l'année 2019	58
2-2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses.....	58

2-3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	58
2-4	Collections de matériel biologique.....	58
2-5	Activités d'expertise.....	58
2-6	Activités de séquençage.....	59
3-	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	59
3-1	Description du réseau partenaire.....	59
3-2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	60
3-3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	66
3-4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	67
3-4-1	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France	67
3-4-2	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens.....	68
3-4-3	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens.....	68
3-4-4	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	68
4-	ALERTE.....	69
5-	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	70
5-1	Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	70
5-1-1	Enseignements sur <i>C. difficile</i>	70
5-1-2	Activités de Formations continues.....	71
5-1-3	Stagiaires accueillis.....	71
5-1-4	Liste des guides élaborés.....	72
5-1-5	Modalités et cibles de diffusion.....	72
5-2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	73
5-3	Conseil et expertise pour d'autres cibles.....	73
6-	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS.....	74
6-1	Activités de recherche.....	74
6-1-1	Etude GenePOC.....	74
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.....	74
6-1-3	Comparaison de deux tests rapides immuno-chromatographiques pour la détection de la GDH et des toxines de <i>C. difficile</i>	75
6-1-4	Evaluation de la dissémination environnementale de <i>C. difficile</i> à partir des toilettes.....	75
6-1-5	Etude des souches non toxigènes de <i>C. difficile</i> pour la prévention primaire des ICD	76
6-1-6	Comparaison génomique des variants des souches de <i>Clostridioides difficile</i> de PCR ribotype O27.....	77
6-1-7	PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de <i>C. difficile</i> isolées dans une population de prématurés.....	78
6-1-8	Etude DAFNE : Observatoire de l'utilisation de la fidaxomicine en France.....	78
6-1-9	Microbiological support to European surveillance of <i>Clostridium difficile</i> infections (2016-2019).....	79
6-2	Liste des publications et communications.....	79
6-2-1	Publications nationales.....	79
6-2-2	Publications internationales.....	79
	Communications nationales.....	81
6-2-3	Communications internationales.....	81
6-2-4	Conférences sur invitations.....	81

6-2-5	Chapitres de livres.....	82
7-	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	83
7-1	Projet DiaBloClo : Caractérisation de souches de C. botulinum et C. difficile au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.....	83
7-2	Projet DIFALIBO.....	84
8-	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2020-2021	85
8-1	Apport du whole genome sequencing (WGS) dans l'épidémiologie des infections à Clostridium difficile.	85
8-2	Clostridium difficile chez les enfants prématurés : relations avec le microbiote intestinal.	86
8-3	Evaluation du test Solana et Sophia pour la détection des souches toxigènes de C. difficile	89
8-4	Mise au point et apport du typage CRISPR à l'étude épidémiologique de Clostridioides difficile	89
8-5	Portage asymptomatique de C. difficile : prévalence, facteurs de risque et relations avec le microbiote intestinal.....	90
9-	ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE.....	92
9-1	Missions et objectifs majeurs du laboratoire associé	92
9-2	Organisation du laboratoire associé Clostridium difficile	92
9-3	Locaux et équipements du laboratoire associé	92
9-3-1	Locaux	92
9-3-2	Equipements	93
9-3-3	Collections de matériel biologique	94
9-4	Démarche qualité.....	94
10-	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE ASSOCIE	95
10-1	Liste des techniques de référence	95
10-2	Liste des techniques recommandées.....	95
11-	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS.....	96
11-1	Permanence du laboratoire associé Clostridium difficile.....	96
11-2	Autorisation MOT.....	96
11-3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	96
11-4	Résultats de recherches non encore publiés ou en préparation	96
11-5	Difficultés rencontrées par le laboratoire associé	96

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 *Clostridium difficile* assurent la surveillance du botulisme, des infections à *C. difficile*, ainsi que l'identification de souches de bactéries anaérobies.

En 2019, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 138 échantillons de sérum, 114 selles et 60 échantillons alimentaires (contre 21 en 2018). Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 9 foyers confirmés (et 5 foyers suspects) de botulisme impliquant 11 cas (et 7 cas suspects) ont été identifiés. 13 patients ont été hospitalisés dont 9 en service de réanimation.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (7 foyers confirmés sur 9, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 3 foyers suspects bien que non confirmés). Deux foyers (2 cas) de botulisme infantile ont également été identifiés. Deux fortes suspicions cliniques de deux foyers (2 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection de Botox à visée thérapeutique n'ont pas pu être confirmées biologiquement.

Deux foyers (2 cas) de botulisme infantile ont également été confirmés à l'étranger (en Colombie et au Maroc) sans notion que ces deux enfants aient voyagés en France avant l'apparition de leurs symptômes et/ou aient été pris en charge en France pour leur botulisme.

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (5 foyers sur 6). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour deux foyers uniquement. Il faut souligner cette année une plus grande proportion d'aliments commercialisés suspectés et/ou confirmés d'être la source de contamination : 4/7 foyers confirmés et 2/5 foyers suspects.

En 2019, 261 souches ou prélèvements primaires pour recherche de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR. Les 141 souches d'origine humaine identifiées se répartissent en 29 genres différents, 50 espèces nommées et 9 souches représentant de nouvelles espèces potentielles. Bien que les bactéries anaérobies restent en général sensibles aux traitements antibiotiques, le suivi de l'évolution de la résistance effectué par le CNR confirme que certaines espèces (particulièrement les *Bacteroides* du groupe *fragilis*) deviennent de plus en plus résistantes notamment aux bêta-lactamines incluant les carbapénèmes.

De façon très marquante cette année, le CNR a été fortement sollicité en première intention pour orienter, identifier et isoler des germes anaérobies à partir de prélèvements primaires humains et caractériser finement les souches isolées dans le cadre de 12 TIAC à *Clostridium perfringens* et ou *Bacillus cereus* survenues dans des EHPAD (8), des unités militaires (2), un restaurant d'entreprise (1) ou repas familial (1) : 76 prélèvements de ce type reçus en 2019.

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

Au cours de l'année 2018, 343 prélèvements ont été reçus par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 319 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxigènes ; 4% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 2 autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 014/020/077 (24%) et le 002 (6%).

L'année 2018 a été marquée par une diminution du nombre de souches 027 épidémiques reçues par le CNR. Seules 7 souches épidémiques ont été caractérisées. Elles provenaient de 6 départements. Cette diminution peut en partie être expliquée par l'utilisation de plus en plus importante par les laboratoires du test GeneXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive des souches 027.

RESUME ANALYTIQUE (VERSION ANGLAISE)

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

In 2019, the CNR proceeded to the biological diagnosis of human botulism from 138 serum, 114 stools and 21 food samples. The number of outbreaks and cases of botulism observed in France this year is fairly "standard": 9 confirmed outbreaks (and 5 suspicious ones) of botulism involving 11 cases (and 7 suspected cases) have been identified. 13 patients were hospitalized including 9 in intensive care unit. Food-born botulism remains the most common form (7 confirmed outbreaks out of 9, and strong suspicion of a food origin for 3 suspected although unconfirmed outbreaks). Two outbreaks (2 cases) of infant botulism type B has also been identified. Two strong clinical suspicions of outbreaks (2 cases) of iatrogenic botulism type A following therapeutic Botox injection could not be confirmed. Two outbreaks (2 cases) of infant botulism were also confirmed abroad (in Colombia and Morocco) without any notion that these two children had traveled to France before the onset of their symptoms and / or were treated in France for their botulism.

As is usual in France, most of the food-born outbreaks were of type B (5 out of 6 outbreaks). The contaminated food could be confirmed for only two outbreaks. It should be noted this year a greater proportion of marketed foods suspected and/or confirmed to be the source of contamination: 4 out of 7 confirmed outbreaks and 2 out of 5 suspected ones.

In 2019, 261 strains or primary samples for testing for anaerobic bacteria were recorded by the NRC. The 141 strains of human origin identified fall into 29 different genera, 50 named species and 9 strains representing potential new species.

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 becoming increasingly resistant, in particular to beta-lactams including carbapenems.

The NRC was frequently requested in first intention to guide, identify and isolate anaerobic bacteria from human primary samples and to characterize in detail the strains isolated in the context of 12 food-poisoning outbreaks with *Clostridium perfringens* and/or *Bacillus cereus* occurring in nursing homes (8), military units (2), a company restaurant (1) or family meal (1): 76 samples of this type received in 2019.

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

In 2018, 343 samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 319 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 4% were identified as PCR-ribotype 027. The 2 other predominant PCR-ribotypes were 014/020/077 (24%) and 002 (6%).

This year was marked by a decrease in the number of epidemic 027 strains received by the NRL. Only 7 epidemic strains from 6 departments have been characterized. This decrease can be partly explained by the increasing use of the GeneXpert assay for *C. difficile* (Cepheid) which allows a presumptive identification of 027 strains.

LIVRE I

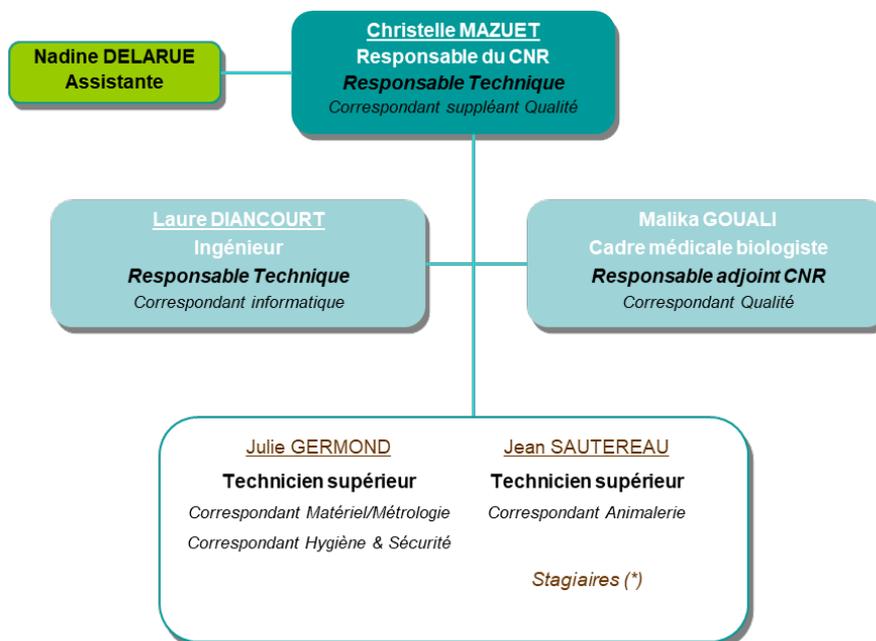
CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



1-MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME

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

Organigramme 2019 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 2019 en termes de production d'expertise

- 2 fortes suspicion de cas de botulisme iatrogène de type A
- 1 cas grave de botulisme alimentaire en lien avec un aliment industriel
- 60 aliments analysés (+200% par rapport à 2018)
- 12 Investigations de TIAC souvent graves à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus*
- 44 % des souches humaines 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 2019

Pour faire face aux demandes répétées de recherche de *Clostridium perfringens* entérotoxigène et/ou *Bacillus cereus* dans les selles et aliments suspects dans le cadre d'investigations de TIAC, le CNR a mis au point deux PCR temps réel ciblées sur les gènes de virulence caractéristiques de ces espèces. Cette approche permet d'orienter très rapidement, et avant l'isolement des germes, vers l'agent causal et de recentrer l'enquête alimentaire en particulier.

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 *Clostridium difficile*)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés en 2019 sont donnés dans le tableau suivant :

ORIGINE	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
Humaine	141 (217)
Vétérinaire	10 (13)
Alimentaire	25
Environnementale	1
Autres (collections, EIL...)	5
TOTAL	182 (261)

Soit un nombre équivalent de **souches isolées** envoyées par les laboratoires de biologie médicale par rapport à l'année précédente (141 en 2019 vs 128 en 2018).

En 2019, le CNR a par contre été très sollicité en première intention pour orienter, identifier et isoler des germes anaérobies à partir de **prélèvements primaires** humains dans le cadre de TIAC : 76 prélèvements de ce type reçus en 2019 (73 également en 2018 vs 16 en 2017).

La tendance observée en 2018 se confirme donc en 2019 d'une modification des besoins des laboratoires auxquels le CNR s'adapte pour répondre au mieux à la demande des cliniciens, vétérinaires et autorités de santé en terme de diagnostic biologique des pathologies à bactéries anaérobies strictes ou facultatives.

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 2019, le détail du délai de rendu de résultats écrits figure dans le tableau ci-dessous.

Délais de rendu de résultats écrits:
SOUCHES HUMAINES

	Identification et/ou toxinotypage	Antibiogramme +/- Identification
Réponse en 0-7 jours:	98 (62%)	24 (56%)
Réponse en 8-14 jours:	38 (24%)	15 (35%)
Réponse en 15-21 jours:	20 (12%)	1 (2%)
Réponse > 21 jours:	3 (2%)	3 (7%)

TIAC à *C.perfringens* EHPAD Lherm (n=11)
(Isolement + WGS + MLST)

Reprises

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

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2019 est le suivant:

Botulisme humain		
	sérums (recherche de toxine botulique)	138
	selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>)	114
	liquides gastriques	3
	sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	16
Echantillons agro-alimentaires		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	60
	autres	36
Echantillons environnementaux		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	0
	autres	8
Botulisme animal		
	échantillons biologiques	143
Echantillons d'aliment pour animaux		
	échantillons	133
TOTAL		597

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 2019, le CNR a ainsi séquençé le génome complet de la quasi-totalité (155/182 soit 85% des souches 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 de cette façon l'intégralité des souches de bactéries anaérobies reçues au CNR et de s'affranchir ainsi des techniques fastidieuses et chronophages de PCR classiques pour l'identification et le toxintypage est quasiment atteint. Les échecs de séquençage régulièrement rencontrés l'an dernier ont été en grande partie résolus en changeant de kit d'extraction d'ADN.

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 CNRs 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 2019, 21 souches de *Clostridium botulinum* ont pu être séquencées (cf. 2-6-1).

Nous avons également régulièrement eu 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 2019 en termes de surveillance du botulisme

2 fortes suspicion de cas de botulisme iatrogène de type A
1 cas grave de botulisme alimentaire en lien avec un aliment industriel
60 aliments analysés (+200% par rapport à 2018)

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 2019**

En 2019, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 138 échantillons de sérum, 114 selles et 60 échantillons alimentaires (contre 21 en 2018). Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 9 foyers confirmés (et 5 foyers suspects) de botulisme impliquant 11 cas (et 7 cas suspects) ont été identifiés. 13 patients ont été hospitalisés dont 9 en service de réanimation.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (7 foyers confirmés sur 9, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 3 foyers suspects bien que non confirmés).

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

Deux fortes suspicions cliniques de deux foyers (2 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection de Botox à visée thérapeutique n'ont pas pu être confirmées.

Deux foyers (2 cas) de botulisme infantile ont également été confirmés à l'étranger (en Colombie et au Maroc) sans notion que ces deux enfants aient voyagés en France avant l'apparition de leurs symptômes et/ou aient été pris en charge en France pour leur botulisme.

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

Année	Foyers (cas) déclarés
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)
2009	25 (10)

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (5 foyers sur 6). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour deux foyers uniquement. Il faut souligner cette année une plus grande proportion d'aliments commercialisés suspectés et/ou confirmés d'être la source de contamination : 4/7 foyers confirmés et 2/5 foyers suspects.

Description détaillée des foyers (Tableau 7-Chapitre 9)

- un foyer (2 cas graves) pour lequel la présence de toxine botulique *botulinum* de type A à un titre faible (20 DL/g) a été mise en évidence dans les selles d'un des deux patients. La recherche de toxine botulique dans les sérums n'a pas pu être réalisée faute de volume suffisant disponible avant injection des anti-toxines. Les recherches de toxine botulique et de *Clostridium botulinum* dans les selles et liquides gastriques des deux patients étaient négatives. La consommation d'un bocal de

soupe (Butternut, poudre d'amande curcuma, poireaux) de préparation familiale serait à l'origine de ce cas sans qu'aucune analyse n'est pu être réalisée sur cette soupe, en absence de restes disponibles.

- un foyer (1 cas confirmé + 1 cas suspect) avec détection de *Clostridium botulinum* de type B dans les selles d'un des patients. Une souche de *C. botulinum* de type B1 a également été isolée. 1 autre cas est suspecté dans la communauté de Défense, même unité de temps et de lieu sans confirmation possible les prélèvements biologiques ayant été réalisés très à distance du début des symptômes. Une exposition commune au mess militaire pourrait être à l'origine de ces cas, sans preuve biologique, les plats des repas n'étant plus disponibles pour analyse.

- un foyer (1 cas grave) avec détection de toxine botulique de type B dans le sérum du patient. L'enquête alimentaire menée autour de ce cas n'a pas permis de remonter à la source de contamination potentielle.

- un foyer (1 cas grave) de type B lié à la consommation d'une conserve familiale de haricots plats. Les 4 bocaux de la même date de préparation étaient contaminés par *Clostridium botulinum* de type B. Deux contenaient de la toxine botulique à un titre très élevé (20 000 et 200 000 doses létales souris/g), les deux autres n'en contenaient pas ou nettement moins (4 DL/ml). Les analyses réalisées à partir des prélèvements biologiques du patient (sérum, écouvillon rectal puis selles) n'ont pas été contributives. Une souche de *Clostridium botulinum* de type B2 a été isolée à partir d'un bocal de haricots. Cette observation est assez inhabituelle, les cas de botulisme associés à la consommation de haricots verts étant généralement de type A : le lieu de culture (ces conserves ont été réalisées avec des haricots plats achetés dans le commerce en France mais provenant du Maroc) pourrait expliquer cette différence.

- un foyer (1 cas) pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans le sérum et *Clostridium botulinum* de type B4 dans les selles du patient. L'aliment suspecté d'être à l'origine de ce cas est de la viande des grisons emballée sous vide et d'origine industrielle. L'analyse de 18 échantillons de ce produit n'a pas permis de confirmer cette suspicion.

- un foyer (1 cas grave) pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans le sérum du patient. La notion de préparation et de consommation de conserves familiales de harengs a été rapportée. Celles retrouvées par un membre de la famille au domicile du patient étaient de « mauvaise qualité » et ont été jetées avant analyse.

- Un foyer (1 cas grave) de type A lié à la consommation d'une soupe industrielle à durée de conservation courte, consommée après la date de péremption et massivement contaminée (10 000 doses létales souris/ml). 22 autres aliments contenus dans le frigo du patient étaient négatifs. Une même souche de *Clostridium combesii* (apparentée à *Clostridium botulinum*) dépourvue de gène de neurotoxine et non toxique a été isolée du reliquat de soupe consommée et des selles du patient. Une approche métagénomique réalisée au Pôle de Génotypage des Pathogènes de la CIBU nous a permis de détecter la présence du gène de la neurotoxine de type A5 dans la soupe et ainsi de sous-typier ce cas en absence de souche neurotoxino-gène isolée.

- Le botulisme alimentaire a été suspecté cliniquement dans 3 foyers (5 cas), mais n'a pas été clairement confirmé par la recherche de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* dans les sérums et/ou les prélèvements de selles et alimentaires. Un pâté de Pâques (œuf, viande de porc et veau, muscade, persil) fabriqué par un traiteur dans un foyer (3 cas) et de nombreux produits avariés retrouvés au domicile pour un autre ont été considérés comme potentielle source contaminante. Pour le troisième foyer suspect l'enquête alimentaire n'a pas permis d'identifier d'aliment à risque.

Enfin, il faut souligner cette année deux suspicions cliniques de botulisme iatrogène consécutive à l'injection de toxine botulique de type A à visée thérapeutique, dans les muscles inférieurs et la vessie chez un patient tétraparétique dans un cas, dans l'estomac pour le second dans le cadre d'un traitement contre l'obésité réalisé en Egypte (cf *Iatrogenic outbreak in Egypt due to Couterfeit Botulinum Toxin A preparation-A Descriptive Series of 9 patients and Outcome. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2018,123,622-627*). La toxine botulique n'a pas été détectée dans le sérum de ces deux patients. La première suspicion en France d'un tel cas a été signalée l'an dernier sans confirmation biologique et faisait suite à l'injection de Botox à visée esthétique.

Les deux cas de botulisme infantile diagnostiqués en 2019 ont concernés une petite fille de 5 mois et un petit garçon de 8 mois colonisés par *Clostridium botulinum* de type B. Le premier enfant était strictement allaité par sa mère, sans notion de consommation de miel ou de tisanes, ni de travaux dans l'environnement proche. Les 10 aliments consommés chez la nourrice ou les parents par le deuxième cas étaient tous négatifs. Il n'a pas été rapporté non plus de consommation de miel ou de tisanes par cet enfant. La notion de travaux en cours face au domicile des parents 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.

Diagnostic différentiel des affections avec un tableau de paralysie flasque et/ou de trouble dysautonomique

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 2019, 25 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Lambert-Eaton, Miller Fisher), de polyradiculonévrites chroniques, de myasthénies ou d'intoxication à l'atropine. 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, cinq demandes d'analyse de botulisme nous ont été adressées dans le cadre d'une recherche de causes de mort inexplicées de nourrissons (vs 10 en 2018 et 9 en 2017). Ces analyses se sont à nouveau toutes révélées négatives (Tableau 6 – 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 11 – chapitre 9).

Un total de 13 échantillons de sérum a été analysé en 2019, et la présence d'anticorps neutralisants a été détectée dans 2 d'entre eux vis-à-vis de la toxine botulique A et aucun vis-à-vis de la toxine botulique B.

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 9 et 10 – chapitre 9

3-1-1-4 *Botulisme animal*

Le diagnostic du botulisme animal est de plus en plus 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 12 – chapitre 9

Botulisme bovin. Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2019, un total de 57 échantillons (foie, rumen, contenu intestinal) représentant 18 foyers ont été analysés. Le botulisme de type mosaïque D/C a été confirmé dans 6 foyers.

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 2019, un total de 60 échantillons représentant 16 foyers ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 12 foyers. Cette année encore les souches de *Clostridium botulinum* des oiseaux sauvages correspondent toutes au type mosaïque C/D, c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D (Tableau 12). Les souches de *C. 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 2019, 5 échantillons provenant de 5 élevages ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 4 élevages. Le type C/D de botulisme chez les oiseaux d'élevage est identique à celui retrouvé chez les oiseaux sauvages (Tableau 12). On peut s'interroger sur une transmission possible du botulisme entre oiseaux sauvages et oiseaux d'élevage. Mais, l'apparition du botulisme des oiseaux sauvages est très saisonnière, majoritairement en période chaude, été et début d'automne, alors que le botulisme survient de façon plus continue au cours de l'année dans les élevages de volailles.

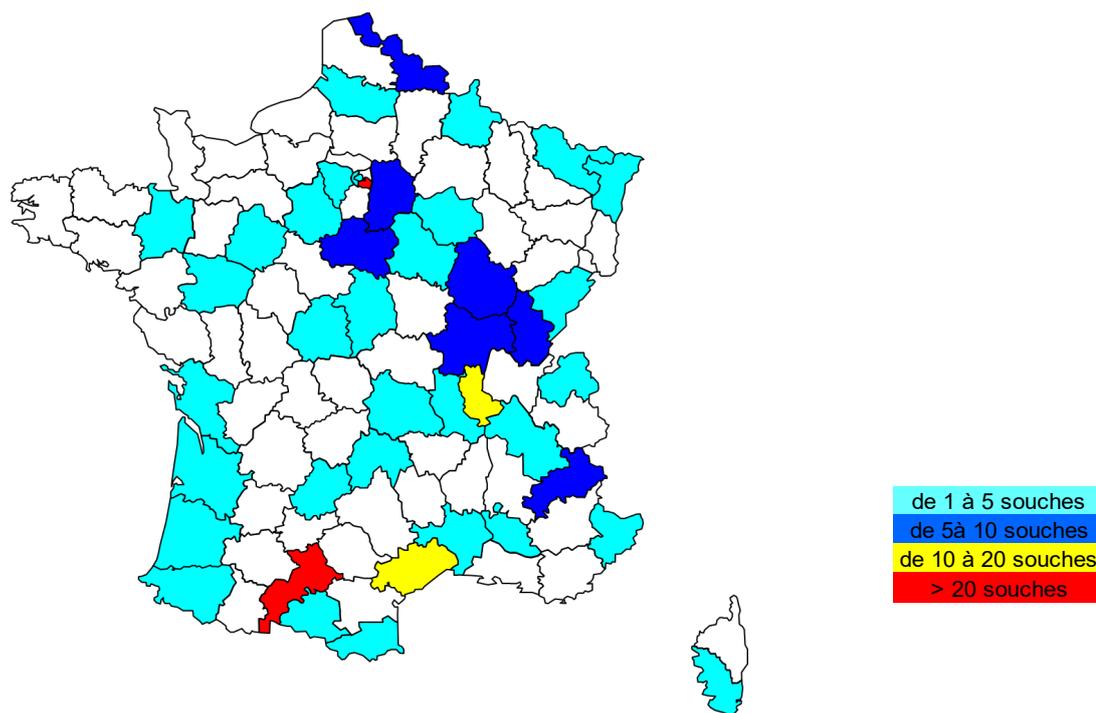
3-1-2 *Surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis Clostridium difficile)*

Éléments clefs de l'année 2019 en termes de surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis Clostridium difficile)

12 Investigations de TIAC souvent graves à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus*
44 % des souches humaines 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 2019 est présentée ci-dessous.



Quarante-quatre départements métropolitains ont envoyé 217 souches isolées ou prélèvements primaires d'origine humaine au CNR dont 62 (44 % du total) par les laboratoires de la Haute Garonne dans le cadre de l'investigation de la TIAC de l'EHPAD de Lherm. Les départements ultra-marins envoient également des souches régulièrement pour identification, toxinotypage ou antibiogramme (6 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	77	140	217
Sex ratio H/F			0,55
Age			
moyenne	61	68	65
médiane	68	81	75
intervalle	0-96	0-98	0-98

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
Coproculture	109
Hémoculture	36
Infections intra-abdominales	16
Urologie / néphrologie	4
Infections ORL	1
Infections ostéo-articulaires	5
Gynécologie	6
Sperme	1
Infections cutanées et musculaires	3
Système nerveux central	1
Pneumologie	2
Appareil digestif	4
Abcès, pus, plaies	9
Divers	20
TOTAL	217

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement de coprocultures (109 dont **76 étaient des prélèvements primaires**), d'hémocultures (36), d'infections intra-abdominales (16) et urinaires (12). Le reste des souches provenaient de différentes localisations : abcès, pus, plaies et autre infections cutanées et musculaires, infections ostéo-articulaires, gynécologie, sperme ...

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté : 64/137 souches soit 46.7%.

Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* /*Parabacteroides*/*Prevotella* (22 souches), *Bacillus* (15 souches), les bacilles Gram + non sporulés (*Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, ...) (15 souches), les coques à Gram + (*Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Peptoniphilus*...) (7 souches) et les coques à Gram négatif (*Negativicoccus*, *Dialister* ...) (7 souches.) – cf Tableau 2 (chapitre 9)

Au total les 137 souches identifiées se sont réparties en 29 genres différents de bactéries anaérobies.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 2 chapitre 9. Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage, caractérisation de la pathogénicité et/ou identification.

Apport du séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

L'augmentation exponentielle du nombre d'espèces bactériennes décrites depuis quelques années impose de plus en plus souvent le recours à l'identification par séquençage de l'ADNr 16S. C'est plus particulièrement le cas dans le groupe des bactéries anaérobies facultatives *Actinomyces* et *Bifidobacterium*, et également chez des bactéries d'origine environnementale retrouvées dans les plaies etc... (*Clostridium*...).

L'identification bactérienne a beaucoup évolué ces dernières années grâce notamment à la technique MALDI-TOF MS qui est maintenant largement répandue au niveau des plates-formes techniques des hôpitaux et des regroupements de LBM privés. Cette technique en termes de coût et de rapidité présente un grand intérêt pour la prise en charge du patient. Plusieurs fabricants se partagent le marché et la performance des matériels qui opèrent cette technique dépend de la qualité des bases de données de profils MALDI.

3-1-2-3 *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>	6
<i>Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum</i>	1
<i>Paraggethella hongkongensis</i>	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1
TOTAL	10

Le CNR a également reçu deux prélèvements primaires pour recherche de *Clostridium perfringens*.

3-1-2-4 *Souches d'origine alimentaire*

En 2019, le CNR a identifié 25 souches d'origine alimentaire isolées par le CNR à partir de prélèvements alimentaires dont 11 souches en lien avec une TIAC à *Clostridium perfringens* entérotoxigène.

ESPECE	NOMBRE
<i>Clostridium perfringens</i> *	11
<i>Clostridium botulinum</i> **	1
<i>Clostridium combesii</i>	1
<i>Bacillus cereus</i> ***	6
<i>Bacillus cytotoxicus</i> ***	4
<i>Lactobacillus sakei</i>	1
<i>Clostridium tetani</i>	1

* : en lien avec un foyer de TIAC à *C. perfringens*

** : en lien avec un foyer de botulisme

*** : en lien avec un foyer de TIAC

La souche de *Lactobacillus sakei* a été isolée par le CNR à partir d'un complément alimentaire qui avait été envoyé pour détection de présence de *Clostridium difficile*.

La souche de *Clostridium tetani* a été isolée par le CNR à partir de miel envoyé dans le cadre d'une recherche de botulisme sur un enfant de 4 mois (recherche négative). La souche isolée présente le gène de la neurotoxine tétanique.

La souche de *Clostridium combesii* a été isolée par le CNR à partir de soupe industrielle à durée de conservation courte identifiée comme source de contamination dans un cas de botulisme. Cette souche est dépourvue de gène de neurotoxine et non toxique.

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

En 2019, parallèlement aux tests phénotypiques et à l'identification par analyse de la séquence ARNr 16S, le CNR a testé la sensibilité de 87 souches (contre 59 en 2018). En septembre 2019, le CNR a décidé que la réalisation d'un antibiogramme se fera dorénavant 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 béta-lactamases 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*).

Sur les 87 souches testées, 76 souches sont d'origine humaine (dont 7 souches de *C. botulinum*), 7 souches d'origine vétérinaire (dont 3 souches de *C. botulinum*), 3 d'origine alimentaire, 1 d'origine environnementale et enfin une souche de collection.

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 87 souches sont repris dans les tableaux 3 et 4 - chapitre 9).

Les données d'antibio-résistance 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 87 souches testées, 18 sont résistantes au métronidazole dont 5 souches du genre *Bacteroides*, une souche de *Clostridium baratii*.

Amoxicilline et Amoxicilline/Ac. Clavulanique

Les résistances à l'amoxicilline sont observées essentiellement chez les bactéries anaérobies à Gram -, notamment du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. 34 souches sont résistantes à l'ampicilline, le genre *Bacteroides/Parabacteroides* représente plus de la moitié des souches (62%).

29 souches sont résistantes à l'association ampicilline + acide clavulanique dont 16 souches appartenant au genre *Bacteroides/Parabacteroides*. 10/16 sont des *Bacteroides fragilis*.

9 souches sont résistantes aussi bien au métronidazole qu'à l'association ampicilline + acide clavulanique.

Les gènes de résistance codant pour des bêta-lactamases/céphalosporinases (*cepA*, *cfxA*, *cftA*) sont systématiquement recherchés par PCR chez les bactéries anaérobies des genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*. Ces gènes sont également recherchés *in silico* sur tous les génomes obtenus par NGS.

Cinq souches d'anaérobies stricts Gram + (5 *Clostridium*) étaient résistantes à l'amoxicilline et à l'amoxicilline/acide clavulanique.

Pipéracilline + Tazobactam

La résistance à la Pipéracilline associée au tazobactam a été observée sur 18 souches des 87 testées, dont 12 du genre *Bacteroides/Parabacteroides* (70,5%).

Imipenème

12 souches étaient résistantes à l'imipenème, dont 11 du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. La souche également résistante est une souche de *Clostridium baratii*.

Clindamycine

La résistance à la clindamycine a été observée sur 33 souches des 87 souches testées. 16 souches appartiennent au genre *Bacteroides/Parabacteroides* soit 48% des souches contre 62,5% en 2018 et 26,7% en 2017. 10 souches du genre *Clostridium* sont résistantes à la clindamycine contre une seule en 2018.

Rifampicine

Aucune résistance à la rifampicine n'a été observée.

Moxifloxacine (Fluoroquinolone 3^{ème} génération)

15 souches d'anaérobies Gram - étaient résistantes à la moxifloxacine, principalement dans le genre *Bacteroides/Parabacteroides* (9). Parmi les anaérobies à Gram +, cette résistance est observée pour 11 souches, principalement dans le genre *Clostridium* (6).

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 *Clostridium botulinum* et 1 *Lachnoclostridium sp.*).

Chloramphénicol

La résistance au chloramphénicol a été observée sur 7 souches des 87 souches testées. 4 /7 appartiennent au genre *Bacteroides/Parabacteroides*.

Linézolide

La résistance au linézolide a été observée sur 10 souches des 87 souches testées. 5/10 appartiennent à l'espèce *Clostridium perfringens*.

Tigécycline

La résistance à la tigécycline n'est testée au CNR que depuis septembre 2019. Les données ne sont donc pas suffisantes mais sur les 5 souches de *Clostridium perfringens* testées, 2 étaient résistantes.

Pour l'année 2019, le CNR confirme comme les autres années que le genre *Bacteroides* et notamment les souches de *Bacteroides fragilis* représentent la plus grande partie des souches résistantes aux antibiotiques.

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.

Dans la suite d'une décision prise par la Direction de l'Institut Pasteur dans le cadre d'une restructuration interne, le CNR s'est vu retiré son implication dans le projet européen EuroBioTox (*European programme for the establishment of validated procedures for the detection and identification of biological toxins*) dans le cadre de l'appel d'offre H2020 regroupant 13 partenaires européens et une cinquantaine de laboratoires participant à des essais inter laboratoires. Malgré cela, l'équipe du CNR continue à maintenir ses interactions et collaborations fortes établies depuis 15 ans avec ses homologues européens.

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 fax, 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, comme cette année en septembre avec une soupe industrielle.

TIAC à *Bacillus cereus/cytotoxicus* et *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 12 TIAC souvent graves à *Clostridium perfringens* (n=9) ou *Bacillus cereus/cytotoxicus* (n=3) survenues dans des EHPAD (8 foyers ; 9 décès), des unités militaires (2 foyers ; 71 malades), en restaurant d'entreprise (1 foyer ; 120 malades) ou dans le cadre familial (1 foyer, 1 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 2019 (251 jours ouverts), le CNR a répondu à plus de 250 emails et à 295 appels téléphoniques enregistrés (plus du double que l'an dernier).

5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Christelle Mazuet a été régulièrement en contact avec Nathalie Jourdan Da Silva et Alexandra Mailles pour l'investigation des suspicions de botulisme, avec Nelly Fournet pour l'investigation des nombreuses TIAC graves à *Clostridium perfringens/Bacillus cereus/Bacillus cytotoxicus* ainsi qu'avec les différentes ARS et/ou DDPP concernés. Des échanges ont également eu lieu cette année avec les cellules d'alerte de la DGCCRF et de la DGAL/MUS concernant ces différents foyers et notamment le foyer de botulisme de type A occasionné par une soupe d'origine industrielle.

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

- La Lettre de l'Institut Pasteur, « Des microbes dans nos assiettes »
- <http://www.leparisien.fr/essonne-91/essonne-paralysee-apres-avoir-consomme-une-soupe-perimee-11-09-2019-8149989.php>
- <https://sante.journaldesfemmes.fr/maladies/2569214-botulisme-definition-symptomes-cause-traitement/>



PASTEUR sur FRANCE 2 ..

FRANCE 2 - JOURNAL DE 13H - 12/09/2019 - MARIE-SOPHIE LACARRAU

13:11:10 Une femme se retrouve paralysée après avoir été frappée par le botulisme et ce après avoir consommé une soupe industrielle périmée. Un fait divers qui interpelle le monde de l'alimentation alors que l'on ne cesse de lancer des appels à lutter contre le gaspillage alimentaire.



Interview de Christelle Mazuet, Responsable CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme à l'Institut Pasteur

RTL - Rtl grand soir - 12/09/2019 - CHRISTOPHE PACAUD

22:14:56 Contamination au botulisme : une femme paralysée après avoir consommé une soupe périmée. 22:15:05 Commentaire de Marion Ferrer, journaliste à la rédaction de RTL. 22:15:22 Interview de Christelle Mazuet, Responsable CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme à l'Institut Pasteur. 22:16:11



Attention aux produits périmés

Le Parisien - 13/09/2019 - Aurelie Sipos

TOUT LE MONDE ou presque a déjà hésité quelques instants devant son frigo avant d'engloutir un yaourt « périmé » de quelques jours. Mais ce geste, selon les aliments, n'est pas sans danger. | Une patiente dans un état grave En Essonne, une femme est paralysée après avoir consommé une soupe périmée.

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*

A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak.

Le Maréchal C, Hulin O, Macé S, Chuzeville C, Rouxel S, Poëzevara T, **Mazuet C**, Pozet F, Sellal E, Martin L, Viry A, Rubbens C, Chemaly M.

Animals (Basel). 2019;9(12):1025.

Abstract

We report a botulism outbreak in Charolais cattle fed with wheat flour contaminated by *Clostridium botulinum* type C and the management of the outbreak at each step from the clinical suspicion to the cleaning and disinfection operations. Diagnosis was based on typical suggestive clinical signs and detection of *C. botulinum* type C using real-time PCR in samples collected from three young affected bulls. All young exposed bulls and cows (18 animals) eventually died, but three young bulls and one cow were recovering when it was decided to euthanize them. *C. botulinum* type C was detected in the liver of these four animals. Analysis of the ration components demonstrated that wheat flour, wheat, and the mill used to make flour were positive for *C. botulinum* type C. A dead cat positive for *C. botulinum* type C was discovered in the silo where wheat grain was stored and was considered the source of contamination. The cat's entire body was found mummified, well preserved, and not rotting in the silo. Specific measures, in particular, vaccination of the rest of the herd and cleaning and disinfection operations, were implemented to prevent any recurrence of the outbreak. The

presence of wild animal carcasses in feed harboring anaerobic conditions like silage, in particular during harvesting, are known to be at risk for the initiation of a botulism outbreak. This outbreak is a reminder that the presence of an animal carcass in feed, regardless of the kind of feed and whenever the contamination occurs, either during harvesting or storage, is sufficient to induce a botulism outbreak.

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.

6-1-2 **Activités de recherche sur les bactéries anaérobies**

The population structure of *Clostridium tetani* deduced from its pan-genome

Diana Chapeton-Montes, Lucile Plourde, Christiane Bouchier, Laurence Ma, **Laure Diancourt**, Alexis Criscuolo, Michel Robert Popoff, Holger Brüggemann

Sci Rep. 2019 Aug 2;9(1):11220. doi: 10.1038/s41598-019-47551-4.

Erratum in

Sci Rep. 2019 Nov 19;9(1):17409. doi: 10.1038/s41598-019-53688-z.

Abstract

Clostridium tetani produces a potent neurotoxin, the tetanus neurotoxin (TeNT) that is responsible for the worldwide neurological disease tetanus, but which can be efficiently prevented by vaccination with tetanus toxoid. Until now only one type of TeNT has been characterized and very little information exists about the heterogeneity among *C. tetani* strains. We report here the genome sequences of 26 *C. tetani* strains, isolated between 1949 and 2017 and obtained from different locations. Genome analyses revealed that the *C. tetani* population is distributed in two phylogenetic clades, a major and a minor one, with no evidence for clade separation based on geographical origin or time of isolation. The chromosome of *C. tetani* is highly conserved; in contrast, the TeNT-encoding plasmid shows substantial heterogeneity. TeNT itself is highly conserved among all strains; the most relevant difference is an insertion of four amino acids in the C-terminal receptor-binding domain in four strains that might impact on receptor-binding properties. Other putative virulence factors, including tetanolysin and collagenase, are encoded in all genomes. This study highlights the population structure of *C. tetani* and suggests that tetanus-causing strains did not undergo extensive evolutionary diversification, as judged from the high conservation of its main virulence factors.

Whole-Genome Sequences of a Cluster of 14 Unidentified Related *Veillonella* sp. Strains from Human Clinical Samples and Type Strains of 3 *Veillonella* Validated Species

Fabien Aujoulat, Michel R Popoff, **Laure Diancourt**, Alexis Criscuolo, Hélène Jean-Pierre, Estelle Jumas-Bilak, Hélène Marchandin

Microbiol Resour Announc. 2019 Mar 21;8(12):e01743-18. doi: 10.1128/MRA.01743-18.

Abstract

We report 17 draft genomes for 14 unidentified *Veillonella* sp. strains closely related in 16S rRNA gene-based phylogeny and type strains of 3 *Veillonella* species with the aims of deciphering relationships between related species, evaluating the accuracy of current thresholds for species delineation, and robustly describing new species in the genus.

Two Clostridium perfringens Type E Isolates in France

Laure Diancourt, Jean Sautereau, Alexis Criscuolo, Michel R Popoff
Toxins. 2019 Mar 1;11(3):138. doi: 10.3390/toxins11030138.

Abstract

Clostridium perfringens type E is a less frequently isolated C. perfringens type and has not previously been reported in France. We have characterized two recent type E isolates, C. perfringens 508.17 from the intestinal content of a calf that died of enterotoxemia, and 515.17 from the stool of a 60-year-old woman, subsequent to food poisoning, which contained the plasmid pCPPB-1 with variant iota toxin and C. perfringens enterotoxin genes.

6-2 Publications et communications 20196-2-1-1 **Publications nationales**

Sans objet

6-2-1-2 **Publications dans des revues internationales à comité de lecture****A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak.**

Le Maréchal C, Hulin O, Macé S, Chuzeville C, Rouxel S, Poëzevara T, **Mazuet C**, Pozet F, Sellal E, Martin L, Viry A, Rubbens C, Chemaly M.
Animals (Basel). 2019;9(12):1025.

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

The population structure of Clostridium tetani deduced from its pan-genome

Diana Chapeton-Montes , Lucile Plourde, Christiane Bouchier, Laurence Ma, **Laure Diancourt**, Alexis Criscuolo, Michel Robert Popoff, Holger Brüggemann
Sci Rep. 2019 Aug 2;9(1):11220. doi: 10.1038/s41598-019-47551-4.
Erratum in
Sci Rep. 2019 Nov 19;9(1):17409. doi: 10.1038/s41598-019-53688-z.

Whole-Genome Sequences of a Cluster of 14 Unidentified Related Veillonella sp. Strains from Human Clinical Samples and Type Strains of 3 Veillonella Validated Species

Fabien Aujoulat, Michel R Popoff, **Laure Diancourt**, Alexis Criscuolo, Hélène Jean-Pierre, Estelle Jumas-Bilak, Hélène Marchandin
Microbiol Resour Announc. 2019 Mar 21;8(12):e01743-18. doi: 10.1128/MRA.01743-18.

Two Clostridium perfringens Type E Isolates in France

Laure Diancourt, Jean Sautereau, Alexis Criscuolo, Michel R Popoff
Toxins. 2019 Mar 1;11(3):138. doi: 10.3390/toxins11030138.

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

- Séminaire du Réseau National des Laboratoires BIOTOX-PIRATOX
- Séminaire des CNR

- H2020_KO Meeting FED-AMR, Vienne, Autriche
- Workshop MedVetNet/AniBotNet « Public health risks associated with animal botulism »
- Congrès annuel de la SFM

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 en 2018. Cette mise en commun des données de surveillance des différents acteurs va être 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.

9- TABLEAUX

TABLEAU 1

Souches et prélèvements d'origine humaine
Fréquences par département

Période du 01/01/2019 au 31/12/2019

Département	Fréquence
05	6
06	1
08	1
09	1
10	1
15	2
17	4
18	2
20	1
21	7
25	1
28	1
30	2
31	62
33	1
34	15
35	4
36	4
38	1
39	5
40	1
42	1
45	6
46	2
49	1
57	1

Département	Fréquence
59	6
63	2
64	1
66	1
67	2
69	12
71	7
72	1
74	3
75	4
76	3
77	5
78	1
80	1
84	4
89	1
92	2
94	20
France Métropolitaine	210

Département DROM	Fréquence
974 La Réunion	5
976 Mayotte	1
987 Polynésie Française	1
TOTAL DROM	7

TABLEAU 2

Répartition des souches d'origine humaine par genre et espèces

Période du 01/01/2019 au 31/12/2019

29 genres, 50 espèces, 9 espèces non nommées

Genre	Nombre (espèce)
<i>Catabacter</i>	1 (<i>hongkonensis</i>)
<i>Actinomyces</i>	1 (<i>turicensis</i>)
<i>Anaerococcus</i>	1 (<i>octovius</i>)
<i>Bacillus</i>	15 (<i>cereus</i> (2), <i>cytotoxicus</i> (1), <i>flexus</i> (9), <i>licheniformis</i> (1), <i>paramycoides</i> (1), <i>subtilis</i> (1))
<i>Bacteroides</i>	17 (<i>faecis</i> (1), <i>fragilis</i> , (10) <i>thetaitaomicron</i> (5), <i>xylanisolvens</i> (1))
<i>Bifidobacterium</i>	3 (<i>bifidum</i> (1), <i>breve</i> (2))
<i>Clostridium</i>	64 (<i>baratii</i> (3), <i>botulinum</i> (7), <i>celatum</i> (1), <i>combesii</i> (1), <i>disporicum</i> (1), <i>mangenotii</i> (1), <i>paraputrificum</i> (1), <i>perfringens</i> (36), <i>septicum</i> (4), <i>sp.</i> (1), <i>sordellii</i> (1), <i>sporogenes</i> (3), <i>tertium</i> (1), <i>tetani</i> (3))
<i>Collinsella</i>	1 (<i>ihuae</i>)
<i>Corynebacterium</i>	1 (<i>sp.</i>)
<i>Cutibacterium</i>	1 (<i>acnes</i>)
<i>Desulfovibrio</i>	5 (<i>desulfuricans</i> (1), <i>fairfieldensis</i> (2), <i>sp.</i> (1), <i>termitidis</i> (1))
<i>Dialister</i>	2 (<i>micraerophilus</i> (1), <i>pneumosintes</i> (1))
<i>Eggerthella</i>	2 (<i>lenta</i>)
<i>Finegoldia</i>	1 (<i>magna</i>)
<i>Lachnoclostridium</i>	1 (<i>sp.</i>)
<i>Lactobacillus</i>	1 (<i>delbrueckii</i>)
<i>Lysinibacillus</i>	1 (<i>boronitolerans</i>)
<i>Negativicoccus</i>	3 (<i>massiliensis</i>)
<i>Olsenella</i>	2 (<i>profusa</i> (1), <i>sp.</i> (1))
<i>Oribacterium</i>	1 (<i>sp.</i>)
<i>Ottowia</i>	1 (<i>sp.</i>)
<i>Parabacteroides</i>	2 (<i>distasonis</i>)
<i>Peptoniphilus</i>	2 (<i>coxii</i> (1), <i>sp.</i> (1))
<i>Prevotella</i>	3 (<i>brevia</i> (2), groupe <i>brevia/ouloria</i> (1))
<i>Ruminococcus</i>	1 (<i>gnavus</i>)
<i>Ruthenibacterium</i>	1 (<i>lactatiformans</i>)
<i>Sanguibacteroides</i>	1 (<i>justesenii</i>)
<i>Tannerella</i>	1 (<i>forsythia</i>)
Nouvelle espèce	91,6% d'homologie avec <i>Negativicoccus massiliensis</i> en 16S

Profils de résistance (R+I) des bactéries anaérobies reçues ou isolées en 2019
Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

TABLEAU 3
Bactéries à Gram +
N=54 souches

Espèce	N	Métronidazole	Amoxicilline + Acide clavulanique	Imipenem	Clindamycine	Rifampicine	Chloramphénicol	Moxifloxacine	Vancomycine	Piperacilline + Tazobactam	Linézolide	Tigécycline*
<i>Actinomyces turicensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA
<i>Bifidobacterium breve</i>	2	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	NA
<i>Catabacter hongkongensis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Clostridium baratii</i>	3	1	1	1	3	0	0	1	0	0	0	0 (N=2)
<i>Clostridium botulinum</i>	11	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0 (N=1)
<i>Clostridium combesii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	12	0	2	0	4	0	0	3	0	1	5	2 (N=5)
<i>Clostridium septicum</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (N=2)
<i>Clostridium sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Clostridium sporogenes</i>	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Clostridium tertium</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Clostridium tetani</i>	4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	NA
<i>Cutibacterium acnes</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Eggerthella lenta</i>	2	0	1	0	1	0	2	1	0	1	1	0 (N=1)
<i>Fingoldia magna</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnoclostridium sp.</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paraeggerthella hongkongensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	NA
<i>Ruminococcus gnavus</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA

* la Tigécycline n'est testée que depuis septembre 2019 au CNR

TABLEAU 4

Bactéries à Gram -
N=33 souches

Espèce	N	Métronidazole	Amoxicilline + Acide clavulanique	Imipenem	Ciindamycine	Rifampicine	Chloramphénicol	Moxifloxacine	Piperacilline +Tazobactam	Linézolide	Tigécycline*
<i>Bacteroides faecis</i>	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	NA
<i>Bacteroides fragilis</i>	11	4	10	7	7	0	1	6	7	0	0 (N=4)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	6	1	2	1	5	0	2	3	2	1	0 (N=5)
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
<i>Desulfovibrio fairdieldensis</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>Dialister micraerophilus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	NA
<i>Dialister pneumosintes</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Fusobacterium necrophorum subsp. Necrophorum</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NA
<i>Negativicoccus massiliensis</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Ottowia sp.</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	NA
<i>Parabacteroides distasonis</i>	2	0	2	1	2	0	1	0	1	0	NA
<i>Prevotella bivia</i>	2	1	2	0	1	0	0	2	0	1	NA
<i>Prevotella du groupe bivia/ouloria</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Tannerella forsythia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
<i>Veillonella parvula</i>	2	2	2	0	0	0	0	0	2	0	NA

BOTULISME HUMAIN

LIVRE II

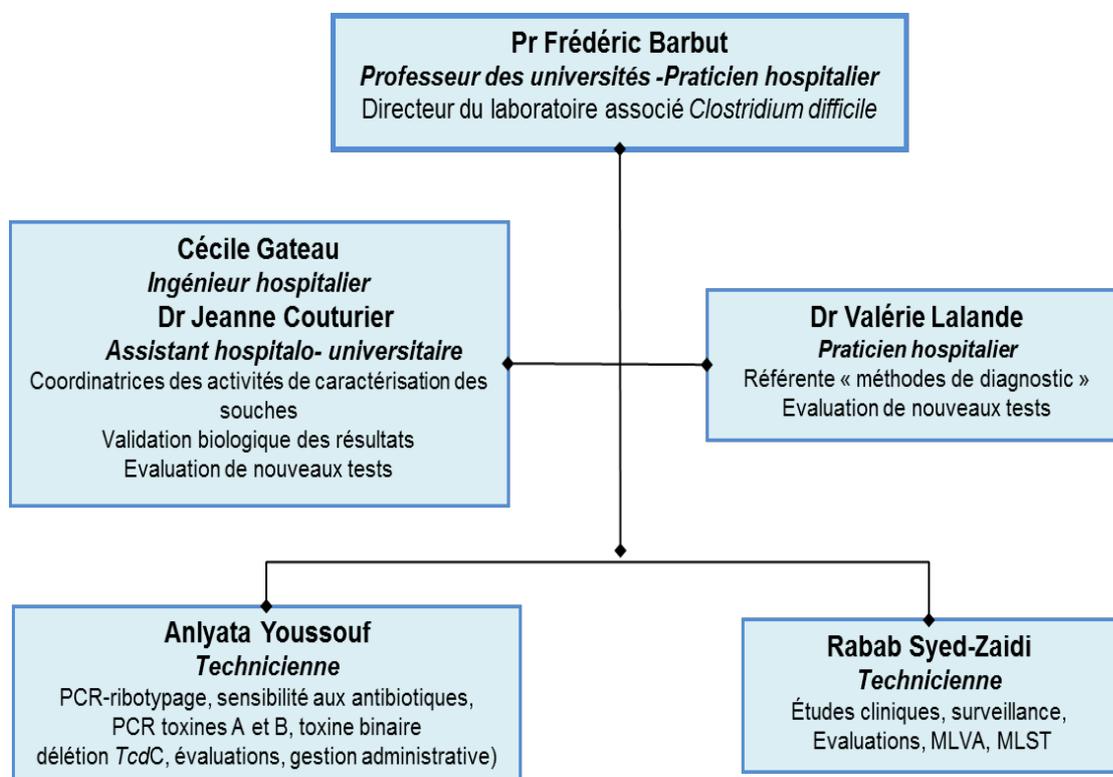
Laboratoire associé au CNR *Clostridium difficile*



1- MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE

Description détaillée présentée en **annexe 1**

Organigramme du laboratoire associé



2- ACTIVITES D'EXPERTISE

Éléments clefs de l'année 2019 (en termes de production d'expertise)

Validation de la méthode européenne de PCR-ribotypage avec identification des PCR-ribotypes sur le site « web-ribo » (<https://webribo.ages.at/>).

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 Evolution des techniques au cours de l'année 2019

Les souches de *Clostridium difficile* reçues au laboratoire sont caractérisées par PCR multiplex permettant la détection simultanée de 7 cibles (dont les principaux facteurs de virulence) : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvé chez les souches non toxigènes. Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire. La détection des fragments amplifiés se fait par électrophorèse capillaire.

La technique de PCR-ribotypage permet la détection des fragments amplifiés par PCR sur séquenceur (capillary-gel electrophoresis PCR-ribotyping) (Fawley et al, PlosOne 2015, DOI :10.1371). Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire. Depuis quelques mois, nous utilisons la plateforme européenne « webribo » (<https://webribo.ages.at/>) pour l'identification des PCR ribotypes.

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

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

En 2019, nous avons reçu 265 prélèvements au total contre 343 en 2018, ce qui représente une diminution de 22.7 %

Le **tableau I** présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2019 ainsi que les différentes caractérisations réalisées sur ces souches.

Le laboratoire associé rend les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours à partir de la date de réception de la souche isolée au laboratoire.

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

Année	2019
Nb de prélèvements reçus	265
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	252
Nb de souches toxigènes	244
Recherche du fragment A3 (%)	100
Recherche du fragment B1 (%)	100
Recherche de la toxine binaire (%)	100
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	100
Antibiogramme (%)	100
PCR-ribotypage (%)	100

2-6 Activités de séquençage

En 2018-2019, nous avons fini de séquencer environ 250 souches de *C. difficile* et commencé à analyser les résultats par cg-SNP, wg-MLST (Bionumériques) dans le but :

- D'évaluer le pouvoir discriminant du cg-MLST à partir d'une collection de souches de *C. difficile* déjà caractérisées au niveau du Centre National de Référence et appartenant aux PCR-ribotypes les plus fréquents.
- D'investiguer une épidémie de *C. difficile* de PCR-ribotype 018 (PCR-ribotype peu fréquent) survenue dans un hôpital de l'Est de la France pour étudier le lien de clonalité entre ces souches. Celles-ci ont été caractérisées par cg-SNP, wg-MLST (Bionumériques). L'analyse a montré des résultats cohérents entre les deux méthodes de typage et a permis d'objectiver l'épidémie dans un service de gériatrie.
- Déterminer la fréquence de transmission des souches de *C. difficile* dans un CHU en caractérisant systématiquement toutes les souches isolées sur une année par cg-MLST et en analysant les résultats en fonctions des données épidémiologiques des patients (analyse spatio-temporelle des séjours des patients). Nous nous intéresserons en particulier à la composante cryptique de la transmission (c'est-à-dire la transmission de la même souche sans lien évident spatial ou temporel entre les patients). Nous comparerons le pouvoir discriminant du cg-MLST par rapport à la PCR-ribotypage.

3-ACTIVITES DE SURVEILLANCE

Éléments clefs de l'année 2019 (en termes de surveillance)

Synthèse de l'évolution de l'incidence des ICD :

L. ASSOUVIE, M. COLOMB-COTINAT, J. DURAND, A. BERGER-CARBONNE, C. DANIAU, L. LEON, S. MAUGAT, S. SOING-ALTRACH, C. GATEAU, J. COUTURIER, I. ARNAUD, P. ASTAGNEAU, LE GROUPE BMR-RAISIN, F. BARBUT

Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in France 2010-2017

Euro Surveill. 2019 Aug;24(35). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638.

Importance de *C. difficile* dans les diarrhées communautaires

BARBUT F, , DAY N., BOUÉE S., YOUSOUF A., GRANDVOINNET L., LALANDE V.,COUTURIER J., ECKERT C..

Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019 May;25(5):588-594

Surmortalité des patients infectés par *C. difficile*

BARBUT F, BOUÉE S, LONGEPIERRE L, GOLDBERG M, BENSOUSSAN C, LEVY-BACHELOT L.

Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with *Clostridium difficile* infection: a French Health Insurance Database analysis.

J Hosp Infect. 2018 Jan;98(1):21-28

3-1 Description du réseau partenaire

Le laboratoire associé « *Clostridium 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 immunochromatographiques.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2019 (265 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	36	134	95
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	7	174	84
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	2	176	87
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	30	142	93
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	0	158	107
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	82	107	76

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.

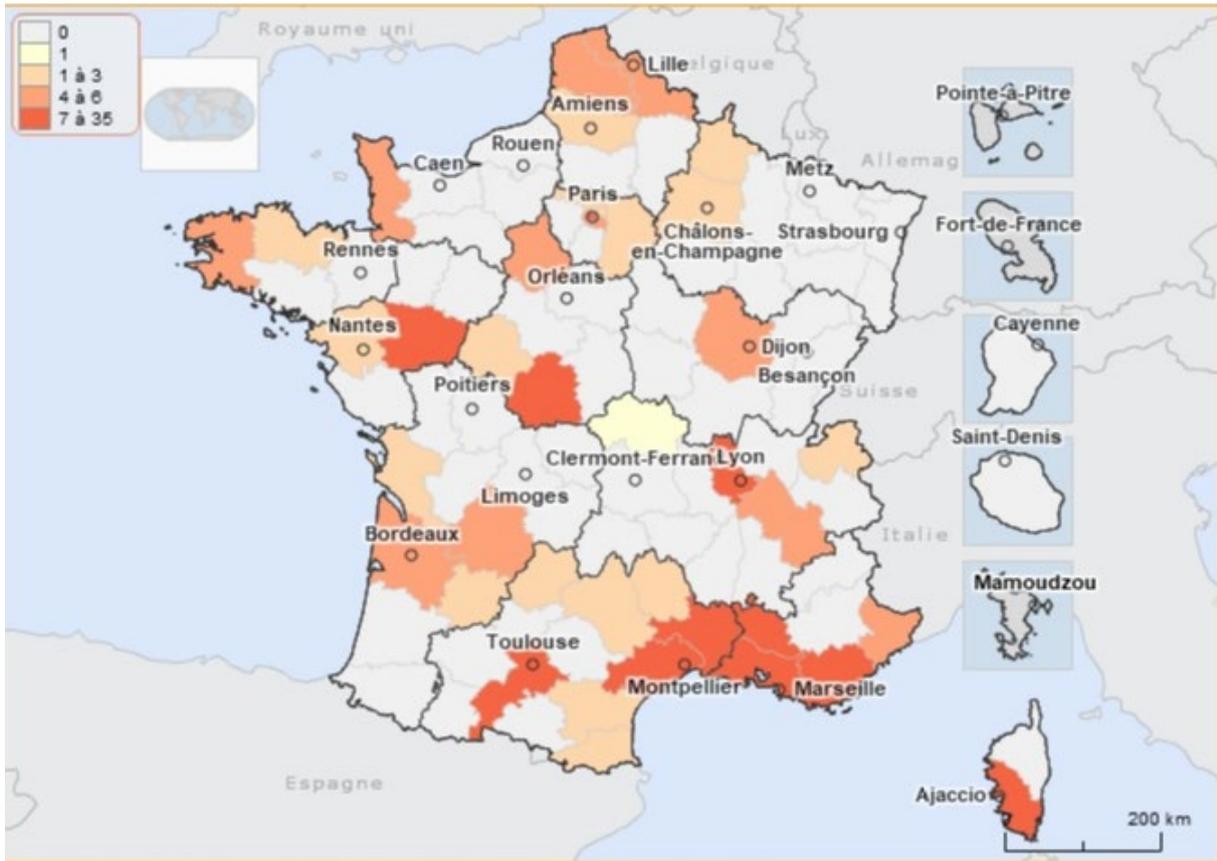


Figure 1 : Répartition des prélèvements (n=265) envoyés par département, en 2019
 A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement

En 2019, les souches de *C. difficile* toxinogènes provenaient uniquement de selles. Cent trente et une souches (53.6%) de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes, 103 (42.2%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 10 cas.

L'âge des patients chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représenté sur la figure 2. Au total, en 2019, 69.2% des patients ont plus de 65 ans (versus 70.2% en 2018).

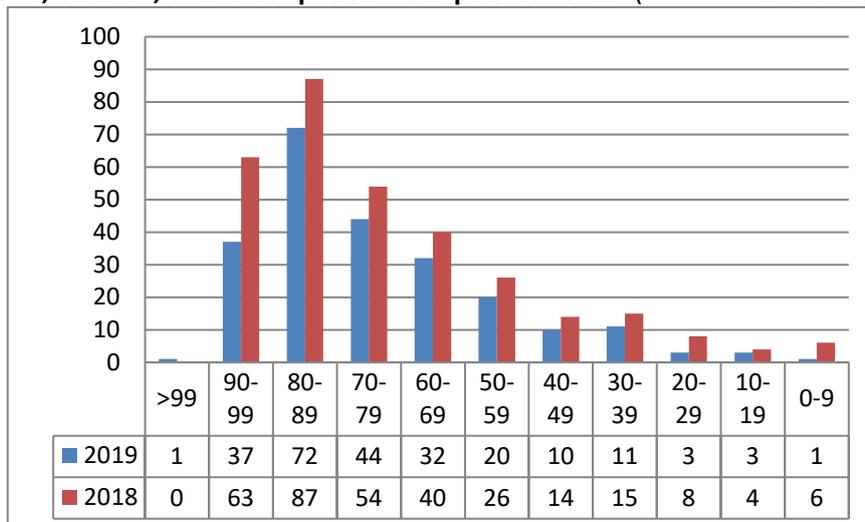


Figure 2 : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxinogène a été isolée en fonction de l'âge (2018 et 2019)

Tableau III : Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2019

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

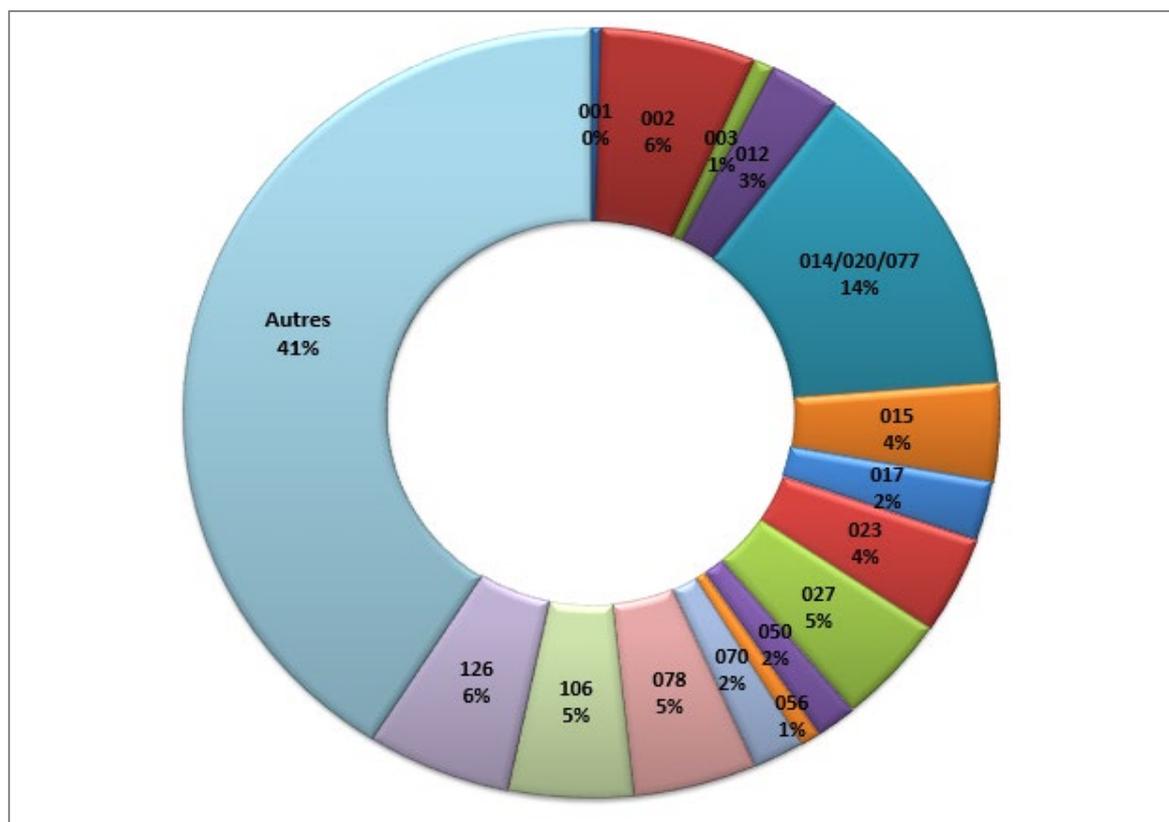


Figure 3 : Répartition des PCR-ribotypes en 2019

Les souches 014/020/077, 002 et 126 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 25.4% des souches toxigènes (**Tableau III, Figure 3**). Parmi les PCR-ribotypes « autres » les plus fréquemment retrouvés, on note le PCR ribotype 081 (n=7), la 005 (n=6) ainsi que la FR099 (n=4).

Parmi les 244 souches de *C. difficile* toxigènes, 11 (4%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, 3 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **historique** » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine (souches isolées dans 2 départements et 1 département non renseigné) (**figure 4b**). Les **8 souches épidémiques 027** ont été isolées dans le Nord (n=4), la Manche (n=1), la Marne (n=1), le Vaucluse (n=1), et en Hauts de Seine (n=1) (**figure 4a**).

La souche 027 épidémique a été isolée pour la première fois en 2019 dans le département du Nord. La souche 027 est présente sur tout le territoire. En 2018, 7 souches épidémiques 027 avaient été reçues au CNR contre 8 en 2019.

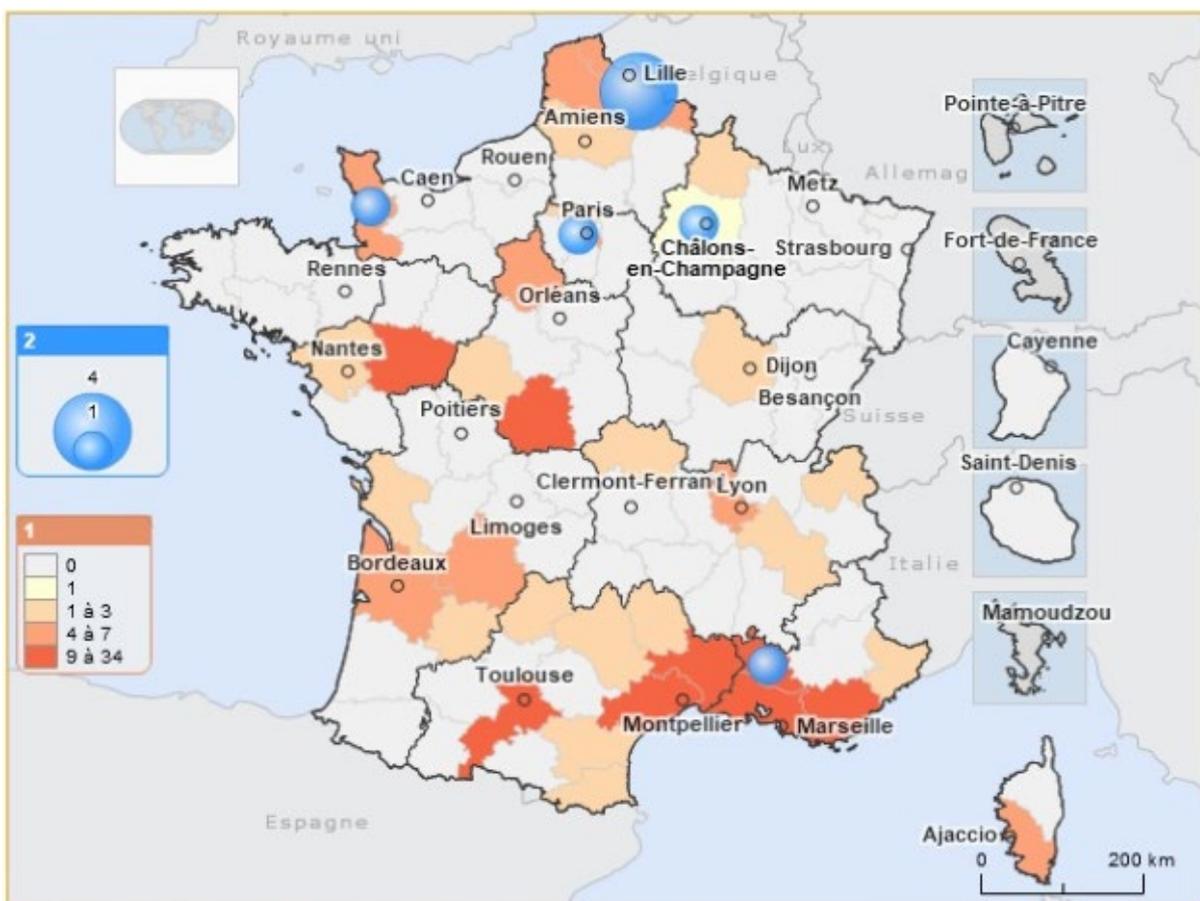


Figure 4a : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques (cercles bleus) en fonction des départements, en 2019. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en orange.

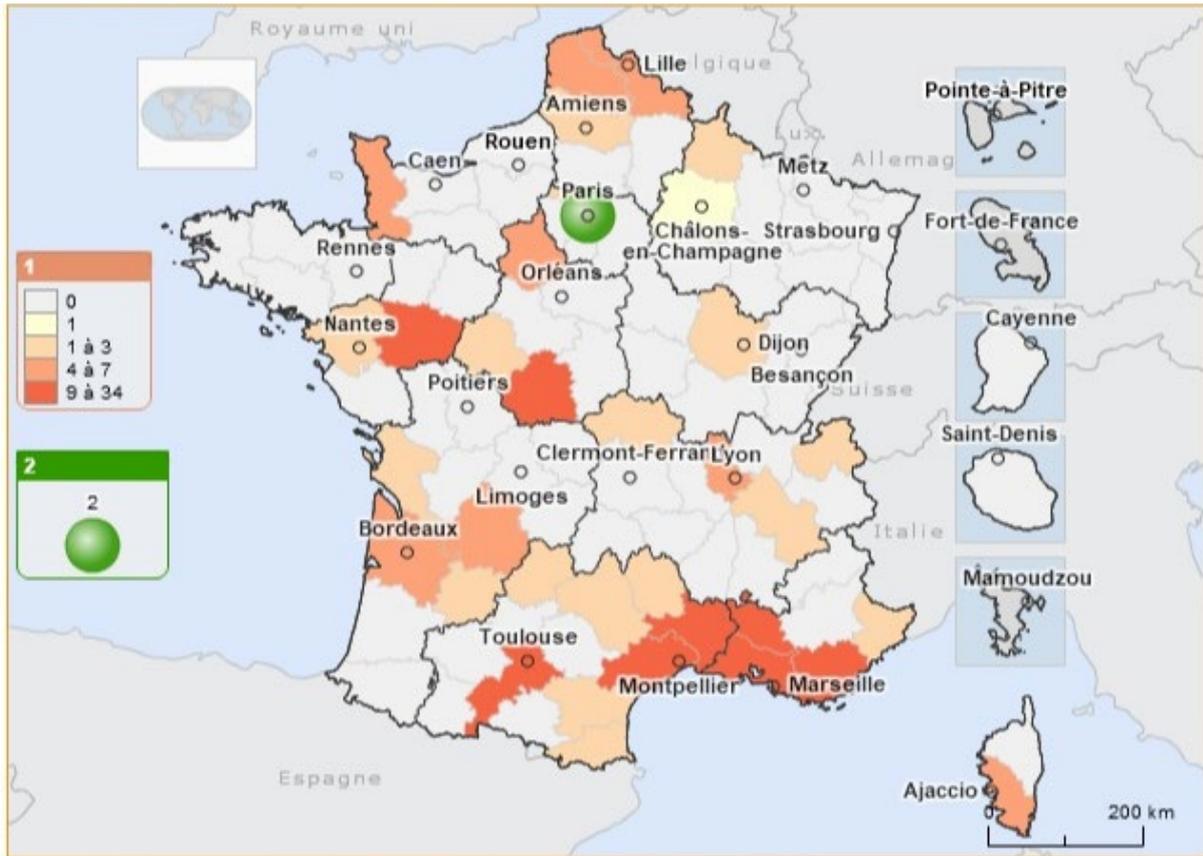


Figure 4b : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques (cercles verts) en fonction des départements, en 2019. Les départements ayant envoyé des souches toxinogènes sont représentés en orange. A noter : 1 souche de 027 historique a été envoyée au laboratoire mais le département n'a pas été renseigné.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches reçues au laboratoire est le 014/020/077, isolé sur tout le territoire (**figure 5**). Les souches de PCR-ribotype 002 arrivent en 2^{ème} position (**figure 6**). Les souches de PCR-ribotype 126 arrivent en 3^{ème} position.

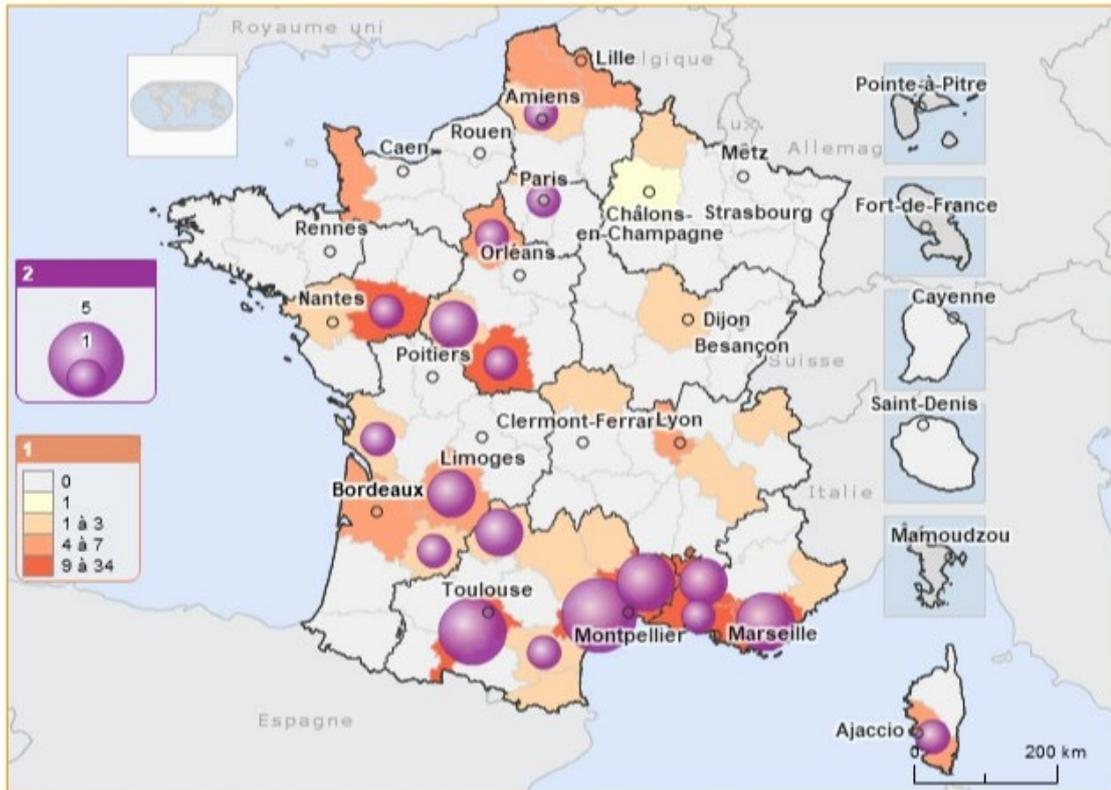


Figure 5 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 (cercles violets) en fonction des départements en 2019. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en orange. A noter : 1 souche de 014/020/077 a été envoyé au laboratoire mais le département n'a pas été renseigné

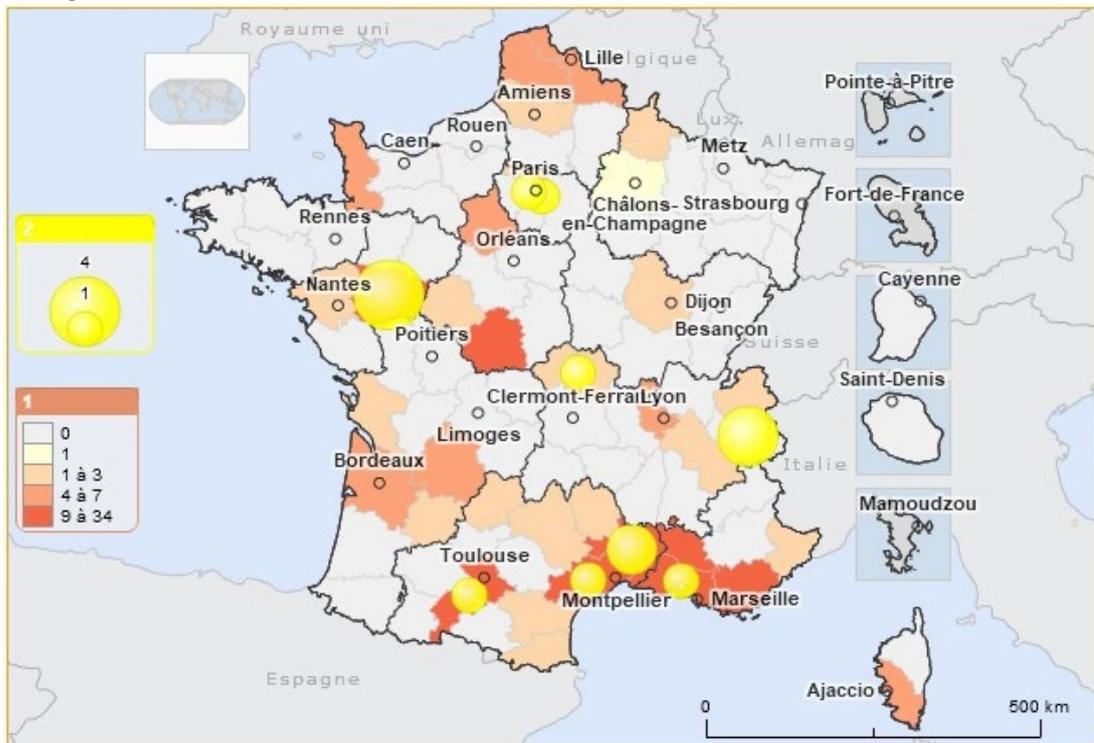


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 002 (cercles jaunes) en fonction des départements en 2019. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en orange.

Au cours de l'année 2019 une augmentation 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 productrices de toxine binaire.

	2019	2018
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	244	319
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	72	77
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	29.5	24.1
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	11	14
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs souches non 027 (%)	25	19.7

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 244 souches de *C. difficile* toxigènes en 2019. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 244 souches.

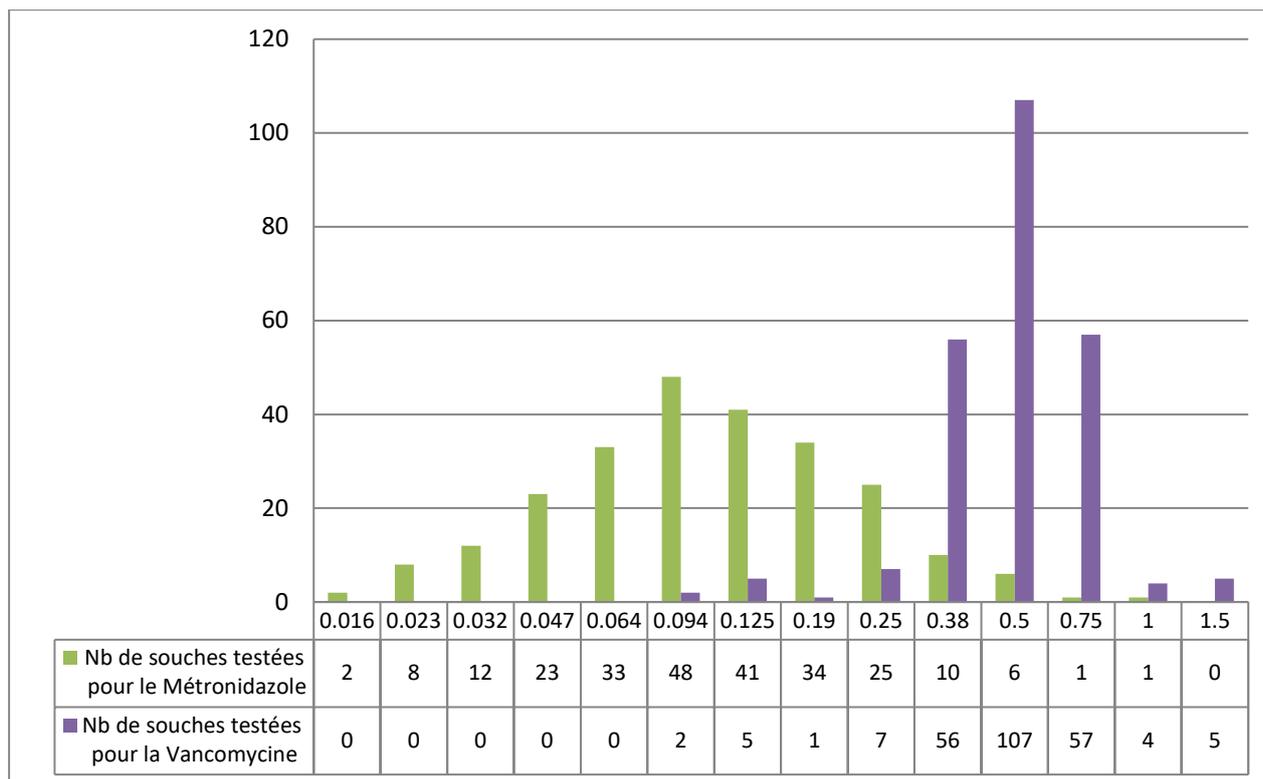
Les taux de résistance (R+) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm) de 25 %, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm) de 91.8%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21 mm) de 17.2%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm) de 12.7% (**Tableau V**).

Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine (CMI \leq 2 mg/l) selon l'EUCAST) et au métronidazole (CMI \leq 2 mg/l selon l'EUCAST). La répartition des CMI pour les 244 souches toxigènes est présentée **figure 7**.

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

Figure 7 : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 244 souches toxigènes.



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

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. Depuis août 2009, l'identification de 10 PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) régulièrement retrouvés en France a été mise en place. 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, 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.

De plus, F. Barbut, J. Couturier et C. Gateau sont régulièrement en contact avec B. Coignard ou A. Carbonne (Santé Publique France) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

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

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*).
- **F. Barbut** a participé au projet **ClosER** (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes) en 2017.
- **F. Barbut** a participé aux projets **LuCID2** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study) (Davies *et al.*- 2020).
- **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 « **Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections** » projet piloté par l'ECDC.
- **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.

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

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*).
- **F. Barbut** a participé aux projets **LuCID2** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study) (Davies *et al.*- Anaerobe 2020 sous presse).
- **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 « **Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections** » projet piloté par l'ECDC.
- **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.

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

1. 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 (**réunion du 21/01/2019**) et des résultats sont régulièrement présentés à des congrès (RICAI ou JNI) ou soumis à publication.

GRAVET A, VACHEE A, BARBUT F, GUERY B, VANHEMS P, BOUTOILLE D, VANJAK D pour le Réseau National Diftec. Clostridium difficile (surveillance DIFTEC) : écart avec les recommandations ESCMID 2014. 38ème RICA, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-090)

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. In preparation

2. COMMUNODIFF (Prévalence de *Clostridium difficile* dans les diarrhées communautaires).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Nesrine Day (Laboratoire du Chemin Vert, Paris) et a été financée par le laboratoire Alère.

L'objectif principal de cette étude non interventionnelle était d'estimer la prévalence des infections à *C. difficile* (ICD) chez des patients ambulatoires présentant une diarrhée communautaire. Les objectif(s) secondaires étaient (i) de déterminer la proportion d'ICD sous-diagnostiquée par absence de suspicion clinique et (ii) de caractériser les patients atteints d'ICD communautaires.

BARBUT F., DAY N., BOUÉE S., YOUSSEF A., GRANDVOINNET L., CASTELLA W., LALANDE V., COUTURIER J., ECKERT C. Toxigenic Clostridium difficile carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. Clin. Microbiol. Infect., 2019 May;25(5):588-594

3. Synthèse des modalités de surveillance des ICD en France : étude collaborative avec le réseau RAISIN BMR (Cpias), Santé publique France (SpF) et le laboratoire associé *C. difficile*.

COLOMB-COTINAT M, ASSOUVIE L, DURAND J, DANIAU C, LEON L, MAUGAT S, SOING-ALTRACH S, GATEAU C, COUTURIER J, ARNAUD I, ASTAGNEAU P, BERGER-CARBONNE A, BARBUT F. Epidemiology of Clostridioides difficile infections, France, 2010 to 2017. Euro Surveill. 2019 Aug;24(35). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638.

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 *C. difficile*

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement	Nb d'heures en 2017
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours	2 h
Universités Paris V, VI et VII	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours	2h
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	2h
Université Paris V René Descartes	Infectiologie	DU antibiotiques et antibiothérapie	Cours	2h
Sorbonne Université	Microbiologie	DU Microbiote et santé (Pr K. Clément)	Cours	2h
Université Mérieux, Lyon	Bactériologie (formation sur les Anaérobies)	Techniciens de laboratoire ou biologistes	Cours	3h

5-1-2 **Activités de Formations continues**

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées-Année
Staff de service Hôp. Saint Antoine MIT (Pr K. Lacombe)	MIT	Médecins	Staff de service	1h 25/03/2019
Staff de service Hop. Saint Antoine UPAC	Pharmacie	Pharmaciens, préparateur	Staff de service	1h 17/09/2019
Staff de service, Hôp. Pitié- Salpêtrière Réanimation (Pr SIMILOWSKY)	Réanimation	Médecins	Staff de service	1h00- 21/10/2019
Congrès de la SRLF	Réanimateurs	Réanimateurs	Congrès annuel de la SRLF	30 min. 2019

5-1-3 **Stagiaires accueillis**

Université Paris Est Creteil Matthieu Rabaté	L3 Microbiologie gestion des risques Evaluation de la dissémination des bactéries à partir des toilettes : résultats d'une étude expérimentale	2018-2019
BTS (ENCPB) Julianne Sedeno	BTS bioanalyse et contrôle	2018-2019
Université Paris Descartes Adrien Leblanc	Stage PIR « Analyse d'une épidémie d'infection à <i>C. difficile</i> par WGS »	2018-2019
Université Paris Descartes Lea Franconeri	Master 2 Pharmacologie Etude des propriétés des souches non toxigènes de <i>C. difficile</i>	2019
Stage PIR génétique Université de Paris Adrien Leblanc	<i>Comparaison génomique des variants des souches de Clostridioides difficile de PCR ribotype 027.</i>	2019
Doctorant en algérie Université Hassiba Benbouali of Chlef Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Biology. Youssef Boudjellal	Doctorant Caractérisation des souches de <i>C. difficile</i> isolées en Algérie	2019

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

BARBUT F., GATEAU C, COUTURIER J
Prévention et contrôle des infections à *Clostridium difficile*
Hygiènes 2017, XX, 5, 281-289

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, cecile.gateau@aphp.fr, jeanne.couturier@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 Cepias. 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.

5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles

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.

6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS

Depuis Janvier 2018, F. Barbut est directeur-adjoint de l'unité INSERM UMR S-1139 à la faculté de Pharmacie de Paris. La thématique développée par cette unité est centrée sur le microbiote intestinal et ses relations avec les entéropathies et l'allergie alimentaire. Un axe de recherche important concerne la TMF (Transplantation de Microbiote Fécal) et ses nouvelles voies d'administration (selles congelées, lyophilisat) dans le cadre notamment des infections à *C. difficile*.

6-1 Activités de recherche

6-1-1 Etude 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. [Epub ahead of print]

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.

Les résultats de cette étude internationale sont en cours d'analyse

6-1-3 Comparaison de deux tests rapides immuno-chromatographiques pour la détection de la GDH et des toxines de *C. difficile*

Une option pour le diagnostic de l'infection à *C. difficile* est d'utiliser un test EIA pour la détection de la GDH (glutamate déshydrogénase) (C Diff Quik Chek (Abbott)) suivi, si le résultat est positif, d'un EIA détectant les toxines. Alternativement, un test combiné détectant les deux cibles en même temps sur le même test (C Diff Quik Chek Complete (Abbott)) peut également être utilisé. Certaines discordances entre la détection de GDH seule et le test combiné GDH + toxine ont été signalées par les biologistes. L'objectif de cette étude était de comparer les performances du C Diff Quik Chek et du C Diff Quik Chek Complete pour la détection de GDH par rapport à la culture.

De novembre 2018 à mars 2019, 88 échantillons de selles positifs par culture pour *C. difficile* (58 selles fraîches et 30 selles congelées conservées à -80 ° C) et 220 échantillons de selles fraîches négatives par culture ont été testés simultanément par les deux tests : C Diff Quik Chek et C Diff Quik Chek Complete. Les résultats divergents ont été définis comme des résultats qui ne correspondent pas aux résultats de la culture. En cas de test GDH négatif et de culture positive, les échantillons de selles ont été testés à nouveau par un autre technicien avec les deux tests. Dans les cas de recherche de GDH positive à partir d'échantillons de selles négatifs par culture, une culture enrichie a été réalisée. De plus, des expériences de dilution en série ont été menées sur 5 échantillons de selles positives en culture. Les échantillons de selles ont été dilués avec le diluant de 1/10 à 1/10000 et chaque dilution a été testée par les 2 tests.

Parmi les 88 échantillons positifs pour la culture, 27 isolats (30,7%) correspondaient à des souches non toxigènes et 61 (69,3%) à des souches toxigènes. Après avoir résolu les résultats discordants, les deux tests ont montré une sensibilité et une spécificité pour la détection de GDH de 97,9% [IC 95% 92,7-99,7] et 97,2% [IC 95% 93,9-98,9], respectivement. En utilisant des expériences de dilution sériée, les résultats de chaque test étaient similaires en termes de seuil de détection de la GDH.

Le C Diff Quik Chek et le C Diff Quik Chek complete affichent une sensibilité et une spécificité similaires pour la détection de la GDH.

GATEAU C, SYED-ZAIDIR, YOUSOUF A, LALANDE V, COUTURIER J¹, BARBUT F

Does C Diff Quik Chek display the same sensitivity than C Diff Quik Chek Complete for GDH detection?

7th ICDS, Bled Slovénie, soumis.

6-1-4 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 carbapénèmase 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, soumis

6-1-5 Etude des souches non toxigènes de *C. difficile* pour la prévention primaire des ICD

Actuellement, le traitement d'un premier épisode d'ICD, d'une première récurrence ou d'une ICD sévère repose sur l'utilisation per os du métronidazole, de la vancomycine ou de la fidaxomicine. Paradoxalement, bien qu'efficace, cette antibiothérapie va contribuer à entretenir une dysbiose intestinale, qui constitue le principal facteur de risque d'ICD. Dans ce contexte, se sont développées des approches alternatives à l'antibiothérapie, comme la transplantation de microbiote fécal (ou TMF), qui a montré une grande efficacité dans les cas d'ICD multi-récurrentes. Parmi les approches prometteuses, l'utilisation de souches de *C. difficile* non toxigènes (NTCD) ne produisant pas les toxines A et B (et donc considérées comme non pathogènes) se sont montrées efficaces dans la prévention des récurrences d'ICD in vivo chez le hamster et chez la souris gnotobiotique. Lors d'un essai de prévention des ICD chez des patients ayant déjà eu un épisode d'ICD ou une récurrence (essai de phase II randomisé, en double aveugle, contrôlé, versus placebo), les spores de NTCD M3 se sont révélées bien tolérées chez l'homme et ont été associées à une réduction significative de l'apparition de récurrences d'ICD.

Au cours d'une étude prospective longitudinale, monocentrique, menée sur une cohorte de 121 prématurés, nous avons montré que 95% se sont colonisés pendant leur hospitalisation notamment par deux clones de *C. difficile* non toxigènes (NTCD) NTCD1 et NTCD2. Nous avons montré que ces deux souches étaient capables de prévenir l'iléocolite du hamster prétraité par clindamycine et infecté par la souche hypervirulente de PCR ribotype O27. Les animaux survivants ne présentaient aucun signe de lésion colique à l'histologie. Nous sommes actuellement en train d'étudier les propriétés de ces souches afin de comprendre les mécanismes de protection. Nous étudierons en particulier les propriétés de sporulation/germination des souches, leur capacité à produire un biofilm, l'adhésion et le fitness des souches.

COUTURIER J, FRANCONERI L, JANOIR C, FERRARIS L, HOYS S, AIRES J, BARBUT F
 Nontoxicogenic *Clostridioides difficile* strains against *C. difficile* colonization: an experimental study
 30th ECCMID Paris (France), 18-21 Avril 2020 (Communication orale)

6-1-6 Comparaison génomique des variants des souches de *Clostridioides difficile* de PCR ribotype 027.

L'objectif de l'étude était d'investiguer des épidémies ou cas groupés d'ICD liés à un variant de la souche 027 et d'étudier la phylogénie de ces souches par différentes approches moléculaires (PCR-ribotypage, MLVA, MLST, cgMLST, wgMLST).

Dix-neuf souches ont été étudiées :

-14 souches d'une épidémie survenue dans deux centres hospitaliers belges (cliniques universitaires Saint-Luc, au sein de 3 services CHA, U44 et U83) et cliniques de l'Europe (15047, 15109, 15148, 15236, 15237, 15260, 15268, 15366, 15419, 15481, 15742, 15923, 16126 et 16201). L'épidémie s'est étendue sur une période de 11 mois (du 16 janvier 2018 au 14 novembre 2018).

-2 souches du Centre National de Référence (CNR) belge (14095 et 14205) isolées en mars et avril 2017 qui présentaient des profils en PCR-ribotypage proche de la souche 027 de référence (027 variant).

-3 souches isolées en 2011 en France à l'hôpital Saint Philibert de Lomme (CD11-36, CD11-309 et CD11-310). Ces dernières ont été choisies car elles sont toutes des souches proches du PCR-ribotype 027 (027 variant).

Deux souches témoins CD196 (souche de référence 027 historique) et K027 (souche de référence 027 épidémique) ont été incluses.

Les souches ont été caractérisées par PCR-ribotypage, MLVA et MLST. Les facteurs de virulence ont été identifiés par PCR multiplex. Les souches ont par la suite été séquencées et caractérisées par wg MLST.

Toutes les souches étudiées présentent des caractéristiques communes qui les rapprochent des souches de PCR-ribotype 027 : leur profil en PCR-ribotypage se ressemble, elles sont résistantes aux fluoroquinolones et à l'érythromycine, elles sont toutes positives en toxine binaire, possèdent une délétion de 18 pb dans *tcdC* et appartiennent au ST1.

Les méthodes plus fines de typage génomique par MLVA, cgMLST et wgMLST permettent néanmoins d'affirmer que toutes les souches étudiées sont génétiquement reliées. Les souches de l'épidémie de Belgique appartiennent au même complexe clonal suggérant une transmission de patient à patient de la même souche. Ces souches sont génétiquement proches mais différentes des autres souches 027 variant de Belgique (PCR-ribotype 176) et de France (PCR-ribotype 036). Le nouveau variant isolé à l'hôpital Saint Philibert de Lomme en France est plus proche des souches de PCR ribotype 176 que du PCR ribotype AI-33.

Le MLVA a permis de séparer les souches mais avec des distances courtes (nombre de STRD faible qui ne permet pas de conclure sur la distance génétique des souches). Le typage par cgMLST et wgMLST a fourni des résultats cohérents sur l'évolution des souches et plus précis que le typage par MLVA. Ces deux méthodes ont permis de montrer que le nouveau variant AI-33 dérive sans doute du PCR ribotype 176 qui est un variant épidémique ayant déjà été identifié en Europe de l'Est (notamment en Pologne au cours des années 2011 à 2013).

LEBLANC A.

Rapport de stage dans le cadre du PIR génétique

*Comparaison génomique des variants des souches de *Clostridioides difficile* de PCR ribotype 027. 2019*

6-1-7 **PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de *C. difficile* isolées dans une population de prématurés**

Si le portage asymptomatique de *Clostridium difficile* est élevé chez le nouveau-né, il n'existe pas de données concernant les nouveau-nés prématurés (NPP) dont la période d'hospitalisation peut être prolongée. L'objectif était d'analyser la fréquence et la cinétique de colonisation par *C. difficile* des NNP pendant la 1^{ère} année de vie et de caractériser les souches isolées.

Une étude prospective longitudinale et monocentrique (Saint Vincent de Paul, Paris) a été menée sur une population de 124 NNP sains (inclusions 2008-2009). Les prélèvements de selles correspondaient aux périodes d'hospitalisation (1S: 1 semaine (≤ 8 jours) (nombre d'enfants prélevés, n=85); 1M : 1 mois (20j-40j) (n=84); SH : sortie de l'hôpital (j4-j149) (n=113)) et post hospitalisation (1-3 mois, n=38 ; 3-6 mois, n=23 ; 6-9 mois, n=27 ; 9-12 mois, n=23 ; >12 mois, n=34). *C. difficile* a été recherché sur milieu sélectif. La détection des toxines dans les selles a été réalisée par un test immuno-enzymatique. Les souches ont été caractérisées par PCR-ribotypage et PCR-multiplex (gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB* et *tpi*). Sur 379 échantillons analysés, 199 (52,5%) étaient positifs à *C difficile* en culture. Parmi ces échantillons, 10 étaient positifs avec une souche toxigène (5%) et 189 avec une souche non toxigène (NT) (95%). Les souches toxigènes ont toutes été isolées de selles prélevées après la sortie de l'hôpital. La fréquence de colonisation par les souches NT était de 20, 61, et 60% respectivement pour les prélèvements à 1S, 1M et SH. La majorité (94%) des souches NT appartenait à 2 PCR-ribotypes (PR) inhabituels. Après la sortie de l'hôpital et avant 12 mois, la proportion de NNP colonisés était proche de 70%; après 12 mois, la fréquence diminue à 53% et s'accompagne d'une augmentation de la diversité des PR. L'étude de la cinétique de colonisation a permis de montrer qu'un même NNP peut être colonisé par différents PR au cours du temps.

Pendant la période d'hospitalisation les NNP se colonisent avec des souches de *C. difficile* NT avec une fréquence élevée. La fréquence de colonisation tend à diminuer après la sortie de l'hôpital et se caractérise par une diversification des PR et l'apparition de souches toxigènes.

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

6-1-8 **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

"French observational study of fidaxomicin use for *Clostridioides difficile* infection".
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-089) *J. Med Microbiol.* 2020, soumis

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

"French observational study of fidaxomicin use for *Clostridioides difficile* infection".
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-089)

6-1-9 Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections (2016-2019)

Soutien financier : ECDC

Ce projet est organisé sous l'égide de l'Université de Leiden (E. Kuijper) et implique un consortium de 4 laboratoires de référence (Royaume-Uni, Autriche, Pays-Bas et France). Il est financé par l'ECDC.

Les objectifs de ce projet sont d'améliorer les stratégies de diagnostic des infections à *C. difficile* des laboratoires des Etats Membres, et d'améliorer les capacités des laboratoires à typer les souches de *C. difficile*. Notre laboratoire intervient dans 2 workpackages (Work package 1: Increase of CDI diagnostics and PCR ribotyping by train-the-trainer activities in EU/EEA Member States, and WP4: « Monitor and maximise the effectiveness of train-the-trainer activities »).

Réunion ECDC du 22 mai 2019 et participation à l'ESCMID Summer school du 3 juillet 2018 (Barbut F., *Clostridium difficile* infections: current threats)

6-2 Liste des publications et communications

6-2-1 Publications nationales

6-2-2 Publications internationales

BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V., DUBURCQ A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, FAGNANI F

Quality of life and utility decrement associated with *Clostridium difficile* infection in a French hospital setting.

Health Qual Life Outcomes. 2019 Jan 11;17(1):6. doi: 10.1186/s12955-019-1081-5.

COUTURIER J., ECKERT C., DAY N., BOUÉE S., YOUSOUF A., GRANDVOINNET L., CASTELLA W., LALANDE V., BARBUT F.

Clostridium difficile infections in general practice: results of a laboratory-based cohort study.

Clin. Microbiol. Infect. 2019 May;25(5):588-594

KNIGHT DR, KULLIN B, ANDROGA GO, BARBUT F, ECKERT C, JOHNSON S et al.

Evolutionary and Genomic Insights into *Clostridioides difficile* Sequence Type 11: a Diverse Zoonotic and Antimicrobial-Resistant Lineage of Global One Health Importance

mBio 2019 10 (2), e00446-19

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 14 (2), e0212568

CHAVES C, GAUME M, SALAUZE B, COUTURIER J, BARBUT F, VIALLE R.

Bacterial contamination of medical file folders in operating rooms.

Clin Microbiol Infect. 2019 Oct;25(10):1293-1294. doi: 10.1016/j.cmi.2019.06.008.

LE MARÉCHAL C, DRUILHE C, REPÉRANT E, BOSCHER E, ROUXEL S, LE ROUX S, POËZÉVARA T, ZIEBAL C, HOUDAYER C, NAGARD B, BARBUT F, POURCHER AM, DENIS M.

Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants.

MicrobiologyOpen. 2019 Oct;8(10):e872. doi: 10.1002/mbo3.872. Epub 2019 Sep 30.

GUERY B, GALPERINE T, BARBUT F.

Clostridioides difficile: diagnosis and treatments.

BMJ. 2019 Aug 20;366:l4609. doi: 10.1136/bmj.l4609. Review.

MARVAUD JC, QUEVEDO-TORRES S, ECKERT C, JANOIR C, BARBUT F.

Virulence of new variant strains of *Clostridium difficile* producing only toxin A or binary toxin in the hamster model.

New Microbes New Infect. 2019 Aug 16;32:100590. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100590.

GATEAU C, DEBOSCKER S, COUTURIER J, VOGEL T, SCHMITT E, MULLER J, MÉNARD C, TURCAN B, ZAIDI RS, YOUSOUF A, LAVIGNE T, BARBUT F.

Local outbreak of *Clostridioides difficile* PCR-Ribotype 018 investigated by multi locus variable number tandem repeat analysis, whole genome multi locus sequence typing and core genome single nucleotide polymorphism typing.

Anaerobe. 2019 Aug 13:102087. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.102087. [Epub ahead of print]

COLOMB-COTINAT M, ASSOUVIE L, DURAND J, DANIAU C, LEON L, MAUGAT S, SOING-ALTRACH S, GATEAU C, COUTURIER J, ARNAUD I, ASTAGNEAU P, BERGER-CARBONNE A, BARBUT F.

Epidemiology of *Clostridioides difficile* infections, France, 2010 to 2017.

Euro Surveill. 2019 Aug;24(35). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638.

2020

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.

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, sous presse

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. Anaerobes, 2020 sous presse.

6-2-3 Communications nationales

6-2-4 Communications internationales

COUTURIER J, SYED ZAIDI , FOUQUET C, GATEAU C, ECKERT C, BARBUT F.

In situ comparison of sodium hypochlorite versus peracetic acid for eradicating *C. difficile* spores : results of a cross-over prospective study.

29th ECCMID Amsterdam (Pays Bas) , 13-16 Avril 2019 (Poster)

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

Nontoxicogenic *Clostridioides difficile* strains against *C. difficile* colonization: an experimental study

30th ECCMID Paris (France) , 18-21 Avril 2020 (Communication orale)

6-2-5 Conférences sur invitations

BARBUT F.

Diagnosis of *C. difficile* infection

La gestione terapeutica dell'infezione da *C. difficile*

Rome, Italie 17 juillet 2019

BARBUT F.

Pitfalls in *C. difficile* diagnosis

European Centers for Disease Control and Prevention meeting

Stockolm, Suède 22-23 may 2019

BARBUT F.

C. difficile en pathologie humaine ; rôle du CNR

Séminaire de l'ANSES (invitation Olivier Firmesse)

11 décembre 2018, Maisons-Alfort

BARBUT F., *Clostridium difficile* : nouveautés épidémiologiques et diagnostiques
39^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti infectieuse, 2019, Paris 16-17 décembre 2019.

BARBUT F.
Mise en Place de la Transplantation de Microbiote Fécal (TMF): aspects pratiques
30^{ème} Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière
Strasbourg, 5-7 juin 2019

BARBUT F.
Actualités sur les infections à *Clostridioides difficile*
3^{ème} journée de Biologie médicale
Monaco, 6-8 novembre 2019

BARBUT F.
Actualités sur les infections à *Clostridioides difficile* (ICD)
Journée du colBVH
Paris, 21 juin 2019

BARBUT F.
Les différents aspects des infections à *Clostridioides difficile* (ICD)
Journée d'actualités physiopathologiques de Strasbourg
Strasbourg, 6 décembre 2019

6-2-6 Chapitres de livres

BARBUT F, LE MONNIER A, ECKERT C.
Clostridium difficile.
In « REMIC » (Référentiel en microbiologie médicale)
6^{ème} édition, 2018.

KUIJPER E., BARBUT F.
« *Clostridium* »
In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press 2019,
Editors: Karen C. Carroll, Michael A. Pfaller, Marie Louise Landry, Alexander J. McAdam, Robin Patel,
Sandra S. Richter, David W. Warnock

BARBUT F., MEYNARD JL, MAURY E, SURGERS L, ET ECKERT C.
Infections digestives à *Clostridium difficile*.
In « Traité de réanimation »
Masson-Elsevier eds, 2020

BARBUT F., GATEAU C., COUTURIER J.
Critères d'évaluation des marqueurs épidémiologiques en bactériologie
In « Traité EMC Biologie médicale » 2019.

Video

- Epidémiologie des infections à *Clostridium difficile*
Edimark.TV, 2018
Video vue 1596 fois au 22/02/2019

- Table ronde sur les infections à *C. difficile* (avec le Pr Guéry, infectiologue et le Pr Roblin, gastroentérologue)- Havas TV, 2018

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

7-1 *Projet DiaBloClo : Caractérisation de souches de C. botulinum et C. difficile au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.*

Collaboration, Dr Le Maréchal, Anses Laboratoire de Ploufragan

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 :

- déterminer la prévalence de *C. botulinum* et *C. difficile* dans la filière bovine via l'analyse de contenus intestinaux de bovins,
- de déterminer les caractéristiques des souches de *C. botulinum* et *C. difficile* isolées à partir des contenus intestinaux bovins,
- 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,
- 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 MARECHAL, C., DRUILHE C., REPERANT E., BOSCHER E., ROUXEL S., LE ROUX S., POEZEVARA, T., ZIEBAL C., HOUDAYER, C. NAGARD B. BARBUT F. POURCHER AM DENIS M. Evaluation of the occurrence of sporulating and non-sporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. Microbiologyopen. 2019 Oct;8(10):e872

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.

Anaerobes 2020, sus presse

7-2 *Projet DIFALIBO*

Projet en 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)

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 toxintype 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*.