

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Bactéries anaérobies et botulisme

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Institut Pasteur	Dr Christelle MAZUET
Laboratoire Associé	Saint-Antoine, APHP	Pr Frédéric BARBUT

LIVRET 1 :
CNR coordinateur
Bactéries anaérobies et botulisme

Dr Christelle MAZUET
Institut Pasteur

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights 5	
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	10
2.5 Activités d'expertises	11
2.6 Activités de séquençage	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	14
3. Activités de surveillance	15
3.1 Description du réseau de partenaires	15
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	15
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	22
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	25
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	25
4. Alertes	26
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	28
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	28
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	28
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	28
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	29
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	29
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	30

7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	31
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	32
1.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	35
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	35
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	35
1.3	Locaux et équipements	35
1.4	Collections de matériel biologique	37
1.5	Démarche qualité du laboratoire	38
2.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	39
2.1	Liste des techniques de référence	39
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	39
3.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	40

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

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

Cette année 2023 a été marqué au niveau organisationnel par :

- La modification de l'organisation du CNR avec l'arrivée d'un nouvel adjoint et d'un nouvel assistant administratif.
- La réalisation de travaux permettant la mise à disposition d'une pièce de laboratoire P2 supplémentaire.
- La mise en place de plusieurs nouvelles techniques au CNR dont l'amélioration de la technique SENSITITRE pour la réalisation des antibiogrammes avec la fabrication de nos bouillons Brucella maison, et la mise en place de plusieurs outils PCR dont PCR *Clostridium colinum*, PCR *Clostridium piliforme* et qPCR *Clostridium haemolyticum*.

Concernant nos activités d'expertise sur le botulisme :

- La prise en charge de 738 prélèvements à visée diagnostique (403 prélèvements humains, 183 prélèvements alimentaires, 75 prélèvements environnementaux, et 77 prélèvements vétérinaires).
- La détection de 9 foyers de botulisme alimentaire (dont la crise sanitaire de Bordeaux en septembre), 6 foyers de botulisme animal, 3 suspicions de botulisme iatrogène (dont alerte internationale ECDC) et l'absence de botulisme infantile.
- La gestion de l'alerte sanitaire IslaDelice sur la charcuterie halal en fin d'année.
- Le démarrage du renouvellement du stock de sérums neutralisant en fin d'année.

Concernant nos activités d'expertise sur les bactéries anaérobies :

- La prise en charge de 274 prélèvements ou souches de bactéries anaérobies (118 souches bactériennes, 88 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques, et 68 souches résolées de prélèvements reçus au CNR à des fins diagnostiques).
- La détection de 9 TIAC à *Clostridium perfringens*, dont certaines ayant entraîné le décès de plusieurs patients.
- L'alerte auprès de l'ANSES de cas répétés d'infections à *Clostridium haemolyticum* chez des bovins.
- L'encadrement d'une thèse de sciences au CNR sur la résistance aux antibiotiques du groupe *Bacteroides fragilis*, débutée en novembre 2023.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

The NRC Anaerobic bacteria and botulism, and its associated laboratory *Clostridioides difficile*, monitor diagnostic and epidemiological follow-up of botulism infections, *Clostridioides difficile* infections, as well as the identification and characterization of anaerobic bacteria isolates.

Concerning the organizational part of the NRC, the highlights for 2023 are:

- The modification of the NRC organization with the arrival of a new deputy head and a new administrative assistant.
- Carrying out works to make an additional P2 laboratory room available.
- The implementation of several new techniques at the NRC including the improvement of the SENSITITRE technique for carrying out antibiotic susceptibility testing and the implementation of several PCR tools including *Clostridium colinum* PCR, *Clostridium piliforme* PCR, and *Clostridium haemolyticum* qPCR.

Concerning our expertise activities on botulism:

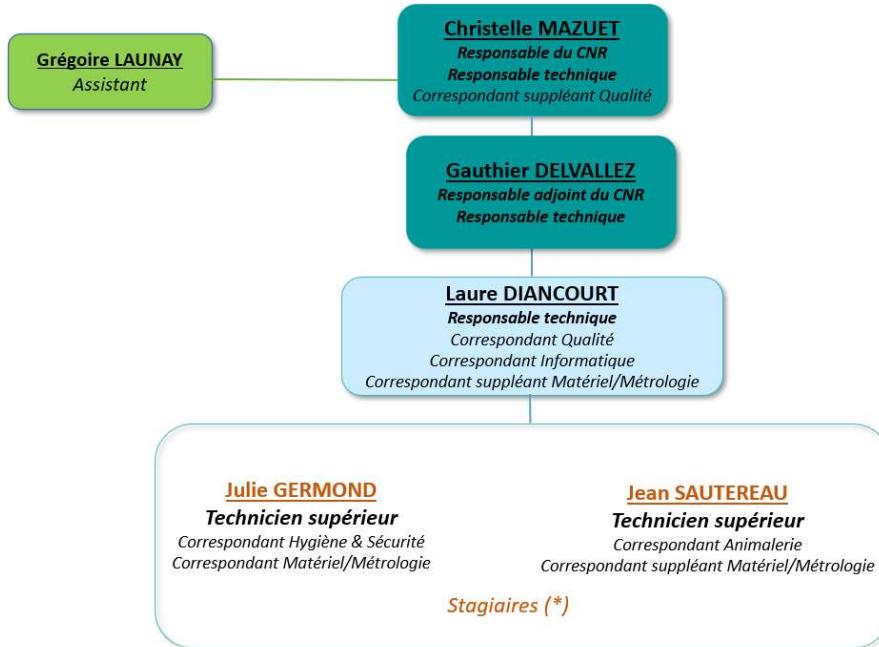
- Management of 738 samples for diagnostic purposes (403 human samples, 183 food samples, 75 environmental samples, 77 veterinary samples).
- The detection of 9 outbreaks of foodborn botulism (including the health crisis in Bordeaux in September), 6 outbreaks of animal botulism, 3 suspicions of iatrogenic botulism (including international ECDC alert) and the absence of infant botulism.
- The management of the IslaDelice health alert at the end of the year.
- The start of the renewal of the stock of neutralizing serums.

Concerning our expertise activities on anaerobic bacteria:

- The management of 274 samples or strains of anaerobic bacteria (118 bacterial isolates for characterization, 88 samples for the research of specific pathogens, and 68 isolates re-isolated from samples received at the NRC for diagnostic purposes).
- The detection of 9 *Clostridium perfringens* foodborne illness outbreaks, some of which led to the death of several patients.
- Alerting ANSES of repeated cases of *Clostridium haemolyticum* infections in cattle.
- Supervision of a PhD thesis about antibiotic resistance within the *Bacteroides fragilis* group, started in November 2023.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



L'année 2023 a été marquée par :

- L'absence prolongée de Christelle Mazuet ;
- L'arrivée de Gauthier Delvallez, pharmacien biologiste, comme responsable adjoint du CNR en janvier 2023 ;
- L'arrivée de Grégoire Launay comme assistant administratif à 50% en mars 2023.

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.

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

Mission et Organisation

Sans objet : absence de changement majeur.

Démarche Qualité

Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 15. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction de la Recherche Médicale ;

- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l’Institut Pasteur.

Les services supports de l’Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne mais également par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L’annexe d'accréditation ainsi que les sites et la portée sont disponibles sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

L’ensemble des CNR participant annuellement à des contrôles qualité externes. Ceux-ci n’étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter-laboratoires (EIL) avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Ainsi, le CNR participe chaque année à un EIL avec l’Institut de recherche biovétérinaire de Wageningen (WBVR, The Netherlands, Miriam Koene & Marc Engelsma) et le Laboratoire National du Botulisme et autres Clostridies zoonotiques belge (Institut de Santé, Sciensano, Bruxelles, Tom Van Nieuwenhuysen) afin d’évaluer, de comparer et d’échanger sur la capacité et la méthodologie de nos trois laboratoires pour le diagnostic du botulisme humain et animal. Il est important de préciser qu’au regard des contraintes de réglementation ANSM liées à la cession, importation, exportation et transport des Microorganismes et Toxines (MOT), ces essais sont très lourds et très onéreux à organiser et réaliser. En 2023, l’EIL a été organisé par le WBVR. Les résultats obtenus par le CNR pour les 5 échantillons artificiellement contaminés par de la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* étaient tous conformes.

L’année qualité 2023 du CNR s’est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	16 et 17 novembre 2023
Revue qualité 2023	28 mars 2024
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d’extension	04 juillet 2023
Audits internes qualité	07 décembre 2023
Audit interne technique	09 février 2023

Lors de l’évaluation COFRAC de novembre 2023, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la norme ISO 15189 v 2012.

Ci-dessous sont détaillées les perspectives 2024 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier – a vril 2024
Audits internes qualité et technique	Juin - décembre 2024
Revue de direction LRE-MS	A planifier
Audit de surveillance COFRAC	Juin 2025

En 2024, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il est déployé tout au long de l’année 2024 au sein des CNR.

2. Activités d'expertise

Eléments de l'année 2023 en termes de production d'expertise :

- 738 prélèvements reçus au total dans le cadre de notre expertise sur le diagnostic et la surveillance du botulisme (403 prélèvements humains, 183 prélèvements alimentaires, 77 prélèvements vétérinaires et 75 prélèvements environnementaux).
- 274 prélèvements ou souches traitées au total dans le cadre de notre expertise sur les bactéries anaérobies (118 souches bactériennes, 88 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques, et 68 souches réisolées de prélèvements reçus au CNR à des fins diagnostiques).
 - Développement d'outils PCR et PCR temps réel.
- Optimisation des antibiogrammes en microdilution réalisés sur les souches anaérobies, avec mise en place de bouillons Brucella supplémentés fabriqués au CNR.
 - Renouvellement du stock de sérum neutralisants anti-toxines débuté fin 2023.

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

2.1 Evolution des techniques

1) Plaques à façon SENSITITRE pour la détermination de CMI des souches anaérobies

Afin d'améliorer son expertise sur les souches de bactéries anaérobies, en plus de la réalisation d'un antibiogramme classique par méthode de diffusion en milieu gélosé, en 2017 le CNR a implanté la détermination des CMI en milieu liquide via les plaques commerciales Sensititre (ThermoFisher Scientific) afin de confirmer les antibiogrammes en disque et de rendre un résultat de CMI parfois nécessaire pour ajuster la posologie de certains antibiotiques. Les plaques utilisées étaient alors des plaques commerciales faisant partie de la gamme de produit Sensititre, dont le design n'était pas toujours cohérent avec les besoins du CNR (plusieurs antibiotiques testés non pertinents, nouveaux antibiotiques absents, CMI testées non optimales).

En mars 2023, avec l'aide de ThermoFisher Scientific, le CNR a réalisé le design de ses propres plaques afin d'améliorer le service rendu (rendu des CMI des antibiotiques) et de le rendre plus cohérent avec les référentiels actuels (CASFM et CLSI) :

- Mise en place de valeurs de CMI testées plus précises pour l'ensemble des antibiotiques (valeurs de concentrations testées trop hautes pour la majorité des antibiotiques, ne permettant pas de rendre un résultat de CMI précis pour les souches sensibles) ;
- Modification de l'amoxicilline – acide clavulanique avec une concentration fixe d'acide clavulanique à 2 mg/L comme recommandé dans le CASFM ;
- Ajout de l'ampicilline – sulbactam ;
- Ajout de l'ertapénème ;
- Ajout d'antibiotiques hors beta-lactamines : linézolide, rifampicine, tigécycline ;
- Suppression de la majorité des antibiotiques non interprétables par le CASFM, en ne conservant que

l'érythromycine, la tétracycline et la céfoxitine pour une meilleure interprétation des mécanismes de résistance.

Ces modèles de plaques sont utilisés depuis juillet 2023 au CNR et sont disponibles auprès du fournisseur pour les laboratoires qui souhaiteraient les utiliser (FRCNRAN1 et FRCNRAN2 pour France, CNR, Anaérobies 1 et 2).

Plate Code: **FRCNRAN1** Date: **14-Mar-23**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PEN 0.015	PEN 0.03	PEN 0.06	PEN 0.12	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	PEN 16	PEN 32
B	AMOX 0.015	AMOX 0.03	AMOX 0.06	AMOX 0.12	AMOX 0.25	AMOX 0.5	AMOX 1	AMOX 2	AMOX 4	AMOX 8	AMOX 16	AMOX 32
C	AUGC 0.015/2	AUGC 0.03/2	AUGC 0.06/2	AUGC 0.12/2	AUGC 0.25/2	AUGC 0.5/2	AUGC 1/2	AUGC 2/2	AUGC 4/2	AUGC 8/2	AUGC 16/2	AUGC 32/2
D	A/S4 0.015/4	A/S4 0.03/4	A/S4 0.06/4	A/S4 0.12/4	A/S4 0.25/4	A/S4 0.5/4	A/S4 1/4	A/S4 2/4	A/S4 4/4	A/S4 8/4	A/S4 16/4	A/S4 32/4
E	P/T4 0.015/4	P/T4 0.03/4	P/T4 0.06/4	P/T4 0.12/4	P/T4 0.25/4	P/T4 0.5/4	P/T4 1/4	P/T4 2/4	P/T4 4/4	P/T4 8/4	P/T4 16/4	P/T4 32/4
F	ETP 0.015	ETP 0.03	ETP 0.06	ETP 0.12	ETP 0.25	ETP 0.5	ETP 1	ETP 2	ETP 4	ETP 8	ETP 16	POS
G	IMI 0.015	IMI 0.03	IMI 0.06	IMI 0.12	IMI 0.25	IMI 0.5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	POS
H	MERO 0.015	MERO 0.03	MERO 0.06	MERO 0.12	MERO 0.25	MERO 0.5	MERO 1	MERO 2	MERO 4	MERO 8	MERO 16	POS

ANTIMICROBICS

AMOX	Amoxicillin
AUGC	Amoxicillin / Clavulanic Acid Constant 2
A/S4	Ampicillin / sulbactam constant 4
ETP	Ertapenem
IMI	Imipenem
MERO	Meropenem
PEN	Penicillin
P/T4	Piperacillin / Tazobactam Constant 4
POS	Positive Control

Plate Code: **FRCNRAN2** Date: **14-Mar-23**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ERY 64	CLI 64	LZD 64	RIF 64	MRD 64	TET 64	TGC 64	MXF 32	VAN 32	FOX 64	CHL 2	CHL 32
B	ERY 32	CLI 32	LZD 32	RIF 32	MRD 32	TET 32	TGC 32	MXF 16	VAN 16	FOX 32	CHL 1	CHL 16
C	ERY 16	CLI 16	LZD 16	RIF 16	MRD 16	TET 16	TGC 16	MXF 8	VAN 8	FOX 16	CHL 0.5	CHL 8
D	ERY 8	CLI 8	LZD 8	RIF 8	MRD 8	TET 8	TGC 8	MXF 4	VAN 4	FOX 8	CHL 0.25	CHL 4
E	ERY 4	CLI 4	LZD 4	RIF 4	MRD 4	TET 4	TGC 4	MXF 2	VAN 2	FOX 4	CHL 0.12	POS
F	ERY 2	CLI 2	LZD 2	RIF 2	MRD 2	TET 2	TGC 2	MXF 1	VAN 1	FOX 2	CHL 0.06	POS
G	ERY 1	CLI 1	LZD 1	RIF 1	MRD 1	TET 1	TGC 1	MXF 0.5	VAN 0.5	FOX 1	CHL 0.03	POS
H	ERY 0.5	CLI 0.5	LZD 0.5	RIF 0.5	MRD 0.5	TET 0.5	TGC 0.5	MXF 0.25	VAN 0.25	FOX 0.5	CHL 0.015	POS

ANTIMICROBICS

FOX	Cefoxitin
CHL	Chloramphenicol
CLI	Clindamycin
ERY	Erythromycin
LZD	Linezolid
MRD	Metronidazole
MXF	Moxifloxacin
POS	Positive Control
RIF	Rifampin
TET	Tetracycline
TGC	Tigecycline
VAN	Vancomycin

2) PCR en point final *Clostridium colinum*

L'entérite ulcéruse chez les volailles est due à une bactérie pouvant sporuler et difficile à cultiver : [*Clostridium colinum*]. Cette maladie pose un problème majeur dans les élevages de gibier à plume (perdrix grises et rouges en particulier). Les ulcères typiques de l'intestin et les lésions hépatiques permettent le diagnostic de la maladie mais les vétérinaires manquent d'une méthode moléculaire de diagnostic.

Suite à la demande d'un vétérinaire au sein du Réseau Cristal, une étude préliminaire dont l'objectif est de confirmer la présence de *C. colinum* a été lancée début 2023 en collaboration avec l'ANSES. La PCR en point final *C. colinum* a été développée au CNR et est en cours de validation via cette étude.

Une valorisation de ce travail avec une présentation orale des résultats préliminaires aura lieu les 20 et 21 mars 2024 lors des 15èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras. Les premiers résultats sont prometteurs, et permettraient éventuellement de développer un projet plus important sur la même thématique.

L'objectif final étant de développer la PCR *C. colinum* en temps réel afin que les laboratoires vétérinaires puissent la mettre en place dans leurs laboratoires.

3) PCR en point final *Clostridium piliforme*

Le CNR a été sollicité pour confirmer un cas de maladie de Tyzzer chez un poulain de haute valeur (haras) décédé. La maladie de Tyzzer, décrite pour la première fois en 1917, est une maladie mortelle touchant de nombreuses espèces animales, y compris l'espèce équine dont l'agent responsable est [*Clostridium*] *piliforme*.

Avec la mise en place de la PCR en point final par le CNR, la présence de la bactérie dans le morceau de foie mis en culture a pu être confirmée. Afin de valider cette PCR, une approche méta-génomique a été réalisée sur le prélèvement. En absence de génome de référence, nous avons pu confirmer la présence de la bactérie sur la base du 16S.

4) PCR en temps réel *Clostridium haemolyticum*

Suite à la détection de plusieurs cas de co-infection de *Clostridium botulinum* de type D/C chez les bovins avec *Clostridium haemolyticum*, le CNR a décidé de mettre en place un outil en temps réel afin de rechercher la présence de *Clostridium haemolyticum* chez les bovins. *C. haemolyticum* est décrit comme l'agent responsable de l'hémoglobinurie et est historiquement associé à la présence de douves qui provoquent des lésions du foie offrant des conditions propices de croissance de *C. haemolyticum* présent de manière latente dans les cellules de Kupffer des foies des bovins. On ne connaît pas la prévalence de la douve en France, ni de *C. haemolyticum* en portage dans le foie des bovins.

Une collaboration avec l'ANSES est en cours pour répondre à différentes questions sur cette bactérie dont la pathogénicité est peu connue chez les animaux, et le CNR recherche désormais de façon systématique *C. haemolyticum* sur les prélèvements de bovins.

5) Bouillons Brucella supplémentés fabrication maison

Suite à une rupture de stock en bouillons Brucella supplémentés chez ThermoFisher durant plusieurs mois, empêchant le CNR de réaliser ses CMI par microdilution et impactant son activité, le CNR a décidé de mettre au point la fabrication de ses propres bouillons Brucella supplémentés en suivant les recommandations du CLSI, qui sont les recommandations préconisées par le CA-SFM pour la réalisation des antibiogrammes des bactéries anaérobies. Les premiers essais de comparaison sont concluants (évaluation toujours en cours) et permettent au CNR de s'affranchir des stocks disponibles chez les industriels, beaucoup trop variables.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

N.A

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

N.A

2.4 Collections de matériel biologique

Les collections sont présentées en **annexe 1**.

2.5 Activités d'expertises

➤ Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés durant l'année 2023 sont donnés dans le tableau suivant. Au total le CNR a enregistré 274 dossiers concernant son activité d'expertise sur les bactéries anaérobies, versus 186 en 2022 (soit une augmentation de 47%).

Origine	Nombre de souches	Nombre de prélèvements	Total
Humaine	103	27	130
Vétérinaire	3	55	58
Alimentaire	5	6	11
Autres	7	0	7
Reprises	68		68
TOTAL	186	88	274

Le CNR a reçu 103 souches bactériennes d'origine humaine, soit pour les identifier (échec identification par MALDI-TOF), pour réaliser un toxinotypage, pour confirmer la résistance aux antibiotiques et/ou rechercher les gènes de résistance. Le CNR a également reçu 26 échantillons de selles dans le cadre de recherches de TIAC à *Clostridium perfringens* (9 TIAC à *Clostridium perfringens* confirmées, dont plusieurs décès). Enfin, un sérum non conforme pour une analyse non réalisable au CNR a été annulé.

Trois souches d'origine vétérinaire pour confirmation d'identification et toxinotypage ont été reçues au CNR (1 souche de *Clostridium haemolyticum*, 1 souche de *Clostridium baratii* et 1 souche de *Clostridium butyricum*). 48 prélèvements de foie et de contenu intestinal ont été reçus dans le cadre du projet *Clostridium colinum*, un morceau de foie pour confirmer une maladie de Tyzzer (*Clostridium piliforme*), un morceau de muscle de bovin et 5 prélèvements de cheval pour recherche de « charbon symptomatique » (*Clostridium chauvoei*).

Six prélèvements alimentaires ont été reçus pour l'investigation de TIAC à *Clostridium perfringens*, ainsi que 5 souches de *Clostridium* sp. isolées d'aliments par des laboratoires alimentaires pour confirmation d'identification ou toxinotypage.

Sept souches « autres » ont été analysées au CNR : 2 souches de contrôle qualité envoyées par la société Probioqual, la souche de référence *Clostridium colinum* commandée en Allemagne afin de valider la PCR en point final, et 4 souches de *Clostridium butyricum* envoyées par la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) pour toxinotypage, suite à l'ajout sur la liste des MOT des *Clostridium butyricum* toxinogènes.

Enfin, 68 souches ont pu être isolées par le CNR à partir de différents prélèvements reçus, 27 étant des souches de *Clostridium perfringens* isolées à partir de selles ou d'aliments reçus pour les suspicions de TIAC, 3 souches de *Bacillus cereus* toxinogènes, 28 souches de *Clostridium botulinum* isolées à partir de prélèvements humains, alimentaires ou vétérinaires, et 10 autres souches de *Clostridium* sp. isolées de divers prélèvements.

➤ Activités d'expertise pour le botulisme

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés durant l'année 2023 sont donnés dans le tableau suivant. Au total le CNR a enregistré 738 dossiers concernant son activité d'expertise sur le botulisme, versus 670 en 2022 (soit une augmentation de 10%).

Botulisme humain	403
Sérum (recherche de toxine botulique)	214
Selles (recherche de toxine botulique et de <i>Clostridium botulinum</i>)	173
Autres (foie, liquide gastrique)	3
Sérum (recherche d'anticorps neutralisants les toxines botuliques)	13
Echantillons agro-alimentaires	183
En relation avec une suspicion de botulisme humain	46
Autre (Industriels)	137
Echantillons environnementaux	75
En relation avec une suspicion de botulisme humain	0
Autre	75
Botulisme animal	77
Foie	28
Contenu intestinal	31
Sérum	9
Autres	9
TOTAL	738

214 prélèvements de sérum, 173 prélèvements de selles et 3 autres prélèvements (dont deux morceaux de foie reçus pour autopsie) ont été analysés dans le cadre de suspicion de botulisme humain. 13 sérums ont été reçus pour la recherche d'anticorps anti-toxine botulique de type A1 chez des patients ne répondant plus à leur traitement.

46 aliments au total ont été analysés pour enquête alimentaire suite à la confirmation de plusieurs cas de botulisme humain, et 137 pour des industriels souhaitant exportés leurs aliments à l'international (prestation de service).

75 échantillons environnementaux ont été reçus, la quasi-totalité envoyée par la DDPP85 suite à l'enfouissement des cadavres de volailles lié à l'épidémie de grippe aviaire.

Enfin, 77 échantillons ont été reçus dans le cadre du diagnostic de botulisme animal (prestation de service).

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

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) sur le campus de l'Institut Pasteur Illumina sur NextSeq 500

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.

Durant l'année 2023, le CNR a ainsi séquencé le génome complet de la totalité des souches de bactéries anaérobies non-MOT reçues ou isolées, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (ie séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie).

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. Depuis 2019, le séquençage des génomes de *Clostridium botulinum* est fait par le pôle de génotypage (PGP) de la CIBU, dont le responsable Jean-Claude Manuguerra est titulaire des autorisations nécessaires délivrées par l'ANSM. Les génomes de *Clostridium botulinum* ont été séquencés avec succès, le pipeline d'analyses bio-informatiques est encore à ajuster (particulièrement pour les types D/C et C/D).

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI) de L'Institut Pasteur CLC Genomics Workbench et le logiciel BioNumerics

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-informatiens 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-informatiens 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. La demande étant supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié), les CNR ne peuvent pas toujours bénéficier simultanément des compétences des bio-informatiens. Les CNRs et les unités qui les hébergent font dans ce cas appel à des ingénieurs ou bio-informatiens 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 ; récupération des gènes d'intérêt (codant pour des toxines, des résistances aux antibiotiques ; réorganisation des contigs le long d'un génome de référence).

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations d'épidémies : notamment cas de botulisme et TIAC à <i>Clostridium perfringens</i> ou à <i>Bacillus cereus</i>

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.

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

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Les séquences ne sont pas partagées sauf en cas de publication.

3. Activités de surveillance

Eléments clefs 2023 en termes de surveillance :

9 foyers de botulisme alimentaire ont été diagnostiqués.

Aucun botulisme infantile en 2023.

3 suspicions de botulisme iatrogène (dont alerte internationale ECDC).

6 foyers de botulisme animal.

Gestion de deux crises sanitaires d'ampleur en 2023 : cas de botulisme à Bordeaux avec un contexte international des patients en septembre, et alerte IslaDelice sur la charcuterie halal en décembre.

9 TIAC à *Clostridium perfringens* confirmées.

3.1 Description du réseau de partenaires

➤ Réseau de partenaires en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

Les souches nous sont adressées par l'intermédiaires des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés pour confirmation d'identification, vérification de l'antibiogramme et/ ou recherche des mécanismes de résistance. La répartition des partenaires s'étend sur toute la France. L'établissement d'un réseau d'hospitaliers pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries appartenant au groupe *Bacteroides fragilis* a débuté en décembre 2023 par l'intermédiaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux (Col.BVH).

➤ Réseau de partenaires pour le botulisme

Les échantillons 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 (Suisse).

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.

Le CNR collabore étroitement avec l'ANSES pour le botulisme animal.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

➤ Surveillance en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

Le CNR a reçu 118 souches bactériennes pour identification et/ou toxinotypage et/ou détermination de la résistance aux antibiotiques, 88 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques, et a isolé 68 souches de prélèvements pathologiques reçus au CNR à des fins diagnostiques.

- Souches et prélèvements d'origine humaine (103 souches, 27 prélèvements)

Genre (nombre)	Espèce (nombre)
<i>Aslocardovia</i> (1)	<i>omnicolens</i> (1)
<i>Bacteroides</i> (26)	<i>fragilis</i> (13), <i>thetaiotaomicron</i> (6), <i>faecis</i> (2), <i>ovatus</i> (3), <i>salyersiae</i> (1), <i>intestinalis</i> (1)
<i>Blautia</i> (1)	<i>coccoides</i> (1)
<i>Capnocytophaga</i> (1)	<i>canimorsus</i> (1)
<i>Clostridium</i> (33)	<i>perfringens</i> (20), <i>tetani</i> (4), <i>sporogenes</i> (1), <i>difficile</i> (1), <i>baratii</i> (1), <i>butyricum</i> (4), <i>innocuum</i> (1), <i>tertium</i> (1)
<i>Cutibacterium</i> (2)	<i>acnes</i> (1), <i>avidum</i> (1)
<i>Desulfovibrio</i> (1)	<i>fairfieldensis</i> (1)
<i>Finegoldia</i> (1)	<i>magna</i> (1)
<i>Fusobacterium</i> (2)	<i>necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> (1), sp. (Nouvelle espèce ?) (1)
<i>Gemella</i> (1)	<i>morbillorum</i> (1)
<i>Mediterraneibacter</i> (1)	<i>gnavus</i> (1)
<i>Paenibacillus</i> (1)	<i>sordellii</i> (1)
<i>Parabacteroides</i> (1)	<i>distasonis</i> (1)
<i>Peptostreptococcus</i> (2)	<i>anaerobius</i> (1), sp. (Nouvelle espèce ?) (1)
<i>Phocaeicola</i> (4)	<i>dorei</i> (1), <i>vulgatus</i> (2), <i>massiliensis</i> (1)
<i>Prevotella</i> (9)	<i>bivia</i> (9)
<i>Schaalia</i> (1)	<i>cardiffensis</i> (1)
<i>Varibaculum</i> (1)	<i>vaginae</i> (1)
<i>Veillonella</i> (4)	<i>parvula</i> (2), <i>atypica</i> (1), <i>dispar</i> (1)
<i>Winkia</i> (1)	<i>neuuii</i> subsp. <i>anitratata</i> (1)
Absence de subculture (6)	
Contaminée (1)	<i>Staphylococcus hominis</i> (1)
Transfert CIBU (2)	<i>Bacillus</i> sp. (2)

En plus de ces souches, le CNR a également reçu 26 échantillons de selles dans le cadre de recherche de TIAC à *Clostridium perfringens* (9 confirmées), et un sérum non conforme pour une analyse non réalisable au CNR.

- Souches et prélèvements d'origine vétérinaire (3 souches, 55 prélèvements)

Espèce	Nombre
<i>Clostridium haemolyticum</i>	1
<i>Clostridium baratii</i>	1
<i>Clostridium butyricum</i>	1

En plus de ces souches, le CNR a reçu 48 prélèvements (Foie et caecum) de volailles pour la recherche de *[Clostridium] colinum*, 6 prélèvements pour recherche de charbon symptomatique (*Clostridium novyi*), et un prélèvement de foie pour la recherche de *[Clostridium] piliforme* chez un poulin.

- Souches et prélèvements d'origine alimentaire (5 souches, 6 prélèvements)

Espèce	Nombre
<i>Clostridium perfringens</i>	3
<i>Clostridium cochlearium</i>	1
<i>Clostridium cagae</i>	1

En plus de ces souches, le CNR a reçu 6 prélèvements alimentaires pour la recherche de *Clostridium perfringens* dans le cadre de TIAC.

- Souches et prélèvements d'origine autre (7 souches)

Espèce	Nombre
<i>Bacteroides fragilis</i> (EEQ)	1
<i>Cutibacterium acnes</i> (EEQ)	1
<i>Clostridium baratii</i>	4
<i>Clostridium colinum</i> (référence)	1

Le CNR a reçu 3 souches bactériennes d'industriels :

- 2 souches d'EEQ envoyés par Probioqual pour ajouter une expertise CNR sur les contrôles qualités qu'ils fournissent à leurs clients
- 1 souche de référence commandée en Allemagne pour la mise au point de la PCR *Clostridium colinum*.
- 4 souches de la CIP de l'Institut Pasteur pour réaliser un toxinotypage.

- Isolements (reprises) de souches à partir de prélèvements (68 souches)

68 souches bactériennes ont été isolées à partir des différents prélèvements reçus pour expertise :

Espèce	Nombre
<i>Clostridium botulinum</i>	28
<i>Clostridium perfringens</i>	27
<i>Bacillus cereus</i>	3
<i>Clostridium haemolyticum</i>	3
<i>Clostridium combesii</i>	2
<i>Clostridium tetani</i>	1
<i>Clostridium novyi</i>	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
<i>Clostridium massilioides</i>	1
<i>Clostridium</i> sp.	1

➤ **Surveillance du botulisme**

- Botulisme humain

En 2023, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 214 échantillons de sérum, 173 échantillons de selles, 1 liquide gastrique, et 2 morceaux de foie (dans le cadre d'une autopsie). 9 foyers de botulisme alimentaire ont été confirmés, représentant un total de 15 patients.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente, avec sept foyers de type B (dont un non protéolytique), un de type A, et un de type bivalent AB (cf tableau récapitulatif).

Trois échantillons pour suspicion de botulisme iatrogène ont également été analysés, et ont permis pour deux d'entre eux, bien que non confirmés, de participer à l'alerte internationale ECDC (cf chapitre alerte).

A noter qu'aucun botulisme infantile n'a été diagnostiqué en 2023.

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

Année	Foyers (cas) déclarés
2023	9 (15)
2022	6 (* +1) (13 (* +2))
2020	7 (11)
2019	9 (11)
2018	7 (11)
2017	3 (4)
2016	11 (20)
2015	14 (22)
2014	4 (11)
2013	11 (19)

* (En Suisse)

- Recherche et titrage d'anticorps anti-toxine botulique A

13 prélèvements ont été reçus pour la recherche d'anticorps anti-toxine botulique A pour des patients ne répondant plus à leur traitement. Une seule recherche était positive.

- Botulisme animal

77 prélèvements vétérinaire ont été reçus pour une recherche de botulisme animal.

1 foyer de botulisme aviaire de type D/C a été confirmé en mars dans un élevage de dindons sur sérum, foie et contenu intestinal. Les échantillons ont été envoyés dans un contexte de mortalité en hausse avec signes de paralysie.

2 foyers de botulisme bovin de type D/C et 2 foyers de type C ont également été confirmés (cf tableau récapitulatif).

D'autres prélèvements reçus, négatifs pour la recherche de *Clostridium botulinum*, ont été détectés positifs pour *Clostridium haemolyticum* et ont permis d'alerter l'ANSES (cf chapitre alerte) sur des cas répétés d'infection à *Clostridium haemolyticum* dans des élevages bovins.

Enfin, un foyer de botulisme aviaire en faune sauvage (canards) de type E a été confirmé au CNR, entraînant la fermeture du site pendant plusieurs jours

- Botulisme agroalimentaire et environnemental

183 échantillons d'aliments ont été envoyés au CNR pour une recherche de toxine botulique ou de *Clostridium botulinum* : 137 de la part d'industriels (tous négatifs, et 46 dans le cadre d'enquêtes alimentaires suite à des cas de botulisme humains).

75 échantillons environnementaux ont été traités dans le cadre de la détection de *Clostridium botulinum* de type B à haute concentration par l'ANSES lors de la surveillance d'un site d'enfouissement de cadavres de volailles.

Nombre de foyers et de cas de botulisme alimentaire

Période du 01/01/2023 au 31/12/2023 (1/2)

Cas	Mois	Foyer	Nb de cas	Dossier	Signes cliniques	Autres prélèvements biologiques	Remarques	Souches isolées
1	Mars	ARGENTEUIL Botulisme alimentaire type B	1	2023/00165 Serum	DDS : 28/02/2023 Hospitalisé le 01/03/2023 Diplopie, mydriase, difficultés de déglutition et d'élocution, nausées et vomissements, et détresse respiratoire nécessitant une réanimation avec ventilation assistée	2023/00191 Soupe aux cèpes 2023/00192 Soupe aux cèpes 2023/00193 Velouté de champignon 2023/00195 Tapenade 2023/00196 Coq au vin 2023/00198 Bolognaise	Soupe de champignon commerciale conservée dans un bocal en verre à température ambiante et consommée périmée. Il s'agit de soupes fraîches à conserver entre 0 et +4°C. La bouteille entamée (lot 010) avait une DLC au 16/02/23. Le patient a déclaré avoir consommé la soupe le 27/02/23 au soir. Le produit a donc été consommé périmé et conservé à température ambiante.	Clostridium botulinum type B 2023/00239 (isolé de 2023/00191)
2	Avril	AMIENS Botulisme alimentaire type B	1	2023/00284 Selles	DDS : 04/04/2023 Hospitalisée en réanimation le 06/04/2023 avec ventilation assistée devant une hypotonie et paralysie flasque, des troubles de la conscience et une atteinte bulbaire, mydriase bilatérale, difficultés de déglutition et détresse respiratoire sévère	2023/00283 Serum (négatif, volume insuffisant)	Enfant de 6 mois. Petit pot (conserve) fait maison avec une très mauvaise odeur à l'ouverture consommé le 04/04/2023. <u>Co-infection <i>Bacillus cereus</i> toxinogène hb1D + nheA + ces + cytK2</u> Conserve non testée car pot rincé et nettoyé par la nounou.	Clostridium botulinum type B 2023/00290 (isolé de 2023/00284)
3	Juin	SAINT LÔ Botulisme alimentaire type A	1	2023/00372 Serum 2023/00373 Serum	DDS : 01/06/2023 Patient hospitalisé en réanimation avec assistante ventilatoire présentant une diplopie, difficultés de déglutition et d'élocution, une paralysie des membres et détresse respiratoire sévère	2023/00374 Ecouillon rectal 2023/00390 Selles 2023/00391 Pâté	Suspicion initiale sur sérum devant une légère activité toxique neutralisée en anti-A. Consommation d'une conserve artisanale (mélange de viande) le 17/05/2023 puis d'un pâté artisanal le 30/05/2023.	Clostridium botulinum type A 2023/00412 (isolé de 2023/00390) Clostridium botulinum type A 2023/00400 (isolé de 2023/00391)
4	Juin	CLERMONT-FERRAND Botulisme alimentaire type Bnp	1	2023/00399 Serum	DDS : 11/06/2023 Patiente hospitalisée aux urgences pour diarrhées initiales et vomissements, mydriase bilatérale avec diplopie, troubles de la déglutition et paralysie des membres modérées. Absence de réanimation et de ventilation assistée.	2023/00404 Nuggets 2023/00405 Piments 2023/00418 Nuggets 2023/00419 Piments 2023/00416 Selles	Consommation d'une conserve de piments commerciale et de nuggets achetés à l'épicerie. Résultats de l'enquête alimentaire douteux (Nuggets de poulet positifs type B)	Clostridium botulinum type Bnp 2023/00575 (isolé de 2023/00416) Clostridium botulinum type Bnp 2023/00576 (isolé de 2023/00418)
5	Juin	ANGERS Botulisme alimentaire type AB	1	2023/00423 Selles	DDS : 22/06/2023 Patient hospitalisé en réanimation sous ventilation assistée pour parésie des MI avec diplopie et mydriase, difficultés d'élocution et détresse respiratoire.	2023/00422 Serum (négatif, volume insuffisant) 2023/00429 Aliment 2023/00433 Sérum (tardif, post anti-toxine ?)	Consommation le 21/06/2023 d'une conserve de pâté artisanale. Patient a reçu de la tegeline Ig IV pour suspicion initiale de SGB, revu en botulisme confirmé après résultats CNR.	Clostridium botulinum type AB 2023/00718 (isolé de 2023/00423) Clostridium botulinum type AB 2023/00719 (isolé de 2023/00429)
6	Juillet	NANCY Botulisme alimentaire type B	1	2023/00495 Serum	DDS : 19/07/2023 Patient hospitalisé en réanimation ne nécessitant pas de ventilation assistée avec atteinte de plusieurs nerfs crâniens, troubles oculaires (diplopie), digestifs et paralysie des membres modérée	2023/00535 Selles	Patient ayant consommé de la viande achetée en supermarché et consommée avariée le 19. Devant le délai de prise en charge et le délai d'obtention d'antitoxines, le patient n'en a pas reçu.	Clostridium botulinum type B 2023/00577 (isolé de 2023/00535)
7	Août	VERSAILLES Botulisme alimentaire type B	1	2023/00555 Selles	DDS : le 06/08/2023 Nausées, troubles vision, syndrome sec et constipation. Hospitalisation le 13/08/2023. Signes ophtalmo : vision floue, mydriase bilatérale, paralysies oculomotrices horizontales bilatérales. Aucun signe neurologique, ni respiratoire.	2023/00554 Serum 2023/00556 Conserve maison consommée 2023/00557 Conserve non consommée	Consommation conserve en bocal de verre (courgettes, carottes) le 05/08/2023, faite il y a 1 an, par la famille. Il est le seul à en avoir mangé.	Clostridium botulinum type B 2023/00579 (isolé de 2023/00556) Clostridium botulinum type B 2023/00578 (isolé de 2023/00555)

Nombre de foyers et de cas de botulisme alimentaire
Période du 01/01/2023 au 31/12/2023 (2/2)

Cas	Mois	Foyer	Nb de cas	Dossier	Signes cliniques	Autres prélevements biologiques	Remarques	Souches isolées
8	Août	NIMES Botulisme alimentaire type B	1	2023/00572 Serum	DDS : 10/08/2023 Ptosis, mydriase, hypotonie, déficit moteur des 4 membres, troubles déglutition Absence de troubles respiratoires	2023/00590 Selles	Signes cliniques environ 2 heures après avoir consommé : une conserve, une brandade et du jambon achetés à l'Intermarché le 10/08.	Clostridium botulinum type B 2023/00756 (isolé de 2023/00590)
9	Septembre	BORDEAUX Botulisme alimentaire type B	7	2023/00638 Serum 2023/00641 Serum 2023/00642 Serum 2023/00643 Serum 2023/00644 Selles	<p>Le 6 septembre 2023, le premier patient a été admis en unité de soins intensifs. Le patient présentait une paralysie oculomotrice bilatérale, une mydriase, un ptosis, des troubles de la déglutition, des nausées et des vomissements, nécessitant une ventilation mécanique invasive. En raison des symptômes neurologiques, le patient a été initialement traité pour un syndrome de Guillain-Barré. Les 9 et 10 septembre, deux patients supplémentaires ont été admis en réanimation médicale avec des symptômes neuro-ophthalmiques, digestifs, et ORL similaires. Les trois patients étaient en visite en France pour assister à un tournoi de rugby.</p> <p>Les autorités de santé publique ont été contactées lorsqu'un foyer a été suspectée, le 10 septembre. Les antécédents des patients ont révélé que la source suspectée était des conserves de sardines maison consommées dans le même bar/restaurant à Bordeaux par les trois individus.</p> <p>Les 11 et 12 septembre 2023, d'autres patients, également visiteurs internationaux en France, ont été hospitalisés avec des signes cliniques de botulisme.</p> <p>Au total, une grave épidémie de botulisme de type B avec quinze cas (10 confirmés biologiquement, dont 7 au CNR et 3 au UK) était liée à la consommation de sardines en conserve dans un restaurant de Bordeaux, en France, lors de la Coupe du monde de rugby. Les cas provenaient de sept pays. Un décès a été enregistré.</p>	2023/00647 Serum 2023/00648 Selles 2023/00650 Serum 2023/00651 Serum 2023/00652 Serum 2023/00653 Serum 2023/00654 Selles 2023/00655 Selles 2023/00656 Selles 2023/00657 Selles 2023/00658 Selles 2023/00669 Selles 2023/00670 Selles 2023/00682 Serum 2023/00686 Selles 2023/00687 Selles 2023/00688 Serum 2023/00696 Sang 2023/00697 Selles 2023/00698 Foie 2023/00699 Sang 2023/00700 Selles 2023/00701 Foie	2023/00660 Foie gras 2023/00661 Aubergines 2023/00662 Coppa 2023/00663 Bœuf 2023/00664 Sardines 2023/00665 Confiture 2023/00666 Couscous 2023/00667 Agneau 2023/00668 Kimchi 2023/00671 Ail 2023/00672 Coriandre 2023/00673 Cumin 2023/00674 Huile 2023/00675 Moutarde 2023/00676 Sardines 2023/00677 Sardines 2023/00678 Sardines 2023/00679 Sardines	Clostridium botulinum type B 2023/00706 (isolé de 2023/00657) Clostridium botulinum type B 2023/00707 (isolé de 2023/00658) Clostridium botulinum type B 2023/00708 (isolé de 2023/00662) Clostridium botulinum type B 2023/00709 (isolé de 2023/00664) Clostridium botulinum type B 2023/00710 (isolé de 2023/00669) Clostridium botulinum type B 2023/00711 (isolé de 2023/00676) Clostridium botulinum type B 2023/00712 (isolé de 2023/00677) Clostridium botulinum type B 2023/00713 (isolé de 2023/00678) Clostridium botulinum type B 2023/00714 (isolé de 2023/00679) Clostridium botulinum type B 2023/00738 (isolé de 2023/00686) Clostridium botulinum type B 2023/00740 (isolé de 2023/00700)

Nombre de foyers et de cas de suspicion de botulisme iatrogène

Période du 01/01/2023 au 31/12/2023

Cas	Mois	Foyer	Nb de cas	Dossier	Signes cliniques	Confirmation biologique	Remarques
1	Mars	1 – Suisse 2 - Mulhouse	2	2023/00173 Serum 2023/00236 Serum	Céphalées, troubles visuels, vertiges, dyspnée, dysphagie, dysarthrie	Absence de confirmation biologique au CNR. Foyer confirmé par l'équipe du Robert Koch Institut.	Début mars, 5 cas de botulisme iatrogène suspectés en Allemagne chez des personnes ayant subi un traitement par Botox en Turquie. Deux semaines plus tard, plus de 70 cas étaient rapportés en Allemagne, en Autriche, en Suisse et en France, tous liés à des interventions médicales en Turquie entre février et mars 2023. Il s'agissait d'injection de toxine botulique en intra-gastrique, au niveau du pylore. Les investigations ont bien retrouvé un produit authentique, mais utilisé de manière non conforme.
2	Juillet	Alès	1	2023/00479 Serum	Flou visuel, difficultés de déglutition et élocution, constipation et paralysie des membres modérées	Absence de confirmation biologique.	Injection de DYSPORT (toxine botulique type A) le 04/07/2023 dans un centre privé à Ales à visée esthétique.

Nombre de foyers de botulisme animal

Période du 01/01/2023 au 31/12/2023

Cas	Mois	Foyer	Dossier	Signes cliniques	Remarques	Souches isolées
1	Mars	Pas-De-Calais Botulisme aviaire type D/C	2023/00248 Serum 2023/00249 Foie 2023/00250 Contenu intestinal	Mortalité en hausse dans un élevage de dindons (110 jours) avec signes de botulisme (paralysie)	Elevage du Pas de Calais (62)	<i>Clostridium botulinum</i> type D/C 2023/00411 (isolé de 2023/00249)
2	Juillet	Côte d'Or Botulisme bovin type D/C	2023/00458 Contenu intestinal 2023/00459 Serum (non réalisé)	DDS : 30/06/2023 / Décès le 02/07/2023 Légères coliques, constipation, puis parésie postérieure et paralysie flasque avec décès en 48 heures	Taille du cheptel : 150 bovins 1er cas de la saison (9 cas l'été 2022)	<i>Clostridium botulinum</i> type D/C 2023/00627 (isolé de 2023/00458)
3	Aout	Côte d'Or Botulisme aviaire type E	2023/00538 Foie 2023/00539 Contenu intestinal	Canards faune sauvage	2023/00536 Cygne négatif 2023/00537 Cygne négatif	NA
4	Septembre	Lot et Garonne Botulisme bovin type C	2023/00612 Caecum 2023/00613 Contenu intestinal 2023/00614 Foie 2023/00615 Ensilages	Paralysie train arrière, paralysie linguale, absence de fièvre	Taille du cheptel : 30 Affection 15%	NA
5	Septembre	Puy de Dôme Botulisme bovin type C	2023/00632 Foie 2023/00633 Contenu intestinal	Non renseignés	Taille du cheptel : 80 Affection 13% 2023/00630 foie négatif 2023/00631 contenu intestinal négatif	NA
6	Octobre	Nord Botulisme bovin type D/C	2023/00776 Contenu intestinal 2023/00777 Foie 2023/00778 Contenu intestinal 2023/00779 Foie	Mortalité	Nord (59)	NA

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

Depuis septembre 2019, le CNR réalise un antibiogramme de manière systématique à la réception ou à l'isolement d'une souche suite à l'augmentation des demandes par les laboratoires, particulièrement pour le genre *Bacteroides*. En effet, certaines espèces, principalement appartenant aux genres *Bacteroides*, se montrent de plus en plus résistantes aux antibiotiques.

Durant l'année 2023, le CNR a donc analysé 103 souches bactériennes d'origine humaine envoyées par les laboratoires, 3 souches vétérinaire, 5 souches alimentaires et 7 souches autres.

A ceci se rajoutent les 68 souches isolées par le CNR à partir d'échantillons reçus.

Toutes les souches reçues ou isolées au CNR n'ont pas bénéficié d'un antibiogramme, certaines d'entre elles ayant été transmises pour un toxinotypage.

Le CNR ne recevant que les souches avec un profil de résistance particulier ou impliquées dans un contexte clinique particulièrement grave ou peu commun, aucune estimation de prévalence de résistance n'est réalisée.

Les données d'antibiorésistance sont décrites ci-dessous.

- *Bacteroides* du groupe *fragilis*

Sur les 31 souches du groupe *Bacteroides fragilis* étudiées :

10 souches sont résistantes au méthronidazole, toutes porteuses du gène *nim* (*A*, *E* ou *D*). Toutes les souches sensibles sont négatives pour la recherche de *nim*.

Concernant les beta-lactamines, 16 souches sont résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique et ampicilline-sulbactam, et 8 sont résistantes à la pipéracilline-tazobactam. Plusieurs souches ont été envoyées au CNR pour étudier une discordance entre l'amoxicilline-acide clavulanique (sensible) et la pipéracilline-tazobactam (résistant). Si les résistances à la pipéracilline-tazobactam n'ont pas été confirmées au CNR, il est évident que le diamètre de la pipéracilline-tazobactam est largement diminué par rapport à l'amoxicilline-acide clavulanique (parfois de moitié), avec des CMI plus élevées pour la pipéracilline-tazobactam, mais qui restent catégorisées sensibles selon le CASFM. Ces phénomènes de discordance sont à surveiller.

4 souches de *Bacteroides fragilis* sensu stricto sont résistantes à l'ensemble des carbapénèmes (avec des CMI supérieures à 32 µg/mL), avec présence du gène *cflA* en association avec des séquences d'insertion (IS). Une souche de *Bacteroides salyersiae* est également de sensibilité diminuée (CMI entre 4 et 8 µg/mL). On observe de plus en plus de résistances non croisées aux carbapénèmes également, avec l'ertapénème étant le plus touché, et l'imipénème qui reste le moins atteint.

19 souches sont résistantes à la clindamycine, en grande majorité porteuses de gènes *erm(F)* et/ou *erm(G)*, exceptés pour trois d'entre elles.

13 souches sont résistantes à la moxifloxacine, 5 en lien avec une mutation en position 82 du gène *gyrA*.

- *Clostridium perfringens*

Sur les 14 souches de *C. perfringens* ayant bénéficié d'un antibiogramme en 2023, aucune ne présentait de résistance aux antibiotiques inclus dans la liste du CASFM.

- *Prevotella bivia*

9 antibiogrammes complets ont été réalisés sur les souches de *Prevotella bivia*. Les 9 souches analysées ont toutes été isolées de prélèvements de pus et ont été envoyées pour suspicion de résistance au métronidazole.

La résistance au métronidazole a été confirmée pour 8 souches sur 9, la dernière ayant été retrouvée sensible par trois techniques différentes (probable défaut d'anaérobiose au niveau du laboratoire expéditeur).

Les souches résistantes ont des CMI allant de 24 à 256 mg/L. Pour une seule des souches, le gène *nimK* a été retrouvé au séquençage complet, expliquant cette résistance. Pour les 7 autres souches, la résistance au métronidazole n'est pas expliquée. Cette situation étant de plus en plus fréquente, le CNR a contacté le Dr Veloo, au département de microbiologie médicale à l'université de Groningen aux Pays-Bas et ayant décrit le dernier gène *nim* (*nimK*). Le même phénomène est observé dans leur laboratoire, avec des souches résistantes au métronidazole, avec l'absence de mécanisme de résistance connu au séquençage qui pourrait expliquer cette résistance.

La majorité des souches présentaient une résistance à l'amoxicilline avec présence du gène *cfxA*, dont l'activité est toujours rattrapée avec les inhibiteurs de bêta-lactamase (amoxicilline-acide clavulanique sensible).

3 souches sont résistantes à la clindamycine, dont 2 avec présence du gène *erm(F)*.

5 souches sont résistantes à la moxifloxacine, et deux autres avec des CMI limites supérieures.

Toutes les souches sont sensibles à la tigécycline, linézolide, rifampicine, chloramphénicol, carbapénèmes et pipéracilline - tazobactam.

- *Clostridium botulinum*

Toutes les souches de *Clostridium botulinum* isolées de prélèvements divers et ayant bénéficié d'un antibiogramme, aucune ne présentait de résistance aux antibiotiques inclus dans la liste du CASFM.

- *Clostridium haemolyticum*

Le CNR a reçu 1 souche de *Clostridium haemolyticum* d'un laboratoire vétérinaire (initialement identifiée par le laboratoire comme *Clostridium botulinum* sur Maldi-TOF) et a isolé 3 souches de prélèvements vétérinaires.

Une alerte a été faite au niveau de l'ANSES devant ces cas répétés et peu habituels (cf chapitre alerte).

Les antibiogrammes n'ont pas été effectués sur ces souches.

- *Clostridium tetani*

4 souches de *Clostridium tetani* ont été reçues au CNR pour toxinotypage. Les 4 souches possédaient le gène *tetX* codant pour la toxine tétanique, bien qu'une seule ne soit réellement impliquée dans un cas de tétonos avéré chez un patient présentant une paralysie faciale avec trismus (souche isolée d'une biopsie cutanée). Les trois autres souches étaient isolées de patients non suspects de tétonos car absence de symptômes chez des patients à jour dans leur vaccination (souches isolées de prélèvements cutanés).

Ces quatre souches ne présentaient aucune résistance aux antibiotiques inclus dans la liste du CASFM.

- *Fusobacterium sp*

Les deux souches analysées montrent une sensibilité relative aux antibiotiques avec seulement une souche résistante à la moxifloxacine (CMI à 8 µg/mL), isolée d'une plaie par morsure de chien, et appartenant potentiellement à une nouvelle espèce.

La deuxième souche était isolée d'un LCR chez un patient présentant une otite associée à une méningite aseptique. Cette souche de *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* présentait plusieurs facteurs de virulence.

- *Veillonella* sp.

4 souches de *Veillonella* ont été traitées au CNR pour une suspicion de résistance soit au métronidazole, soit à la pipéracilline – tazobactam. Une résistance au métronidazole a été confirmée, et pour l'ensemble des souches la CMI pour la piépracilline – tazobactam était élevé (résistante ou limite supérieure sensible). Ces phénotypes de résistance sont décrits chez *Veillonella*.

3.4 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.

Le CNR a également été en contact avec son homologue allemand au Robert Koch Institute lors du foyer de botulisme iatrogène en Europe.

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.

En 2023, le CNR a apporté son aide technique à l'Institut Pasteur d'Alger en lui fournissant des réactifs pour PCR qui a permis l'identification d'un foyer de botulisme.

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

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Sans objet.

4. Alertes

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

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

1) Détection de *Clostridium haemolyticum* dans 4 élevages bovins depuis janvier 2023

- En janvier 2023, le CNR a reçu une souche isolée du contenu intestinal d'un bovin par un laboratoire vétérinaire dans le département 42 pour identification de l'isolat. Le séquençage complet de la souche a permis de montrer qu'il s'agissait d'une souche de *Clostridium haemolyticum*.
- En février 2023, le CNR a reçu en analyse un échantillon de foie de bovin (prélevé le 01/02/23) en provenance d'un élevage dans le département 59. La recherche de toxine botulique par test de létalité sur souris et de *C. botulinum* par PCR en temps réel se sont révélées négatives. *C. haemolyticum* a été détecté par PCR après enrichissement du foie. A la date d'envoi des échantillons, 5 génisses étaient couchées, 1 est morte naturellement, les 5 autres ont été euthanasiées.
- En avril 2023, le CNR a reçu des contenus intestinaux prélevés sur 2 bovins (prélevés le 16/04/23) en provenance d'un élevage dans le département 59. La recherche de toxine botulique par test de létalité sur souris et de *C. botulinum* par PCR en temps réel se sont révélées négatives. *C. haemolyticum* a été détecté par PCR après enrichissement dans les contenus intestinaux prélevés sur les deux bovins.
- En mai 2023, le CNR a de nouveau isolé une souche de *Clostridium haemolyticum* dans le foie d'un bovin dans un nouveau cheptel situé dans le département 88. L'analyse du foie et du contenu intestinal (prélevés le 02/05/23) était de nouveau négative pour la toxine botulique par test de létalité sur souris et pour *Clostridium botulinum* par PCR temps réel.

La détection de *C. haemolyticum* associée à des signes cliniques chez les bovins est peu fréquente au CNR. *C. haemolyticum* est décrit comme l'agent responsable de l'hémoglobinurie et est historiquement associé à la présence de douves qui provoquent des lésions du foie offrant des conditions propices de croissance de *C. haemolyticum* présent de manière latente dans les cellules de Kupffer des foies des bovins. On ne connaît pas la prévalence de la douve en France, ni de *C. haemolyticum* en portage dans le foie des bovins. Lors de ces 4 cas décrits, l'apparition des signes cliniques était brutale avec un décès en moins de 48 heures, et seul *C. haemolyticum* était retrouvé après culture des échantillons. Le dernier cas diagnostiqué au CNR datait de juillet 2022, avec la mise en évidence de *C. haemolyticum* dans un foie de bovin d'un élevage du département 72. Celui-ci était alors retrouvé en co-infection avec *C. botulinum* de type mosaïque D/C. La souche de *C. haemolyticum* avait pu être isolée et séquencée.

C. haemolyticum n'est pas recherché systématiquement. La prévalence de portage de cette bactérie par les animaux n'est pas connue. Il est à ce stade difficile de savoir s'il s'agit de l'agent à l'origine de la mort observée chez les bovins ou pas. Néanmoins, la détection de cette bactérie dans 4 élevages bovins interpelle et mérite une attention particulière.

Le CNR a décidé de déclarer les cas à l'ANSES et de déclarer également tous les futurs cas détectés.

Il a également été décidé de mettre en place la PCR *C. haemolyticum* (recherche de la toxine beta) en systématique au CNR sur tous les prélèvements reçus dans le cadre de décès suspects de bovins.

2) Cas de botulisme iatrogènes en Europe à la suite d'injections de toxine botulique

Le 7 mars 2023, le point focal national pour le Règlement sanitaire international (RSI) en Allemagne a notifié à l'OMS de cinq cas de botulisme iatrogène chez des personnes ayant suivi un traitement par injection de toxine botulique de type A dans des établissements de santé en Turquie. Au 17 mars 2023, 71 cas cliniques de botulisme avaient été signalés en Turquie (53 cas), en Allemagne (16 cas), en Autriche (un cas) et en Suisse (un cas, analysé au CNR), tous liés aux interventions médicales effectuées en Turquie entre le 22 février et le 1er mars 2023.

Un cas Français (Mulhouse) et analysé au CNR a été rajouté à la liste des patients ultérieurement.

Tous les cas ont touché des adultes, pour la plupart des femmes. Les cas dont on connaît le lieu de traitement avaient été traités dans deux hôpitaux turcs privés situés dans des endroits distincts.

Les produits utilisés pour le traitement ont été saisis et soumis à l'examen et à l'évaluation de l'Agence turque des médicaments et des dispositifs médicaux. Aucun nouveau cas symptomatique n'a été notifié depuis le 8 mars 2023.

3) Foyer de botulisme à Bordeaux

Le 10 septembre 2023, le CHU de Bordeaux a signalé trois cas suspects de botulisme aux autorités locales de santé publique. Tous avaient visité le même restaurant à différentes dates et ont déclaré avoir consommé des sardines marinées en conserve. Les sardines faisaient partie d'un lot réalisé par le restaurateur le 1er septembre 2023 et servi entre le 1er et le 10 septembre. Les cas concernaient des nationalités différentes. Les jours précédents, la ville avait accueilli deux matchs internationaux de rugby dans le cadre de la Coupe du Monde de Rugby en présence d'un grand nombre de visiteurs internationaux. Une enquête a été ouverte pour identifier et contacter les personnes ayant visité le restaurant et contacter les agences de santé publique des pays dont les citoyens ont été touchés par l'épidémie (cf tableau récapitulatif des cas de botulisme 2023).

4) Retrait rappel produits halal

Le fabricant de produits de charcuterie halal a observé une non-conformité d'ordre visuel sur certains de ses produits, lié à un ingrédient fournisseur non conforme (sel nitrité insuffisamment dosé ou mal réparti). La présence de sel nitrité à un niveau suffisant dans les recettes concernées étant indispensable à la garantie de l'absence de développement de *Clostridium botulinum*, le fabricant a considéré qu'il n'était pas possible d'exclure le risque de développement bactérien. Le fabricant a donc volontairement procédé au retrait et au rappel des produits concernés le 19 décembre 2023. L'alerte produit alimentaire a été gérée conformément aux usages. Le professionnel a identifié un danger, évalué le risque, procédé au retrait et au rappel des produits dont la sécurité n'était pas pleinement assurée, signalé les faits à la DDPP, enregistré le rappel sur Rappelconso, fiche de rappel qui a été validée par la DDPP pour publication, et alerte qui a été signalée par la DDPP à la DGAI pour coordination. Cette alerte sanitaire n'a fait l'objet d'aucune confirmation biologique de la présence de *Clostridium botulinum* et de la toxine botulique que ce soit dans les prélèvements alimentaires ou humains reçus au CNR.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Site web du CNR :

<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme>

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, gauthier.delvallez@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 durant l'année 2023, le CNR a répondu à un nombre de mails et d'appels téléphoniques équivalent à 2022.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

Plusieurs communications dans des médias grand public ont été réalisées suite aux cas de botulisme à Bordeaux :

- **Journal de 20 heures TF1 (13/09/2023)**

<https://www.tf1info.fr/sante/video-reportage-tf1-cas-de-botulisme-a-bordeaux-quel-traitement-pour-les-patients-hospitalises-2269689.html>

- **Journal de 20h France 2 (13/09/2023)**

- **Article le Parisien (14/09/2023)**

<https://www.leparisien.fr/societe/botulisme-a-bordeaux-la-sterilisation-des-conserves-faites-maison-a-realiser-avec-precaution-13-09-2023-WRZWLXWFGBBOP172CMSXD6ULPI.php>

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

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

ANR CLOSTABAT («Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses ») (Dr O. FIRMEsse, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments, 2022-2025)

Clostridium perfringens et *Clostridioides difficile* sont des bactéries pathogènes majeures impliquées dans les infections humaines. *C. perfringens* est de plus l'un des dangers bactériens identifiés dans les Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène et d'application des principes HACCP du maillon abattage-découpe des filières bovine, porcine et volaille. Les animaux étant porteurs sains de ces deux espèces dans leur tube digestif, les viandes animales sont des cibles privilégiées pour expliquer la survenue d'épisodes toxiques impliquant ces pathogènes. Sans que l'adéquation et la pertinence des mesures de maîtrises mises en place en abattoir et en découpe ne soient remises en cause, peu ou pas de données sont aujourd'hui disponibles en France sur l'importance de ces deux dangers au maillon abattoir et atelier de découpe.

Le projet ClostAbat réunit des partenaires académiques et des instituts techniques avec un large éventail de compétences en sciences des aliments et en clinique humaine afin de développer des connaissances et des outils d'aide à la décision pour permettre aux filières d'avoir une information objective sur l'importance de ces dangers en abattoirs/ateliers de découpe.

Ce projet permettra :

- i) de déterminer le statut de contamination d'échantillons de lots de viandes provenant des filières porcines, bovines et volailles à l'égard des dangers *C. perfringens* et *C. difficile* à l'abattoir et d'envisager la corrélation entre les prévalences de portage digestif, de l'environnement de production et de contamination des carcasses et produits de découpe.
- ii) de déterminer le potentiel pathogène des souches isolées pour l'homme ;
- iii) d'identifier des marqueurs épidémiologiques permettant la traçabilité des isolats en fonction des filières animales ;
- iv) de définir leur persistance en abattoir et la corrélation potentielle entre leur présence et l'abondance d'autres taxons bactériens dans les populations de surface ;
- v) de déterminer l'importance relative des différentes voies de transmission (animale ou environnementale) et leur implication possible dans les maladies infectieuses chez l'homme ;
- vi) de transférer les méthodologies utilisées pour le traitement des données aux instituts techniques pour la caractérisation et la surveillance des deux pathogènes dans les différents secteurs de la viande ;
- vii) d'établir des recommandations en rédigeant des lignes directrices décrivant les stratégies à mener par les opérateurs afin de réduire efficacement leur implication dans la contamination et leur impact sur la Santé Publique ;
- viii) de proposer une stratégie exploratoire alternative pour la gestion de ces dangers par le traitement à la lumière LED et évaluer son impact sur la qualité de la viande.

Le projet comporte 5 programmes de travail (WP) : Le WP1 concerne l'organisation de la collecte des échantillons dans les abattoirs en fonction des spécificités de chaque secteur, le WP2 vise à déterminer les fréquences de contamination dans les trois filières viande au regard des dangers *C. perfringens* et *C. difficile*, le WP3 a pour objectif de déterminer le potentiel pathogène des souches isolées pour l'Homme, le WP4 vise à identifier l'importance relative des filières au regard des deux dangers et le WP5 vise à investiguer la possibilité d'utiliser la lumière LED combinée à l'humidité relative/température pour détruire les spores de *C. perfringens* et *C. difficile*.

Ainsi, les opérateurs des filières viandes seront mieux à même de justifier l'adéquation et la pertinence des mesures de maîtrise mises en œuvre à l'égard des dangers liés à *C. perfringens* et *C. difficile*, et, si nécessaire, de les réexaminer et de diffuser des pratiques de prévention retenues.

Le CNR et le laboratoire associé *Clostridioides difficile* sont responsables du WP4 relatif à la caractérisation génomique des souches de *C. difficile* et *C. perfringens*.

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

- **Foodborne botulism outbreak involving different nationalities during the Rugby World Cup: critical role of credit card data and rapid international cooperation, France, September 2023.**
Meurice L, Filleul L, Fischer A, Burbaud A, **Delvallez G**, **Diancourt L**, Belichon S, Clouzeau B, Malvy D, Oliva-Labadie M, Bragança C, Wilking H, Franca R, Martin G, Godbole G, Tourdjman M, Jourdan-Da Silva N. Euro Surveill. 2023 Nov;28(47):2300624. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.47.2300624. PMID: 37997664.
- **Core-genome multilocus sequence typing and core-SNP analysis of *Clostridium neonatale* strains isolated in different spatio-temporal settings.**
Mesa V, Delannoy J, Ferraris L, **Diancourt L**, **Mazuet C**, Barbut F, Aires J. Microbiol Spectr. 2023 Dec 12;11(6):e0276623. DOI: 10.1128/spectrum.02766-23. PMID: 37909758.
- **Food-borne botulism outbreak during the Rugby World Cup linked to marinated sardines in Bordeaux, France, September 2023.**
Courtot-Melciolle L, Jauvain M, Siefridt M, Prevel R, Peuchant O, Guisset O, Mourissoix G, **Diancourt L**, **Mazuet C**, **Delvallez G**, Boyer A, Orieux A. Euro Surveill. 2023 Oct;28(41):2300513. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.41.2300513. PMID: 37824251.
- **From Foodborne Disease Outbreak (FBDO) to Investigation: The Plant Toxin Trap, Brittany, France, 2018.**
Watier-Grillot S, Larréché S, **Mazuet C**, Baudouin F, Feraudet-Tarisse C, Holterbach L, Dia A, Tong C, Bourget L, Hery S, Pottier E, Bouilland O, Tanti M, Merens A, Simon S, **Diancourt L**, Chesnay A, Pommier de Santi V. Toxins (Basel). 2023 Jul 13;15(7):457. DOI: 10.3390/toxins15070457. PMID: 37505726.
- **Never too late to neutralize botulinum neurotoxin.**
Bonny V, Gabarre P, Urbina T, **Mazuet C**, Missri L, Joffre J, Baudel JL, Ait Oufella H, Maury E. Minerva Anestesiol. 2023 Oct;89(10):950-951. DOI: 10.23736/S0375-9393.23.17401-3. PMID: 37272271.
- ***Clostridium botulinum* type C, D, C/D, and D/C: An update.**
Meurens F, Carlin F, Federighi M, Filippitzi ME, Fournier M, Fraval P, Ganière JP, Grisot L, Guillier L, Hilaire D, Kooh P, Le Bouquin-Leneveu S, Le Maréchal C, **Mazuet C**, Morvan H, Petit K, Vaillancourt JP, Woudstra C. Front Microbiol. 2023 Jan 5;13:1099184. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1099184. PMID: 36687640.

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, 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 cout des prélèvements, souches et ADN du fait de la réglementation MOT/ANSM.
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications. Cette mise en commun des données de surveillance des différents acteurs a été reprise et élargie dans le cadre d'une demande de la DGAL d'actualisation des connaissances du botulisme animal et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.
- 3) Le CNR et le LNR coopèrent à l'investigation des foyers de botulisme bovin et aviaire, notamment des oiseaux sauvages en collaboration étroite avec l'ONCFS et le réseau SAGIR.

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

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

8. Programme d'activité pour les années suivantes

1) Implémentation de géloses Brucella supplémentées de fabrication maison

Etant donnés les résultats prometteurs de l'utilisation de nos bouillons Brucella supplémentés de fabrication maison, les récents problèmes d'approvisionnement en réactifs de la part de ThermoFisher en décembre 2023 concernant les géloses, des problèmes de dates de péremption toujours trop courtes après réception des réactifs, et des problèmes de livraisons en cadencé, le CNR va commencer à valider ses antibiogrammes par méthode de diffusion en gélose sur ses géloses Brucella supplémentées de fabrication maison également, toujours avec pour objectif de s'abstenir des stocks toujours plus fluctuants des industriels.

2) Implémentation de la dilution en gélose pour la détermination des CMI

Projet dans le cadre de la thèse de Doctorat de Gauthier Delvallez, réalisée au CNR au sein du Laboratoire Pathogenèse des Bactéries Anaérobies et sous la direction de Bruno Dupuy.

La technique utilisée comme référence pour les bactéries anaérobies est la dilution en milieu solide telle que décrit selon la norme M11 du CLSI, inventée en 1959 par Edward Steers. Il s'agit d'une méthode manuelle de détermination de CMI en dilution en milieu géosé. Cette technique est fastidieuse et est difficilement implantable en routine car elle nécessite de tester de nombreuses souches en même temps, non compatible avec le travail au quotidien (souches reçues petit à petit tous les jours), mais reste historiquement la méthode de référence et la plus utilisée dans les travaux de recherche sur la résistance aux antibiotiques chez les bactéries anaérobies, même si la méthode en microdilution est estimée équivalente, mais uniquement pour les espèces du genre *Bacteroides* et *Parabacteroides* selon le CLSI.

Des géloses sont additionnées d'antibiotiques à des concentrations croissantes, manuellement, pour constituer une gamme de dilutions par antibiotique à tester. Chaque boîte est ensuite inoculée avec un ensemenceur manuel multiple de type Steers où de nombreux isolats pourront être évalués en simultané, en fonction du modèle d'ensemenceur. La lecture se fait gélose par gélose. L'inconvénient majeur de cette technique est le temps de réalisation : les géloses enrichies en antibiotique sont préparées manuellement, extemporanément et une dizaine de boîtes de pétri seront nécessaires pour l'évaluation de chaque molécule. L'avantage réside dans la capacité de tester plusieurs dizaines de souches par gélose grâce à l'ensemenceur multiple.

3) Génomique des populations et résistance aux antibiotiques du groupe *Bacteroides fragilis*

Projet dans le cadre de la thèse de Doctorat de Gauthier Delvallez, réalisée au sein du Laboratoire Pathogenèse des Bactéries Anaérobies et sous la direction de Bruno Dupuy.

Le groupe *Bacteroides fragilis* (BFG) regroupe un ensemble d'environ 30 espèces bactériennes de diversité génétique variée. Il est réparti en 3 genres : *Bacteroides*, *Parabacteroides*, et *Phocaeicola*. Les BFG sont des commensaux de la flore digestive mais présentent un risque infectieux dans la majorité des cas lors d'une rupture de la barrière intestinale. Les 3 espèces les plus isolées d'échantillons biologiques infectieux (principalement isolées d'abcès intra-abdominaux et d'hémocultures) sont *Bacteroides fragilis* *sensu stricto*, *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Bacteroides ovatus*. La mortalité de ces infections est élevée en l'absence de traitement antibiotique ou à la suite d'un traitement inadapté. Le manque de données des profils de résistance aux antibiotiques des espèces du BFG est principalement due à : i) l'absence d'antibiogramme (AST) en systématique (ou panel restreint d'antibiotiques pour les infections invasives), ii) l'absence de consensus international depuis plusieurs années, et iii) l'absence de déclaration obligatoire

des résistances atypiques et/ou des souches multirésistantes (MDR). Il est donc aujourd’hui difficile d’établir les tendances de résistance chez BFG pourtant nécessaires afin de surveiller l’émergence des souches MDR et de définir les traitements à utiliser.

Dans ce contexte les objectifs de ce travail sont multiples :

- i) Faire un état des lieux de la résistance aux antibiotiques chez BFG et suivre les émergences actuelles ;
- ii) Optimiser les outils de détection des résistances pour améliorer la surveillance ;
- iii) Etudier les mécanismes de résistance et en particulier la résistance non croisée aux beta-lactamines.

- i) Une mise à jour des données sur la prévalence des résistances au sein du BFG sera tout d’abord réalisée en collaboration avec des laboratoires hospitaliers présents en Ile-de-France et répartis sur le territoire. Une analyse rétrospective sur une période définie des données d’AST des souches de BFG isolées permettra de faire un état des lieux des niveaux de résistance sur un grand nombre de souches et dans plusieurs régions de France. Les souches présentant des profils de résistance particuliers et les souches MDR seront envoyées au CNR. Ce travail permettra d’enrichir la collection actuelle de souches MDR du CNR (soit environ 80 souches sur la période 2017-2022) et de réaliser une étude plus descriptive de ces souches par : i) la réalisation d’AST sur un panel élargi d’antibiotiques, ii) le séquençage complet des souches pour l’identification d’espèce et des gènes de résistance décrits, et iii) l’analyse phylogénétique des souches pour détecter l’existence d’éventuels clusters.
- ii) Pour faciliter la récupération de données génétiques des souches BFG au niveau national et international, l’implémentation d’une base de données génomiques partagée et accessible en ligne (BIGSdb) sera alimentée en premier lieu par les souches disponibles au CNR, par les souches hospitalières récupérées lors de la première partie du projet, puis par celles des laboratoires de recherche ou des laboratoires cliniques au niveau national, européen et/ou mondial. Cet outil permettra de mettre en place un schéma d’identification d’espèces à partir du core-genome (cg) MLST comme ressource taxonomique, et d’être utilisé par les laboratoires déposant leurs génomes pour réaliser des études de génomique comparative afin de rechercher et cibler des gènes d’intérêt, avec notamment un module lié aux gènes connus de résistance aux antibiotiques.
- iii) L’ensemble des données phénotypiques et génomiques obtenues en première partie de ce travail permettra une approche pangénomique de type GWAS (Genome Wide Association Study) pour analyser les variations génétiques chez un nombre important de souches de BFG que l’on cherchera à corrélérer avec les caractères phénotypiques de résistance des souches. Nous nous intéresserons en particulier à la résistance non croisée aux beta-lactamines (amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline-sulbactam, pipéracilline-tazobactam, imipénème, ertapénème, méropénème), sachant que de plus en plus de souches isolées de BFG seraient résistantes à la pipéracilline-tazobactam et sensibles à l’amoxicilline-acide clavulanique, principalement chez *B. thetaiotaomicron* et *B. faecis*.

En perspective de ce projet, des études sur la résistance à d’autres familles d’antibiotiques chez BFG pourront être réalisées, ainsi que des études de transfert et d’acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques entre espèces.

4) Projet ClostAbat

Le projet ClostAbat est toujours en cours.

L’objectif de ce projet est de fournir aux filières animales françaises une information récente et complète de la fréquence et virulence de *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile* dans les abattoirs et ateliers de découpe. Ces informations sont indispensables pour mettre à jour l’analyse des dangers, avec des données obtenues en France à l’entrée de la chaîne alimentaire.

Ce projet soumis à l'ANR en avril 2021 est porté par le Dr Olivier Firmesse (ANSES de Maison Alfort, Laboratoire de Sécurité des Aliments) en partenariat avec le LNR du botulisme aviaire (ANSES de Ploufragan), le CNR des bactéries anaérobies et Botulisme (Institut Pasteur, Paris) et son Laboratoire associé *Clostridioïdes difficile* (Hôpital Saint Antoine, Paris), Agro Sup Dijon – Université de Bourgogne ainsi que les instituts techniques français de l'élevage (Idele) et du porc (Ifip).

5) Reconstitution des stocks de sérum neutralisant les toxines botuliques

Le CNR dispose d'un stock de sérum neutralisant les toxines botuliques lui permettant d'assurer ses missions quotidiennes de diagnostic de botulisme par test de séroneutralisation.

Le stock actuel a été constitué entre 2004 et 2008 dans un contexte où la réglementation MOT et OGM était beaucoup moins contraignante.

La synthèse de protéines recombinantes pour la vaccination des lapins a été réalisée en juin 2023 par la plateforme des protéines recombinantes de l'Institut Pasteur (PF3PR). Les procédures d'immunisation sur lapins ont débuté en décembre 2023 pour les sérum neutralisant les toxines botuliques de type A, C et E.

L'immunisation des lapins se prolongera au cours de l'année 2024, et nécessitera des méthodes de validation des sérum par des tests ELISA et des tests de séroneutralisation sur souris.

Reconstituer un stock de sérum anti-botuliques est complexe à plusieurs niveaux : la mise à disposition des aliquots OGM pour fabriquer les protéines recombinantes, les techniques et manipulations successives qu'il faut opérer, la coordination entre les différents acteurs entrant dans le processus, et sur le plan réglementaire pour obtenir les autorisations requises auprès de l'ANSM. Les niveaux de complexité et les démarches à engager auprès de l'ANSM dont les délais de réponse sont parfois très longs laissent présager qu'obtenir un nouveau stock de sérum anti-botuliques peut prendre entre 18 et 36 mois.

6) Méthode Endopep SIA pour la recherche de toxines botuliques

Le CNR a été contacté par l'Institut Robert Koch (RKI) en Allemagne, qui propose, une évaluation internationale de la méthode Endopep-SIA développée au RKI pour la recherche de toxines botuliques.

La méthode est un test immunologique basé sur la technologie Luminex : les toxines sont extraites via des anticorps monoclonaux spécifiques de la toxine ou des récepteurs fonctionnalisés. Après extraction, l'activité catalytique des toxines botuliques est détectée via des anticorps monoclonaux spécifiques du néoépitope. Cette approche appelée Endopeptidase suspension immunoassay (Endopep-SIA) constitue une nouvelle procédure, qui pourrait être utilisée dans les laboratoires de diagnostic et contribuerait à réduire les tests sur les animaux dans le futur.

Le CNR ne disposant ni des autorisations ANSM ni d'un Bioplex nécessaires à la mise en place d'un tel projet, il est envisagé que Laure Diancourt se rende à Berlin en 2024 à l'Institut Robert Koch pour se former sur la technique et que les expériences soient réalisées en collaboration avec la DGA/MNRBC dans leurs laboratoires équipés et autorisés pour ce type de projet.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Le laboratoire des Anaérobies de l'Institut Pasteur a été reconnu comme Centre National de Référence des anaérobies en 1972, et il a été reconduit comme Centre National de Référence des Bactéries anaérobies et du botulisme en 2005, 2011, 2017 et 2023.

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par Santé publique France (SpF), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à SpF des affections graves à anaérobies notamment à *Clostridioides difficile*), et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec SpF. Depuis avril 2007, le laboratoire d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Hôpital St Antoine (responsable, F. Barbut) a été nommé par SpF comme laboratoire associé du CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridioides difficile*. Il a été reconduit dans ses fonctions en 2011, 2017 et 2023. Le CNRAB tente de maintenir quelques activités de recherche et développement en relation avec ses activités d'expertise et essentiellement en collaboration, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *Clostridium botulinum*, techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection, l'identification et la quantification des toxines botuliques. Ces activités sont limitées par le manque de personnels, locaux et équipements dédiés.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Effectif 2023 du CNR en Equivalent Temps Plein (ETP) et financement :

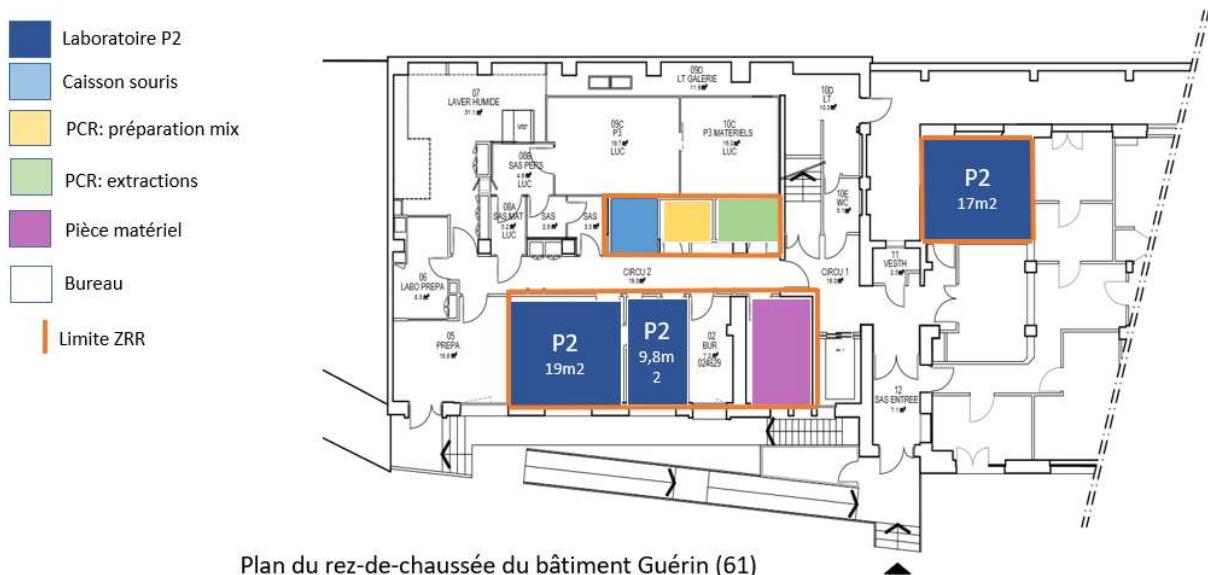
Fonctions	ETP réels	Financement
Scientifique	1	Institut Pasteur & SpF
Cadre medical	1	Institut Pasteur & SpF
Ingénieur	0,8	Institut Pasteur & SpF
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP	2	Institut Pasteur & SpF
Agent technique	1	Institut Pasteur
Administratif	0,5	Institut Pasteur & SpF

1.3 Locaux et équipements

➤ Locaux

Les locaux hébergeant le CNR ont été redéfinis en 2018. L'ensemble des activités est maintenant regroupé au RDC du bâtiment Guérin (61). Des travaux de déménagement/réaménagement ont été réalisés fin 2019 dans un nouveau laboratoire P2 attribué au CNR (cf plan ci-dessous). De nouveaux travaux de réaménagement ont été réalisés en 2023 suite à l'attribution au CNR de nouveaux bureaux, permettant de libérer une pièce au rez-de-chaussée et de créer un nouveau laboratoire P2, facilitant la réception et la prise en charge des échantillons. Ces locaux comprennent :

- 2 espaces bureaux : 1 espace de 7,5 m² au rez-de-chaussée, et un deuxième espace de 18,5 m² au 1^{er} étage.
- un laboratoire P2 de 19 m² qui contient un PSM de type II, servant à la prise en charge des prélèvements après culture.
- un laboratoire P2 de 9,8m² qui contient un PSM de type II, servant à la prise en charge des prélèvements le jour de leur arrivée au CNR.
- une pièce "matériel" de 11m² renfermant, un appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec les mélanges gazeux pour l'anaérobiose, un incubateur à 37°C, une sorbonne, des thermocycleurs, électrophorèses d'ADN et un combiné réfrigérateur/congélateur,
- une pièce avec un caisson souris réservée aux injections de souris pour le diagnostic du botulisme,
- une pièce réservée à la préparation des mix PCR avec une hotte PCR et un congélateur,
- Une pièce d'extraction d'ADN
- une pièce (17m²) réservée à la PCR de diagnostic du botulisme, à la préparation et au stockage des toxines et aux activités de recherche de développement. Ces activités n'étant pas compatibles simultanément, une nécessaire dissociation temporelle est mise en place, l'activité de diagnostic restant toujours prioritaire.



➤ Equipements

Les équipements ont été redistribués en 2018. Le CNR ne dispose plus pour le moment d'équipement de culture cellulaire ni de chaîne ELISA. Les équipements de base nécessaires et indispensables à court terme aux activités de diagnostic ont été préservés.

Equipements de base pour la bactériologie anaérobiose :

- Equipements de base de bactériologie standard
- Jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system)
- Enceinte anaérobie
- Postes de sécurité microbiologique (PSM) de type II

- Enceinte climatique à 35°C
- Microscope
- Centrifugeuses
- Bains-marie et blocs chauffants
- Réfrigérateurs, congélateurs (-20°C, -80°C)
- Container d'azote liquide pour la conservation des souches de référence et des isolats

Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

- appareils d'amplification génique : PCR standard et PCR-temps réel. Hotte à PCR
- cuves d'électrophorèse et générateurs
- Lecteur analyseur d'image (GelDoc 2000, BioRad).
- séquençage d'ADN.
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)

Equipement de biochimie :

- système d'analyse des protéines (électrophorèse en gel de polyacrylamide, transfert sur membrane et détection immunologique)

Animalerie :

Animalerie souris pour les tests de toxicité, notamment détection et identification des toxines botuliques

- **Locaux, matériel, équipements, moyens extérieurs à la structure, mais disponibles pour elle sur le campus (animaleries, séquenceurs, etc...) et nécessaires aux missions du CNR**
- Laboratoire de préparation commun aux autres unités hébergées dans le bâtiment
- Animalerie lapins pour la production d'anticorps spécifiques anti-toxines botuliques
- Plateformes techniques du campus de l'Institut Pasteur
P2M (Séquenceur automatique d'ADN et bio-informaticiens), Pôle PGP de la CIBU pour le séquençage des MOT, Plateforme de protéines recombinantes.

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de bactériologie anaérobie en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicates des souches initialement reçues (à noter que la collection CNR est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place à minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial. En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des

publications et communications des résultats du projet. L’Institut Pasteur s’assure également théoriquement dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont théoriquement systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l’Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d’Intervention Biologique d’Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d’Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l’ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l’Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l’Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l’accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction de la Recherche Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l’Institut Pasteur.

Les services supports de l’Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Ils se font régulièrement auditer dans le cadre de leurs activités en interne et par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L’annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

- Test de détection, d'identification et de typage des neurotoxines botuliques par le test de létalité sur souris (Accréditée par le COFRAC)
- Identification des gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C par PCR temps réel (Accréditée par le COFRAC).
- Identification des gènes de toxines alpha et CPE de *Clostridium perfringens* par PCR temps réel
- Identification des gènes de toxines Hbl, Nhe, Ces et CytK1 de *Bacillus cereus* par PCR temps réel
- Identification bactérienne par l'amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage Sanger
- Test de susceptibilité aux antibiotiques en milieu gélosé et en microdilution selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

Liste des marqueurs épidémiologiques :

Couples d'amorces pour identifier les gènes de toxines et flagellines suivants :

- Gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques
- Gènes des toxines de *C. perfringens* : alpha, bêta1, bêta2, iota, entérotoxine, delta, epsilon, théta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine théta à l'aide d'une PCR spécifique. Détermination du support (chromosomique ou plasmidique) du gène de l'entérotoxine
- Gènes des toxines de *C. sordellii* (LT, HT), neuraminidase, lécithinase
- Gènes des toxines alpha de *C. septicum*, *C. oedematiens*
- Gènes des flagellines de *C. oedematiens*, *C. chauvoei*
- Gène de l'entérotoxine de *Bacteroides fragilis*

Couples d'amorces pour autres gènes d'intérêt :

- Gènes de l'espace intergénique ARNr 16S – 23S
- Gènes de ménage *hsp60*, *hsp70* et *recA*
- Gènes de sporulation
- Gènes de résistance aux antibiotiques [métronidazole ; β-lactamines (gènes *cepA*, *cfxA* et *cfiA*, séquences d'insertion IS 942, IS1186, ISBF417) chez *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

Cf PDF Annexe_3_CNR

LIVRET 2 :

Laboratoire associé

Clostridioides difficile

Pr Frédéric Barbut

Saint Antoine, AP-HP

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	8
2.4 Collections de matériel biologique	8
2.5 Activités d'expertises	9
2.6 Activités de séquençage	9
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	11
3. Activités de surveillance	12
3.1 Description du réseau de partenaires	12
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	13
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	19
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	21
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	21
4. Alertes	23
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	24
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	24
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	26
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	26
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	27
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	27
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	31
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	35

8. Programme d'activité pour les années suivantes	37
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	40
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	40
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	40
1.3 Locaux et équipements	41
1.4 Collections de matériel biologique	41
1.5 Démarche qualité du laboratoire	42
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	44
2.1 Liste des techniques de référence.....	44
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	44
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	45

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

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

Au cours de l'année 2023, **555** prélèvements ont été analysés par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 462 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxinogènes ; 1.4 % ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les trois autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 14/020 (14%), le 106 (7.3%) et le 002 (5.9%).

L'année 2023 a été marquée par un regain d'activités (+12.6%), un faible nombre d'isolements de souches 027 épidémiques (n=5), la poursuite de l'émergence du clone RT 638 et la description précise d'une souche résistante à la fidaxomicine.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

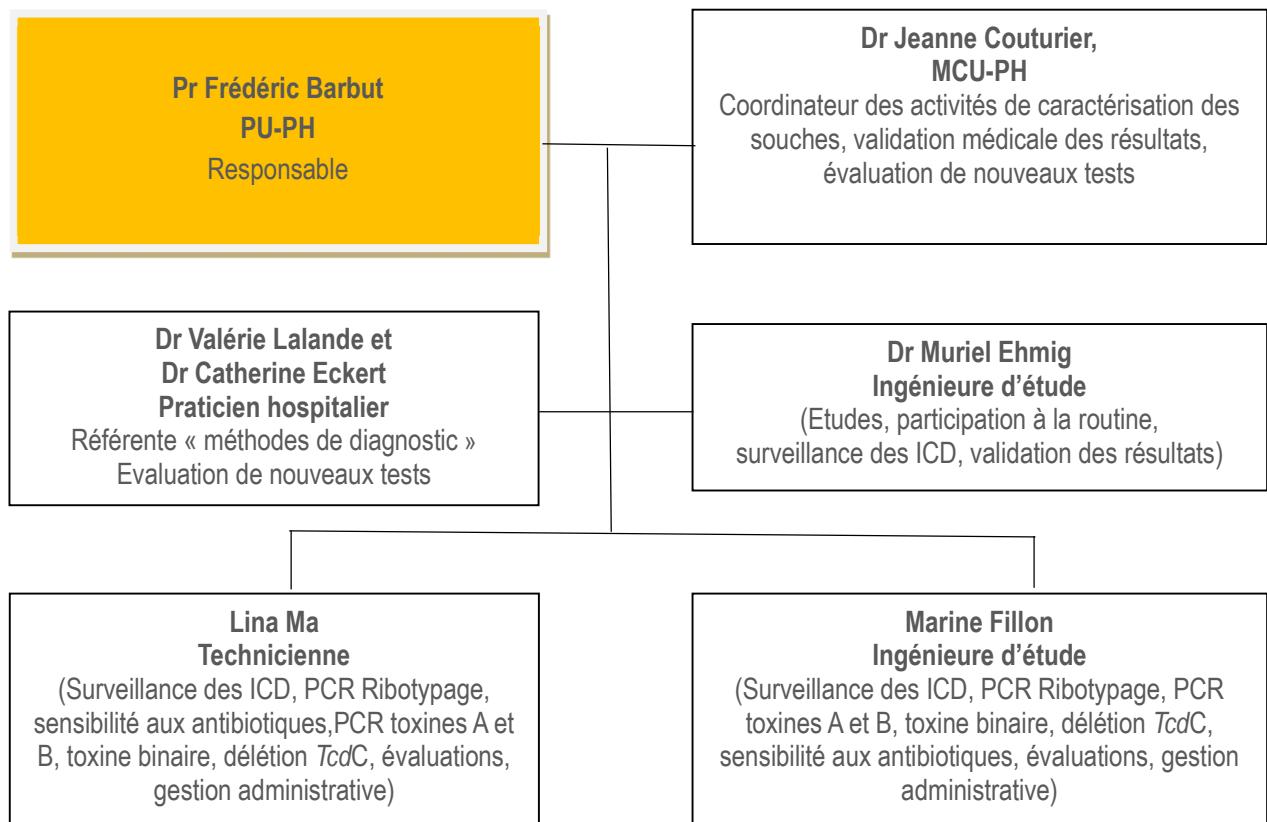
Clostridioides difficile is the major cause of healthcare-associated diarrhea. The main objectives of National Reference Laboratory (NRL) for "*Clostridioides difficile*" are expertise, development of new techniques for identifying and typing, evaluation of the susceptibility of *Clostridioides difficile*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

In 2023, **555** samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 462 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 1.4% were identified as PCR-ribotype 027. The three other predominant PCR-ribotypes were 14/020 (14%), 106 (7.3%) and 002 (5.9%).

This year was marked by an increase of the number of *C. difficile* isolates which were characterized (+12.6%), a low number of the epidemic 027 strains (n=5), the on going emergence of a new RT 638 and the full description of a strain resistant to fidaxomicin.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



Mission et Organisation

Sans objet : absence de changement majeur dans l'organisation du CNR.

Démarche Qualité

- Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au DMU BioGemH (APHP Sorbonne Université) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 (site cofrac, N° accréditation 8-2542)
- Un contrôle externe de qualité (CEQ) a été réalisé en 2022 et est en cours pour 2023, pour la neuvième année consécutive, en collaboration avec le Centre National de référence en Belgique (Kate Soumillon). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridioides difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire), et la sensibilité à la moxifloxacine ont également été incluses dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité 2022 a permis de mettre en évidence une bonne

concordance entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et nos méthodes.

2. Activités d'expertise

Après l'adaptation de la technique de PCR-ribotyping selon les recommandations européennes de l'ECDC (Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection ([europa.eu](http://www.europa.eu))) et utilisation du site Web-Ribo (<https://webribo.ages.at/>), les PCR-ribotypes sont identifiés de façon plus précise.

Les techniques et marqueurs disponibles, et la liste des techniques recommandées pour le laboratoire expert sont présentées en **annexe 2**.

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

2.1 Evolution des techniques

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

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Evaluation de l'automate **Hologic** pour le diagnostic moléculaire de *C. difficile* (2023)
- Evaluation de l'automate **Elitech** pour le diagnostic moléculaire de *C. difficile* (2023)
- Evaluation de **12 tests immuno-chromatographiques** pour la recherche de GDH seule ou combinée aux toxines (spécificité et de sensibilité) (2023)

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

2.4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**.

Pas d'évolution par rapport à 2022.

2.5 Activités d'expertises

En 2023, nous avons analysé 555 prélèvements au total contre 485 en 2022, (+12,6%). Parmi ces prélèvements :

- 207 concernent des prélèvements de patients envoyés au CNR pour analyse (souches de routine),
- 177 concernent des selles de patients du GH AP-HP.Sorbonne Université et inclus dans des études (création d'une fécalothèque),
- 171 concernent des prélèvements divers (animal / environnement) adressés au CNR dans le cadre d'études spécifiques (Plan de Surveillance et Plan de Contrôle (PSPC) de la DGAL et ANR Clos't'Abat).

Le **tableau I** présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2023 ainsi que les différentes caractérisations de ces souches. Le laboratoire associé s'est donné pour objectif de rendre les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours ouvrés à partir de la date de réception. En 2023, la durée médiane de restitution était de **8 jours**, et est stable par rapport à 2022. En 2023, plus de 30% des prélèvements reçus étaient des selles, des géloses profondes, des fecal swabs ou des biopsies, nécessitant des étapes supplémentaires pour isoler *C. difficile* en culture, entraînant une augmentation des délais entre la réception et le rendu des résultats.

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

Année	2023
Nb de prélèvements analysés	555
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	527
Nb de souches toxinogènes	462
Recherche du fragment A3	63%*
Recherche du fragment B1	63%*
Recherche de la toxine binaire	63%*
Recherche délétion dans <i>tcdC</i>	63%*
Antibiogramme	63%*
PCR-ribotypage	95%

* : seul le PCR-ribotypage a été réalisé sur les prélèvements de patients hospitalisés à Sorbonne Université (AP-HP).

2.6 Activités de séquençage

Dans le cadre d'études épidémiologiques ou de collaborations, le laboratoire associé a effectué **30** séquençages de génomes complets (NGS) (investigation d'un clone émergent).

Le CNR a un accès à une plate-forme de séquençage (PIBnet interne à Institut Pasteur, et aussi externe par Eurofins genomics ou l'Hôpital Henri Mondor ...). Les données de séquençage obtenues sont stockées en interne en attente d'être publiées dans des revues à comité de lecture et analysées par des approches de cgSNP ou wgMLST (Bionumerics 8).

Les analyses à partir du séquençage aident à :

- l'investigation d'épidémie

- la surveillance épidémiologique de certains clones
- la caractérisation fine de certaines souches atypiques de *C. difficile* (notamment au niveau du PaLoc).

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Interne (Pasteur) ou externe (Eurofins,Hopital H. Mondor)
	Illumina

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Interne
	BioNumériCs

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations d'épidémies, caractérisation des souches de récidives multiples Recherche de réservoir (animal ou alimentaire) Analyse de souches atypiques (nouveau PCR ribotypes ou PaLoc « atypique »)

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, SNP analysis, phylogénie, resistome et prédicteur de sérotype) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

cgMLST, wgMLST, SNP analysis, phylogénie, resistome
Les analyses sont faites en seconde intention après la PCR ribotyping

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

30

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année :

Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Stockage interne des données en attente de publication

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Précisez

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Souches d'origine animale (équines, porcines, bovines...) et humaines
Séquences envoyées dans base de données publiques en cas de publication seulement

3. Activités de surveillance

Le clone épidémique 027 représente toujours moins de 5% des souches reçues. L'émergence du clone RT638 (= ribotype 052 selon la base de données du CDRN, *C. difficile* ribotyping network, Leeds University) observée en 2022 dans plusieurs régions de France (77, 75, 93) se confirme en 2023.

3.1 Description du réseau de partenaires

Le laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » (Hôpital Saint-Antoine) assure une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*. Il assure le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires (e-sin). Les cas signalés correspondent soit à des formes sévères d'infections (cf définitions de la sévérité dans le guide « [Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridioides 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 épidémique en France. D'autres laboratoires envoient des souches donnant des résultats discordants entre la recherche de toxines par PCR et les tests immuno-chromatographiques.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2023 (207 prélèvements)		
	oui	non	NR*
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	29	67	111
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	5	94	108
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	9	84	114
Hyperleucocytose >20 000/mm3	12	81	114
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	4	90	113
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	87	54	66

*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. Le nombre important de motifs d'envoi non renseigné provient du fait que près de

45% des prélèvements sont envoyé par des laboratoires de ville, qui n'ont pas forcément accès au dossier complet du patient pour répondre à ces questions.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Le plus grand nombre de prélèvements (n=61) a été envoyé par les centres hospitaliers du Cpias des Pays de la Loire. Cette observation est en relation avec le nombre de centres hospitaliers dans ces régions et aussi l'intérêt particulier de certains microbiologistes vis-à-vis des bactéries anaérobies. La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la **figure 1**.

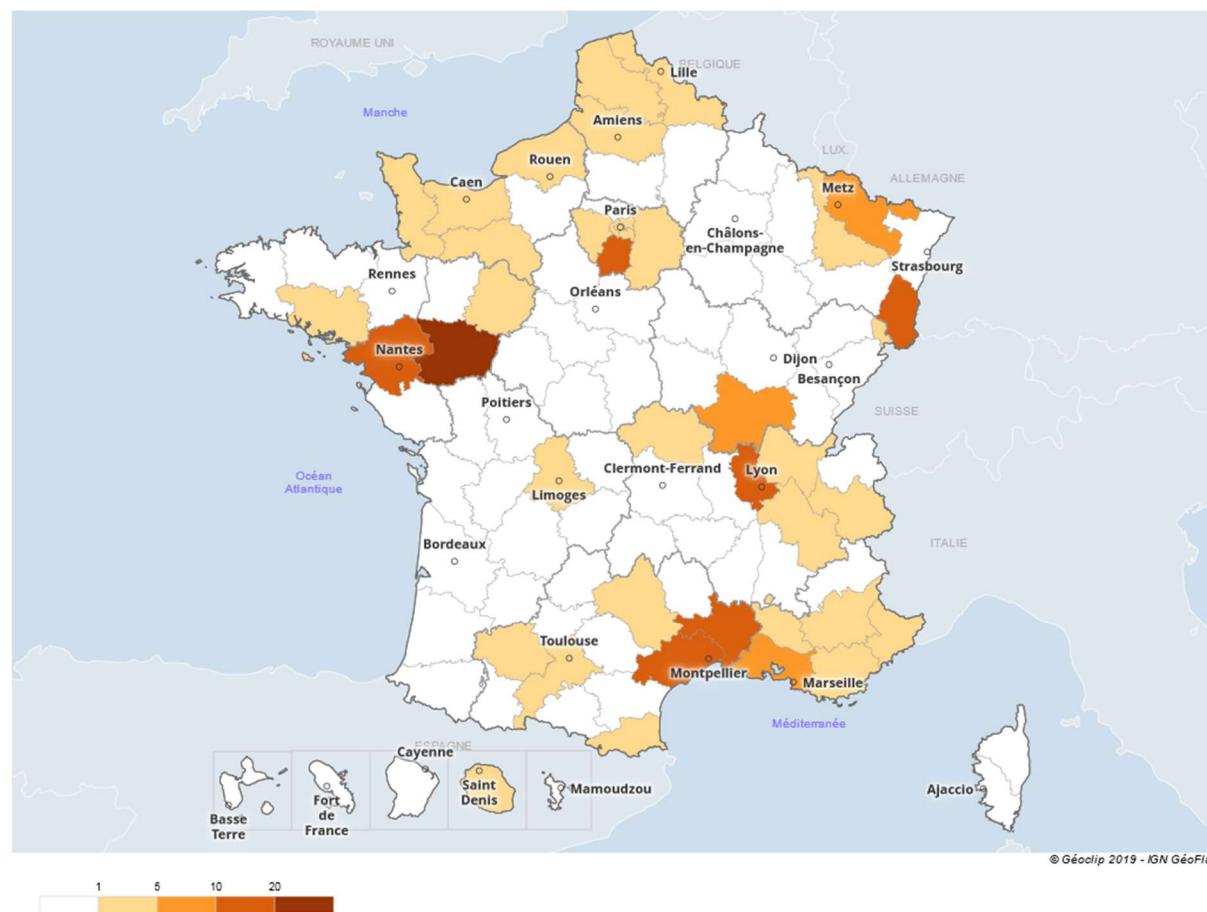


Figure 1 : Répartition des prélèvements (n=207) envoyés par département, en 2023
A noter : les départements en blanc n'ont pas envoyé de prélèvement.

En 2023, les souches de *C. difficile* toxinogènes provenaient principalement de selles (96,6%). Cent soixante-seize (**176/309 soit 57%**) de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes et cent trente-trois (**133/309 soit 43%**) chez les hommes. On note que **61,5% (190/309) des patients ont plus de 65 ans** (versus 66,5% en 2022). La distribution en âge des patients chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représentée sur la **figure 2**.

Distribution en âge des patients ayant une ICD

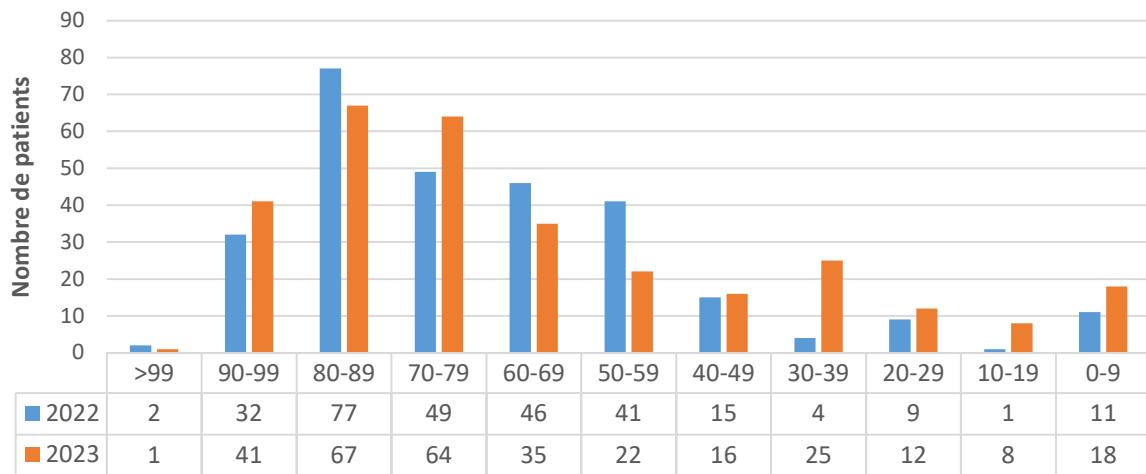


Figure 2. Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxinogène a été isolée en fonction de l'âge (2022 et 2023).

Les souches 014/020, 106, 002, 638, 078/126 et 739 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 41% (soit 146/356) des souches (Tableau III et figures 3a et 3b). On note la forte augmentation du nombre de souches RT 638 depuis 2022. Les autres PCR-ribotypes les plus fréquemment retrouvés, sont les PCR-ribotypes 211, 023 et deux PCR-ribotypes non toxinogènes : 010 et 039.

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

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)			
	2023	2022	2021	2020
014	35 (9,8)	30 (6,5)	30 (12,5)	37 (11,7)
020	15 (4,2)	33 (7,1)		
106	26 (7,3)	38 (8,2)	25 (10,4)	14 (4,4)
002	21 (5,9)	29 (6,3)	15 (6,2)	15 (4,7)
638	15 (4,2)	10 (2,2)	2 (<1)	1 (<1)
126	15 (4,2)	16 (3,5)	22 (9,16)	24 (7,6)
078	9 (2,5)	11 (2,4)		
739	10 (2,8)	8 (1,7)	4 (1,7)	1 (<1)
211	9 (2,5)	12 (2,6)	6 (2,4)	17 (5,4)
015	4 (1,1)	10 (2,2)		
010	8 (2,2)	13 (2,8)	4 (1,7)	6 (1,9)
023	8 (2,2)	8 (1,7)	5 (2,1)	21 (6,6)
039	8 (2,2)	10 (2,2)	3 (1,3)	22 (7,0)
012	6 (1,7)	5 (1,1)	1 (<1)	1 (<1)
070	6 (1,7)	7 (1,5)	6 (2,4)	2 (<1)
AI-84	6 (1,7)	4 (<1)	2 (<1)	2 (<1)
005	5 (1,4)	13 (2,8)	10 (4,1)	12 (4)
651	5 (1,4)	14 (3,0)	4 (1,7)	5 (1,6)
027	5 (1,4)	18 (3,9)	8 (3,3)	16 (5,1)
Autres	149 (41,9)	174 (37,6)	93 (38,8)	120 (38,0)
Non Déterminé	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)
Total	356	463	240	316

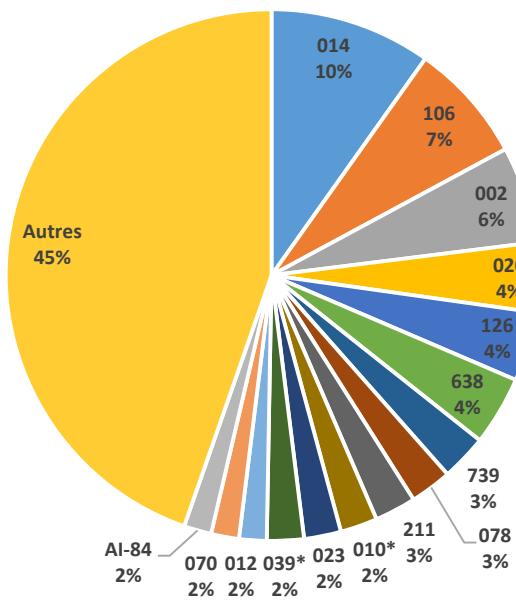


Figure 3a. Répartition des PCR-ribotypes de toutes les souches de patients analysées en 2023. Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxinogènes sont indiqués par un astérisque *.

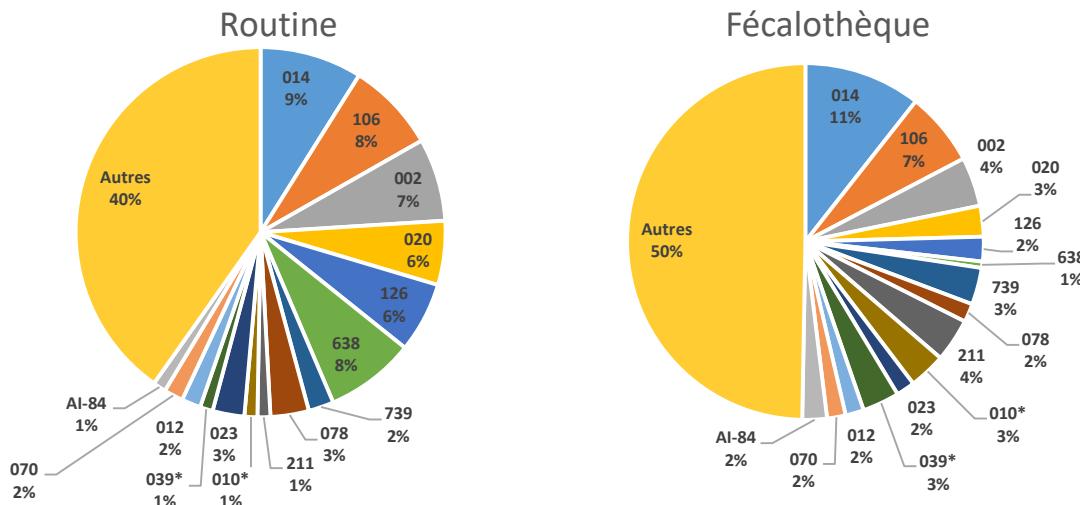


Figure 3b. Répartition des principaux PCR-ribotypes en 2023 entre les souches de routine (reçues au CNR pour analyse) et les souches étudiées de patients de Sorbonne Université (issus de la fécalothèque). Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxinogènes sont indiqués par un astérisque *.

Parmi les 309 souches de *C. difficile* toxinogènes, 5 (1,4%) 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. Elles ont été isolées à Cholet (49) en Juillet, et à Coquelles (62) en Septembre (**figure 4a**).

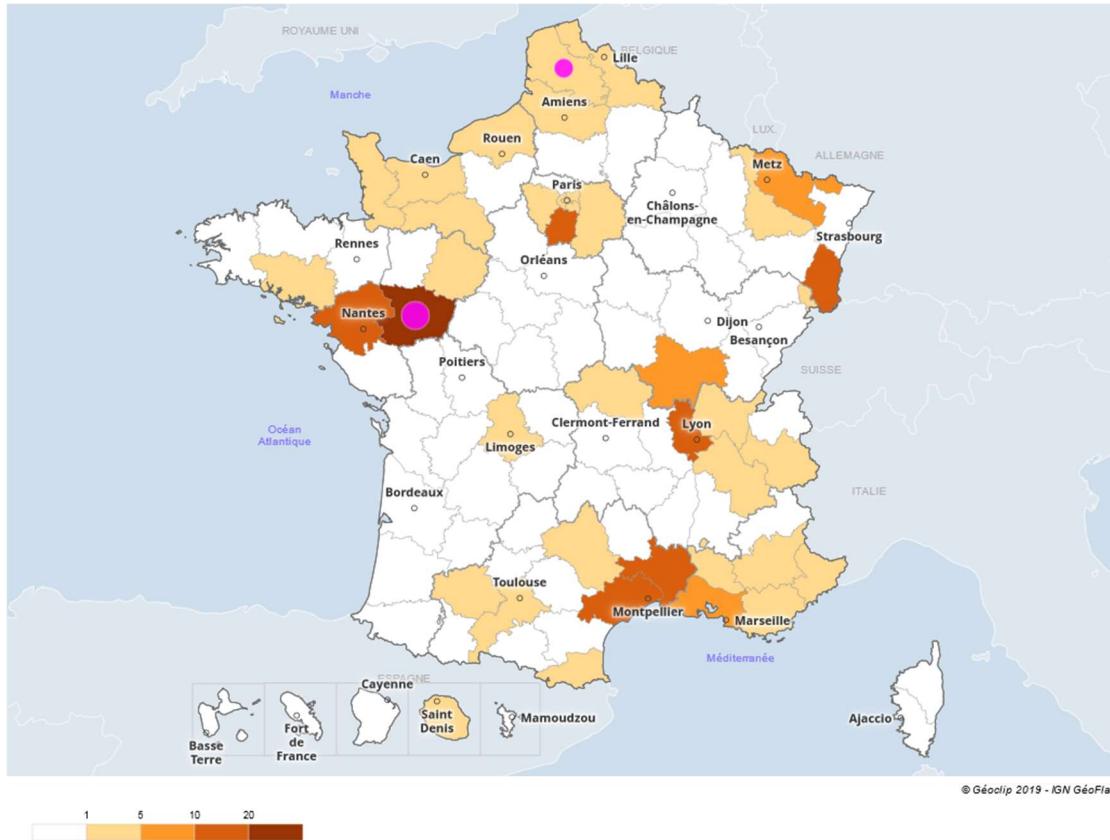


Figure 4a : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques (cercles roses) en fonction des départements, en 2023. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches 027, 2 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **épidémique** » c'est-à-dire résistantes à la moxifloxacine. Elles ont été isolées à Wasquehal (59) en Janvier, et Limoges (87) en Février (**figure 4b**).

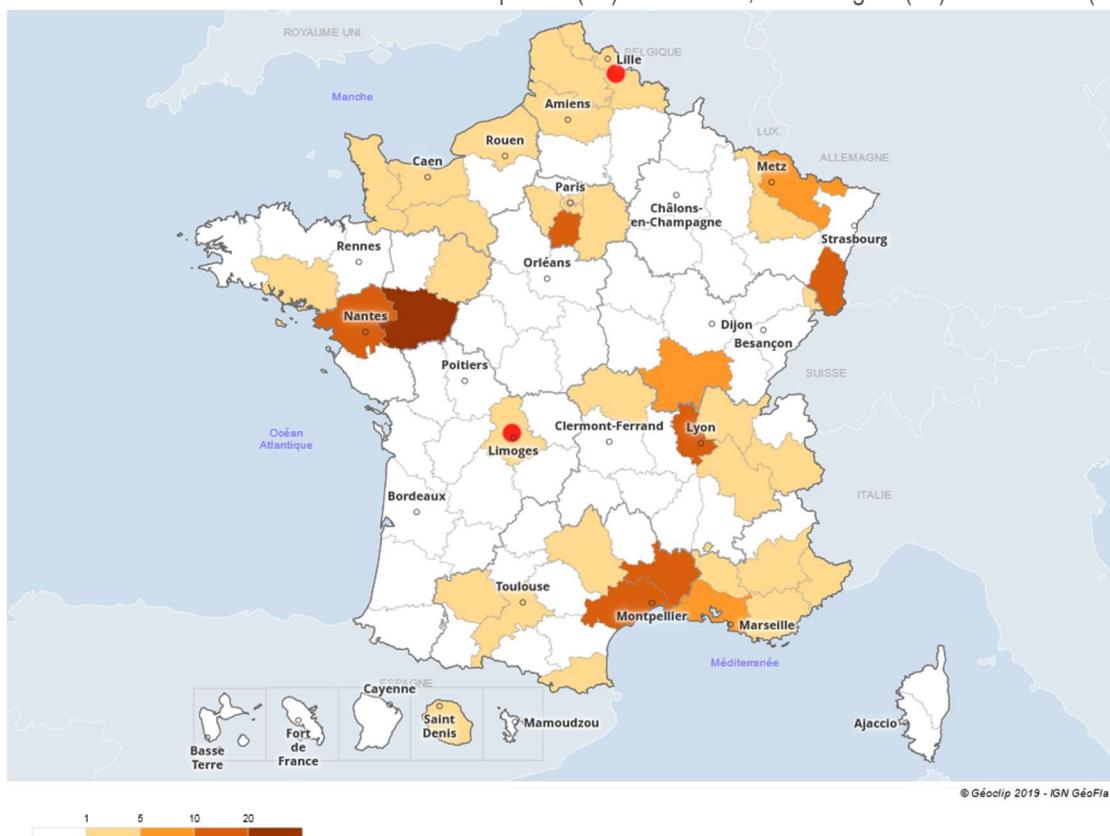


Figure 4b : Répartition des souches de PCR-ribotype 027 épidémique (cercle rouge) en fonction du département en 2023. Les départements n'ayant pas envoyés de souches sont représentés en blanc.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches toxinogènes reçues au laboratoire est le 014 : il est isolé sur tout le territoire (**Figure 5**).

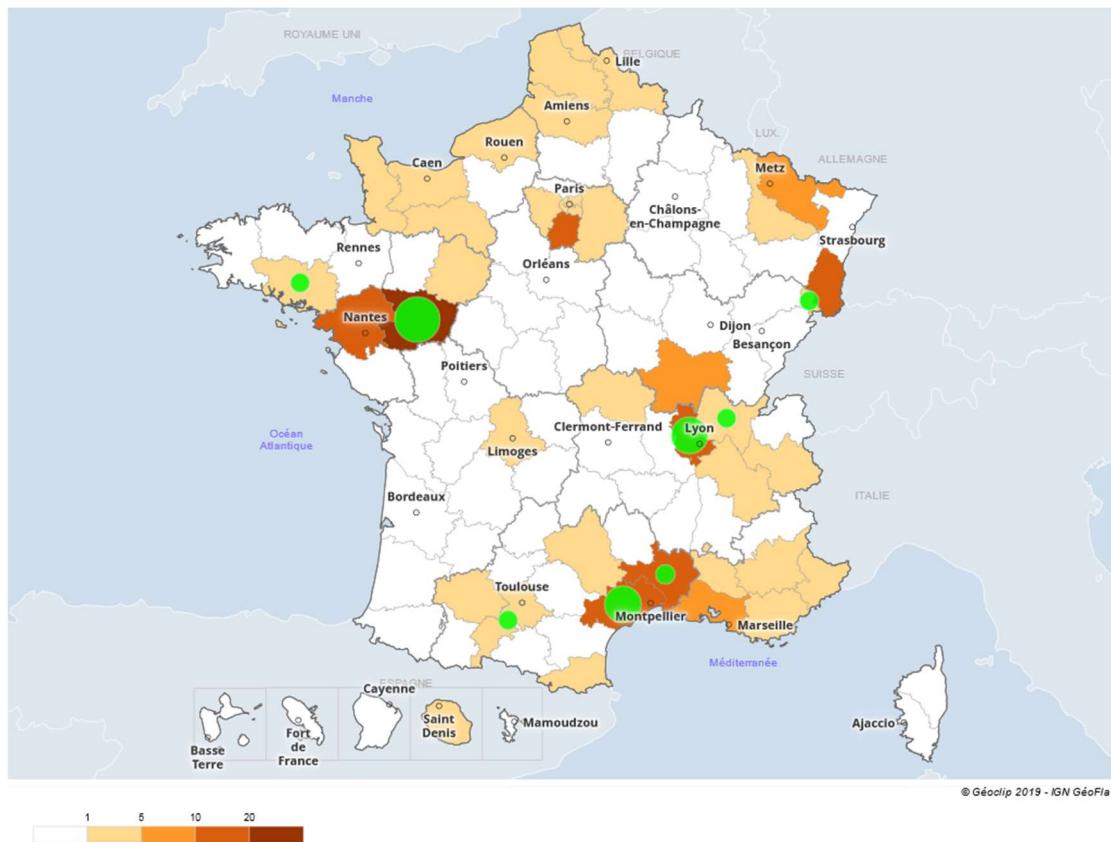


Figure 5 : Répartition des souches de PCR-ribotype 014 (cercles verts) en fonction des départements en 2023. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Les souches de PCR-ribotype 106 et 002 arrivent respectivement en 2ème et 3ème position (**Figure 6 et 7**).

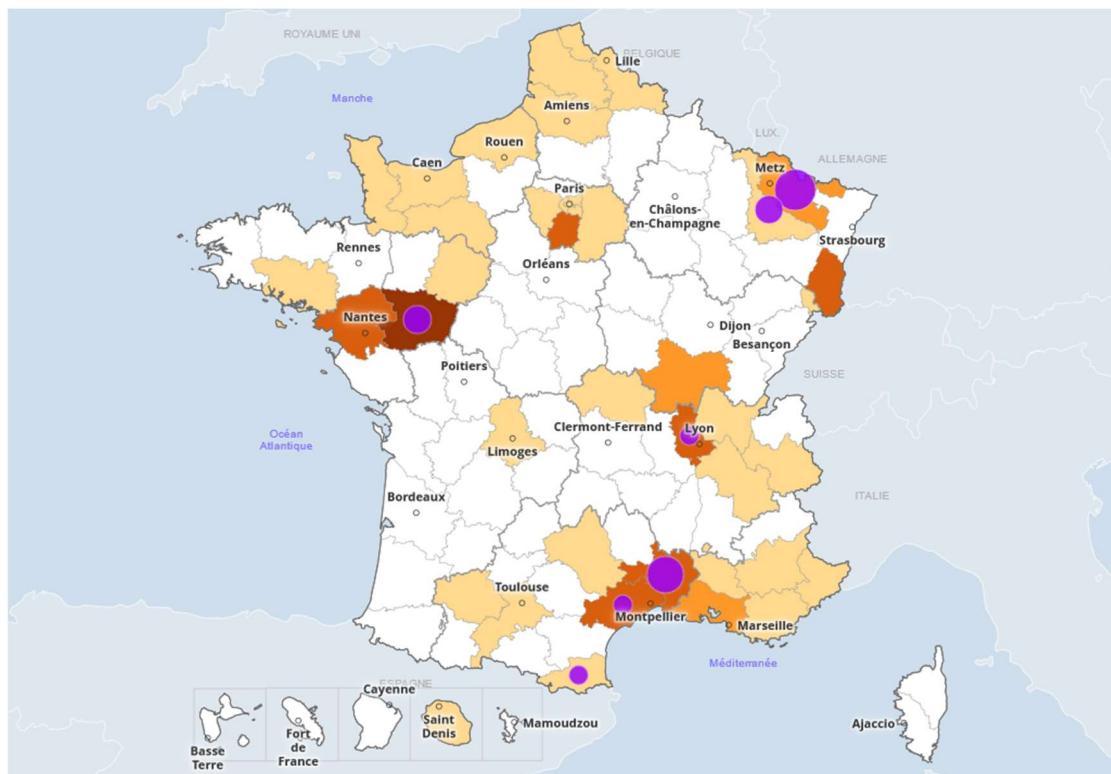




Figure 6 : Répartition des souches de PCR-ribotype 106 (cercles violet) en fonction des départements en 2023. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

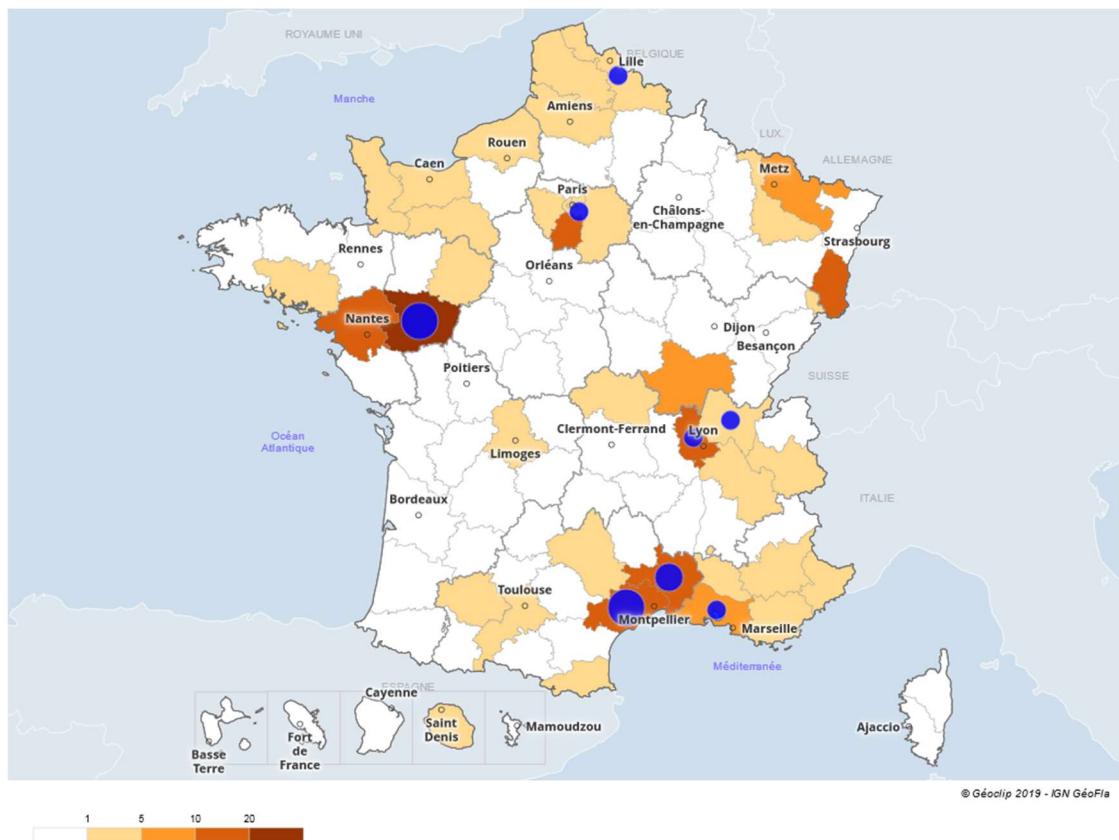


Figure 7 : Répartition des souches de PCR-ribotype 002 (cercles bleu) en fonction des départements en 2023. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches de *Clostridioides difficile* analysées cette année (souches de routine et d'études), 55 souches sont non toxinogènes, et les ribotypes 010 et 039 sont dominants (**Tableau IV**).

Tableau IV : Ribotypes des souches non toxinogènes analysées en 2023.

Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre
010	8	613	2	FR330	1
039	8	085	1	FR336	1
009	4	439	1	FR337	1
031	4	AI-42	1	FR338	1
205	4	AI-72	1	FR343	1
084	2	FR213	1	FR349	1
593	2	FR327	1	FR351	1

Au cours de l'année 2023, une légère augmentation de la proportion de souches non 027 possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (**Tableau V**) par rapport à 2022.

Tableau V : Evolution de la proportion de souches toxinogènes productrices de toxine binaire.

	2023	2022	2021	2020
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	207	399	240	316
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	19,81% (41/207)	17,04% (68/399)	20,00% (48/240)	19,9% (63/316)
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	5	18	8	16
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs chez les souches non 027 (%)	17,82% (36/202)	13,12% (50/381)	17,24% (40/232)	15,70% (47/300)

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

La sensibilité des souches de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, à la tétracycline, au chloramphénicol, à la rifampicine et à la tigécycline (méthode des disques) a été testée pour les 179 souches de *C. difficile* en 2023. Une détermination des CMI du méthronidazole, de la vancomycine et de la clindamycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 179 souches.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm)¹ de 27,9%, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm)¹ de 96,6%, pour la moxifloxacine (diamètre < 18 mm)² de 16,2%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm)¹ de 5,6%, pour la chloramphénicol (diamètre < 23 mm)³ de 10,1%, pour la rifampicine (diamètre < 19mm)² de 2,1%, et inférieur à 1% pour la tigécycline (diamètre < 21mm)² (**Tableau VI**).

On note une augmentation de la résistance des souches de *C. difficile* à l'érythromycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline.

Tableau VI : Pourcentage de résistance (R+I) des souches de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, à la tétracycline, au chloramphenicol, à la rifampicine et à la tigécycline.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline	Chloramphenicol	Rifampicine	Tigécycline
% de souches R+I	<22 mm	<15 mm	<18 mm	<19 mm	<23 mm	<19 mm	<21 mm
2021	14,2	95,5	7,6	1,3	-	-	-
2022	22,5	98,1	13,6	2,8	-	-	-
2023	27,9	96,6	16,2	5,6	10,1	2,1	<1

Parmi les 179 souches de routines testées, deux souches étaient résistantes à la vancomycine (CMI > 2 mg/l)², et 1 souche était résistante au méthronidazole (CMI > 4 mg/l) (**Tableau VII**).

¹ Selon CASFM 2013

² Selon CASFM-EUCAST Juin 2023

³ Selon CASFM 2020

Tableau VII : Caractéristiques des souches résistantes au méthronidazole ou à la vancomycine reçues en 2023.

N° de souche	PCR Ribotype	Toxines A et B	CMI Vancomycine (mg/L)	CMI Métronidazole (mg/L)
CD23-141	010	Absence	0,75	6
CD23-148	658	Présence	24	2
CD23-388	181	Présence	8	0,5

La répartition des CMI pour les 169 souches **toxinogènes** est présentée sur la **figure 7**.

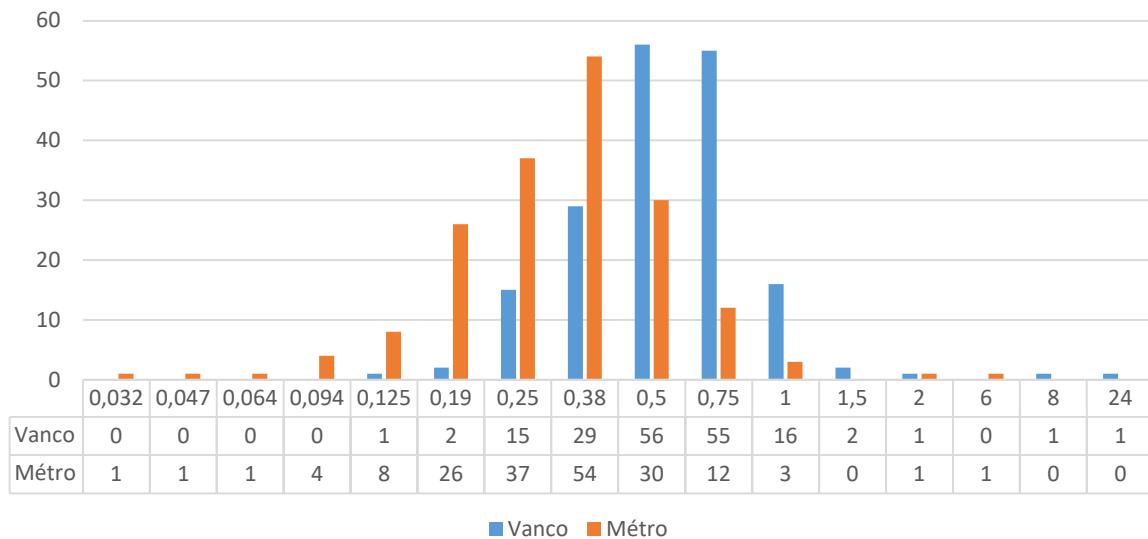


Figure 7 : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 169 souches toxinogènes.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*) et trésorier du groupe d'étude.
- **F. Barbut** a participé en 2022 à l'analyse des résultats du projet européen « 'ECDC CDI WGS study, 2021' (Séquençage des souches de *C. difficile* de ST1).
- **F. Barbut** participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'**ECDC** sur la surveillance des infections à *C. difficile*. Il est notamment intervenu à un Workshop organisé par l'ECDC sur le diagnostic des infections à *C. difficile* en 2017 et 2019 et a participé à la révision du protocole 'ECDC CDI WGS study, 2022'.
- **J. Couturier** et **F. Barbut** sont membres du comité d'organisation des réunions du réseau RCDF, qui comprend les différentes équipes de recherche franciliennes dont la thématique est centrée sur *C. difficile* (Institut Pasteur, Institut Micalis, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNR...)

a) Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé (https://epidemio.pasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809_112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf). Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches et d'éditer un compte-rendu des résultats. L'identification des PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) se fait selon les recommandations européennes et repose sur la base de données **Web-ribo**. L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à SPF.

Ce site est consultable dans sa totalité par Santé Publique France, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les ARS ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site est régulièrement mis à jour. Ce site autrefois 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. Des modifications du site et de la feuille de demande seront envisagées en 2024.

b) Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

F. Barbut a été 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.

Wingen-Heimann SM, Davies K, Viprey VF, Davis G, Wilcox MH, Vehreschild MJGT, Lurienne L, Bandinelli PA, Cornely OA, Vilken T, Hopff SM, Vehreschild JJ; COMBACTE-CDI consortium. *Clostridioides difficile* infection (CDI): A pan-European multi-center cost and resource utilization study, results from the Combatting Bacterial Resistance in Europe CDI (COMBACTE-CDI). *Clin Microbiol Infect.* 2022 Dec 29:S1198-743X(22)00643-7. doi: 10.1016/j.cmi.2022.12.019

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Evolution des infections à *Clostridioides difficile* en ville et à l'hôpital en France, 2015-2019 : étude CLOCIDIA

L'évolution récente de l'incidence des infections à *Clostridioides difficile* (ICD) n'est pas connue en France. L'objectif de cette étude est de déterminer l'incidence des ICD prises en charge en ville et à l'hôpital de 2015 à 2019.

Une étude rétrospective a été réalisée à partir des données du système national des données de santé (SNDS). Ont été inclus tous les patients âgés de plus de 18 ans ayant un diagnostic d'ICD entre le 01/01/2015 et le 31/12/2019. Les cas ont été classés selon leur lieu de prise en charge (en ville ou à l'hôpital) et leur origine (« communautaire » versus « associée aux soins »). Le diagnostic d'ICD a été établi soit par le codage PMSI (code A04.7) pour les patients pris en charge à l'hôpital soit par la recherche de toxine bactérienne (acte 0237 ou 1033 selon la NABM) associée à la dispensation de métronidazole dans les 14 jours suivant ou précédent le test biologique pour les patients pris en charge à en ville.

Au total, 154964 épisodes d'ICD ont été identifiés entre 2015 et 2019, correspondant à 61,4 cas pour 100000 habitants par an en moyenne. Parmi eux, 49,4% ont été pris en charge en ville (39% d'origine communautaire et 10,4% associés aux soins), et 50,2% à l'hôpital (8,6% d'origine communautaire et 41,6% associés aux soins). L'incidence des cas pris en charge en ville a évolué de 29,0/100000 en 2015 à 34,0/100000 en 2019 tandis que celle des patients pris en charge à l'hôpital reste relativement constante (31,9/100000 en 2015 versus 29,1/100000 en 2019). Il existe des différences régionales avec une incidence plus importante en région grand Est (214 pour 100000 respectivement en ville et à l'hôpital) et en PACA (185 et 161 pour 100000 habitants respectivement).

L'âge médian des cas pris en charge en ville était de 58 ans et la mortalité à un an était de 2,9% pour les cas d'origine communautaire et de 13,6 % pour les cas associés aux soins. L'âge médian des cas pris en charge à l'hôpital était de 75 ans, les mortalités intra-hospitalières et dans l'année qui suit l'hospitalisation étaient respectivement de 5,2% et 13,7%.

Nos résultats indiquent que la moitié des ICD est prise en charge en ville et que leur incidence a augmenté entre 2015 et 2019. Une meilleure connaissance de ce fardeau doit permettre d'améliorer la prise en charge des patients.

Barbut F, Fouad F, Lemaitre M, Gavazzi G, Paccalin M, Liliu H, Bourgeois M, Fiévez S, Nuttens C, Moïsi J et Vanhems P
Evolution des infections à *Clostridioides difficile* en ville et à l'hôpital en France, 2015-2019
RICAI 2022, Paris.

4. Alertes

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. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

- **Enseignements sur *C. difficile* 2023**

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours
Université de Paris	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours
Sorbonne Université	Réanimation	DU en soins infirmiers de réanimation et urgences vitales	Cours
Université de Paris Université de Versailles - Saint-Quentin en Yvelines – Université de Bordeaux	Infectiologie	DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse	Cours
Sorbonne Université	Microbiologie	DU Microbiote et santé (Pr K. Clément)	Cours
Université de Grenoble	Microbiologie	DU Thérapeutiques et Microbiotes (Pr Murielle Cornet)	Cours

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

- **Université Mérieux, Lyon** : « Formation sur les bactéries anaérobies (3 jours)

F. Barbut est membre du Comité d'organisation du 8th International *C. difficile* symposium (Bled Slovénie, septembre 2024)

- **Activités de formations continues 2023**

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées- Année
Réseau Infectio-PACA	Microbiologistes, infectiologues	Médecins, chercheurs	Staff recherche	18/01/2022
Hôpital Saint Antoine Réanimation médicale	Réanimateurs	Médecins	Staff de service	27/04/2023

Strasbourg	Bacteriologistes, infectiologues, chercheurs	Médecins	Staff de service	08/12/2023
Ambroise Paré	Infectiologie	Infectiologues	Staff de service	13*12/2023

- **Stagiaires accueillis 2022-2023**

Organisme Nom de l'Etudiant	Diplôme / Sujet	Année
Thèse d'Université en co-tutelle Anais Lemaire	Doctorat de sciences <i>Clostridioides difficile</i> chez les Equidés : rôle du portage asymptomatique et des biofilms dans la persistance des infections et le potentiel zoonotique	2021-2023
DU « création, analyse et valorisation de données omiques » Killian Le Neindre	Mémoire de DU : projet ColoDIFF	2022
Université de Carlton, USA Ella Wiegman	Caractérisation phénotypique de mutants de <i>Clostridioides difficile</i>	Juin-Juillet 2023
Master 2 Anne Lecoutour	Caractérisation génotypique et phénotypique des souches de <i>C. difficile</i> responsables de récidives multiples	2022-2023

- **Liste des guides élaborés**

KUIJPER E., REUSBAET F., BARBUT F.

Clostridium, Clostridioides and other clostridia

In « Manual of Clinical Microbiology », 13th edition, ASM press , 2022

BARBUT F., ECKERT C., LE MONNIER A.

Clostridium difficile

REMIC, 2021, chapitre 58

Fiche EFFICATT . « *Clostridium difficile* » INRS 2023

- **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, 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.

- **BARBUT F**

Webinar “Secondary prevention of CDI : facts and future”

Organisé par le « European study group on *C. difficile* » (ESGCD)

- BARBUT F
Webinar “Molecular diagnosis of *C. difficile* infection”
Organisé par le « European study group on molecular diagnosis » (ESGMD)
6 février 2023
- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>
Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l’Institut Pasteur a été actualisé en 2017.
- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à santé publique France et aux Cpias. Ce site permet au laboratoire associé d’enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d’éditer un compte rendu des résultats qui est envoyé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- Site web RAISIN et de Santé Publique France : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>
- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » (http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2006/guide raisin/conduite_clostridium_difficile.pdf)

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

F. Barbut et Killian Le Neindre/Jeanne Couturier ont été régulièrement en contact avec A. Carbonne (Santé Publique France) pour l’interprétation de situations épidémiologiques.

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

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

5.3 Conseil et expertise pour d’autres cibles (médias, grand public ...)

Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

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

Evaluation de 12 tests immuno-enzymatiques pour la détection de la glutamate déhydrogénase (GDH) et des toxines de *Clostridioides difficile*.

Clostridioides difficile is the major cause of healthcare-associated diarrhea. Guidelines for the diagnosis of *C. difficile* infections (CDI) have been updated in 2016 by the ESCMID and recommend the use of a two-step algorithm and the detection of free toxins in stools. The objectives of this study were to assess the performances (sensitivity and specificity) of (i) 6 immuno-enzymatic assays (Techlab Quik Chek [Sobioda], Immunocard [Launch Diagnostics], JusCheck [Elitech Microbio], Certest [Theradiag], Monlab [Keyoflab], GDH sign [Servibio]) for the detection of GDH alone, and ii) 6 immuno-enzymatic assays for the combined detection of GDH and toxins (same companies).

99 stool samples stored at -80°C were used for this evaluation: 84 were positive in culture on selective media (ChromId, Biomérieux) including 47 stools positive for free toxins (stool cytotoxicity assay on MRC-5 cell culture), and 15 were negative for both culture and cytotoxicity assay. The twelve tests were performed simultaneously according to manufacturer's instructions. Interpretation of the tests was done by two independent technicians.

The sensitivity and specificity of each test are described in the table below

	GDH assay			Combined assay for GDH and Toxin				
	GDH			GDH		Toxins A or B		
	Sensitivity	Specificity	Invalid	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Invalid
Quik Chek	99%	100%	2%	95%	100%	81%	100%	0%
Immunocard	96%	93%	2%	90%	100%	50%	100%	0%
Jus Check	79%	100%	0%	82%	100%	19%	100%	0%
Certest	95%	100%	0%	95%	100%	67%	100%	0%
Monlab	96%	100%	0%	96%	100%	71%	96%	0%
Servibio	93%	100%	0%	95%	100%	73%	98%	0%

The different assays under evaluation displayed a high sensitivity and specificity for detecting GDH. However, detection of toxins is highly variable across the different assays. In our hands, Quik Chek had the best performances whereas JusCheck lacks sensitivity for toxin detection.

Caractérisation phénotypique et génomique des souches de *Clostridioides difficile* impliquées dans les rechutes multiples.

Les rechutes multiples d'ICD sont fréquentes, elles impactent la qualité de vie des patients et sont difficiles à traiter. Elles sont liées soit à l'état du patient (immunité, dysbiose intestinale), soit potentiellement à des caractéristiques des souches.

Objectif : Déterminer les caractéristiques génomiques et phénotypiques in vitro de souches de *C. difficile* ayant entraîné des ICDs.

Entre 2019 et 2022, 10 souches de rechutes ont été sélectionnées et appariées sur leur PCR-ribotype à 10 souches contrôles. Les 20 génomes ont été séquencés et analysés (résistome, virulome, éléments génétiques mobiles). Les caractéristiques phénotypiques (résistance au stress (H₂O₂), mobilité, hydrophobicité, sporulation, germination, biofilm, sensibilité aux acides biliaires) des souches de rechutes et des contrôles ont été comparées.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence génomique ou phénotypique significative entre les souches impliquées dans les rechutes multiples et les souches contrôles, en dehors de la sensibilité au désoxycholate 0,03%, qui ne semble pourtant pas expliquer les rechutes à *C. difficile*. L'ensemble des tests réalisés indique une grande variabilité phénotypique et génomique entre les souches.

L'origine des ICDs ne semble pas directement liée à la souche de *C. difficile*, suggérant que ces rechutes sont davantage en relation avec d'autres facteurs tels que la dysbiose intestinale ou le statut immunitaire du patient.

LECOUTOUR A., MESA V., EHMIG M., MA L., PIGNEUR B., BARBUT F.

Caractérisation phénotypique et génomique des souches de *Clostridioides difficile* impliquées dans les rechutes multiples

42ème RICAI, 18-19 décembre 2023

Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?

En décembre 2021, l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) a actualisé les recommandations concernant le traitement des infections à *Clostridioides difficile* (ICD). Ces recommandations ont été validées par la Société de Pathologies infectieuses de langue française et diffusées par la Commission des médicaments anti-infectieux de l'AP-HP et de notre hôpital.

L'objectif de ce travail était de déterminer la conformité des prescriptions, dans notre hôpital, pour traiter les ICDs.

Les caractéristiques clinico-biologiques et les traitements des patients ayant une ICD (test immuno-chromatographique ou PCR positifs pour les toxines) ont été recueillis entre juin 2022 et juin 2023 grâce au dossier patient informatisé. La conformité des prescriptions a été étudiée selon la sévérité de l'infection (forme simple, sévère non compliquée, sévère compliquée), le risque de récidive (âge > 65 ans, ou traitement concomitant par inhibiteur de pompe à proton et/ou antibiotique, ou antécédent d'ICD), et s'il s'agissait d'un 1er épisode ou d'une récidive. Le traitement était considéré comme conforme (molécule et posologie adéquates), NC (molécule inadéquate) ou partiellement conforme (posologie ou durée inadéquate, par exemple). En cas de changement d'une molécule NC pour une conforme, dans les 3 jours, la conformité était considérée comme partielle.

Au total, 130 cas d'ICD (88% d'épisodes initiaux et 12% de récidives) ont été inclus. La moyenne d'âge était de 65,5 ans avec un ratio homme/femme de 0,9. Parmi les cas, 72% étaient nosocomiaux (> 48 heures), 97% avaient au moins

un facteur de risque de récidives, 50% étaient des formes simples, 25% des formes sévères non compliquées, 25% des formes sévères compliquées. Au total, 122 cas ont été traités : 39% des traitements ont été considérés comme conformes, 43% étaient NC et 12% étaient partiellement conformes. Dans 96% des cas de NC, la vancomycine était prescrite alors que la fidaxomicine était attendue. Aucun patient de la cohorte n'a été traité par métronidazole oral.

Après 6 mois d'appropriation, les nouvelles recommandations de l'ESCMID semblent connues des cliniciens de notre hôpital, si l'on en juge par l'absence d'utilisation de métronidazole per os et l'utilisation fréquente de la fidaxomicine.

JOUANS C., STORDEUR F., FERREIRA C., BARBUT F.
Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?
42ème RICAI, 18-19 décembre 2023

Emergence *in vivo* d'une souche de *Clostridioides difficile* résistante à la fidaxomicine.

Fidaxomicin is a first-line treatment for *Clostridioides difficile* infections (CDIs). Fidaxomicin resistance has rarely been reported in this urgent antimicrobial resistance threat as defined by the Center for Disease Control and Prevention.

The objective of the study was to report a case of fidaxomicin-resistant *C. difficile* in a patient treated by fidaxomicin, to characterize the genetic determinant for resistance and the consequences on pathophysiological traits, and review the literature.

A 38-year-old male patient with several risk factors for CDI experienced three episodes of hospital-acquired CDI and received fidaxomicin for the first episode. The successive isolates were subjected to phenotypic characterization (antimicrobial susceptibility, growth, sporulation ability and toxin production) and WGS analysis to investigate the clonality and the modifications associated with resistance.

Resistance to fidaxomicin arose in isolates from the recurrences of CDI (MIC: 16 mg/L). WGS analysis showed a close genetic link between strains suggestive of relapses in this patient. A T3428G mutation in the *rpoB* gene might be associated with fidaxomicin resistance. The resistance was associated with defects in growth, sporulation and toxins' production. A review of the literature found only three previous fidaxomicin-resistant *C. difficile* clinical strains.

Although rarely reported, resistance to fidaxomicin may quickly emerge *in vivo* after a single course of treatment. This observation supports the need for prospective surveillance of the susceptibility of *C. difficile* to treatment antibiotics. However, the clinical relevance of fidaxomicin resistance still needs to be elucidated, particularly due to its apparent rareness and associated fitness cost.

MARCHANDIN H, ANJOU C, POULEN G, FREEMAN J, WILCOX M, JEAN-PIERRE H, BARBUT F.
In vivo emergence of a still uncommon resistance to fidaxomicin in the urgent antimicrobial resistance threat *Clostridioides difficile*.
J Antimicrob Chemother. 2023 Aug 2;78(8):1992-1999. doi: 10.1093/jac/dkad194.

Discrimination des souches de *Clostridioides difficile* par MALDI-TOF MS

La toxine binaire de *Clostridioides difficile* (CD) présente chez le clone épidémique dit « hypervirulent » 027 serait un facteur de virulence supplémentaire. Les objectifs étaient (i) d'identifier les souches productrices de toxine binaire et (ii) d'identifier les clones hypervirulents (clones 027 et apparentés) au sein de ces souches par spectrométrie de masse (MS) de type MALDI-TOF à l'aide du machine learning.

Cent quarante souches préalablement caractérisées au CNR (PCR-ribotyping, PCR multiplex pour le profil toxigénique) et non reliées épidémiologiquement (43 souches binaires + dont 13 clones 027) ont été incluses. Après extraction complète (éthanol, acide formique, acétonitrile) chaque extrait a été déposé sur 8 puits et analysé 3 fois par

MALDI-TOF MS. Après analyse visuelle pour éliminer des spectres de mauvaise qualité, un minimum de 20 spectres était retenu pour chaque souche. Le traitement du signal (lissage, traitement de la ligne de base et détection des pics) a été réalisé avec le package MALDIquant dans l'environnement R. La différenciation des PCR-ribotypes (PR) a été réalisée à l'aide d'un modèle basé sur la sPLS-DA (sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis) (package mixOmics). Pour chacun des objectifs, les spectres obtenus étaient aléatoirement divisés en deux jeux de données (jeux d'entraînement et test). Après entraînement du modèle sur le jeu d'entraînement, les performances (coefficients kappa et accuracy) du modèle étaient estimées sur le jeu test. L'opération de division aléatoire, d'entraînement et du test du modèle ont été réalisés 500 fois.

Concernant la discrimination des souches binaires + des binaires -, 3202 spectres ont été obtenus à partir des 140 souches. Le coefficient Kappa moyen et son écart-type étaient de $0,78 \pm 0,05$ et l'accuracy moyenne et son écart type étaient de $0,91 \pm 0,02$.

Concernant l'identification du clone hypervirulent 027 (963 spectres provenant de 43 souches) au sein des souches productrices de toxines binaires, le coefficient Kappa moyen était de $0,95 \pm 0,02$ et l'accuracy moyenne de $0,97 \pm 0,01$.

Le MALDI TOF SM pourrait être utilisé comme outil pour améliorer le diagnostic afin d'identifier précocement les souches productrices de toxine binaire et le clone hypervirulent 027. A terme il pourrait permettre d'identifier les ribotypes.

GODMER A, LE NEINDRE K, LATAPY V, BASTIDE M, YOUSOUF A, SYED ZAIDI R, AUBRY A, VEZIRIS1, N, BARBUT F, ECKERT C.
Discrimination des souches de Clostridioides difficile par MALDI-TOF MS
RICAI, Paris, décembre 2021 communication affichée.

GODMER A., GIAI GIANETTO, Q., LE NEINDRE, K., LATAPY V., BASTIDE M, EHMIG M, LALANDE V., VEZIRIS N, AUBRY A., BARBUT, F, ECKERT C
Contribution of MALDI-TOF Mass Spectrometry and Machine Learning Including Deep Learning Techniques for the Detection of Virulence Factors of Clostridioides difficile Strains
Microbial Biotechnology 2023 soumis

Prévalence et facteurs de risque du portage asymptomatique de *Clostridioides difficile* toxinogène (étude ancillaire du PHRC CODBAHRE)

L'incidence des infections à *Clostridioides difficile* (CD) a augmenté au cours de la dernière décennie. Des études suggèrent que les porteurs asymptomatiques pourraient constituer un important réservoir de CD dans les établissements de santé. Nous avons mené une étude de prévalence ponctuelle pour estimer le portage asymptomatique de CD toxigène (tox+) et les facteurs de risque associés chez les patients > 3 ans. Entre le 16/09/2019 et le 15/01/2020, tous les patients > 3 ans hospitalisés dans 11 CHU de l'agglomération parisienne ont été inclus un jour donné dans notre étude. Ils ont été dépistés pour le portage de CD tox+ par prélèvement rectal et interrogés. Les écouvillons ont été étalés sur gélose chromID®. Les isolats ont été caractérisés par PCR-ribotypage et PCR multiplex ciblant les gènes des toxines. Un modèle de régression logistique a été utilisé pour déterminer les facteurs de risque associés au portage asymptomatique CD tox+ en utilisant une analyse uni- et multivariée. Au cours de la période d'étude, 2389 patients ont été inclus et dépistés. L'âge médian était de 62 ans (écart interquartile 35-78 ans) et 1153 étaient des hommes (48,3%). Dix-neuf patients avaient déjà eu une infection à CD (0,9 %). Au total, 121/2103 patients de plus de 3 ans étaient CD+ (5,8%), dont 73 tox+ (3,5%) : 61 (88,4%) étaient asymptomatiques alors que 8 (11,6%) étaient diarrhéiques. Les souches toxinogènes les plus fréquentes appartenaient aux PCR-ribotypes 106 (n=14, 15,0%), 014 (n=12, 12,9%) et 020 (n=10, 10,8%). En analyse multivariée, 2 facteurs étaient associés au portage asymptomatique CD tox+ (n=61 patients comparés à 1724 CD- asymptomatiques) : le co-portage d'ESBLE (Odd Ratio ajusté [ORa] 2,3, IC95% 1,2-4,7, p = 0,02) et un antécédent d'ICD (ORa 5,8, IC95 % 1,2-28,6, p = 0,03). La consommation de produits laitiers crus avait un effet protecteur significatif (ORa 0,5, IC95% 0,2-0,9, p=0,01). Nous

avons montré qu'il y avait une faible prévalence de portage asymptomatique de CD tox+ chez les patients hospitalisés dans les hôpitaux participants. La consommation de lait cru prévient la colonisation par les CD tox+, probablement en raison de l'effet barrière des bactéries associées au lait.

JOLIVET S, COUTURIER J, GROHS P, et al.

Prévalence et facteurs de risque du portage asymptomatique toxinogène de *Clostridioides difficile* chez l'adulte dans onze hôpitaux français
ECCMID 2022, 21-24 avril 2022, Lisbonne. Poster

JOLIVET S, COUTURIER J, GROHS P, VILFAILLOT A, ZAHAR JR, FRANGE P, CASETTA A, MOULIN V, LAWRENCE C, BAUNE P, BOURGEOIS C, BOUFFIER A, LAUSSUCQ C, SIENZONIT L, PICARD S, PODGLAJEN I, KASSIS-CHIKHANI N, BARBUT F.

Prevalence and risk factors of toxigenic *Clostridioides difficile* asymptomatic carriage in 11 French hospitals.

Front Med (Lausanne). 2023 Jul 19;10:1221363. doi: 10.3389/fmed.2023.1221363. eCollection 2023.

Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*

The gut microbiota plays a pivotal role in *Clostridioides difficile* infection (CDI). We aimed to compare the composition of the gut microbiota of patients with CDI, patients asymptotically colonized by *Clostridioides difficile* (CDC), patients with non-*C. difficile* diarrhea (NCD) and healthy controls (HC) through 16S rRNA gene amplicon sequencing.

A total of 12 patients with CDI were included. Each case patient was matched with 4 asymptomatic CD carriers (CDC) including 2 with toxigenic CD strains, 2 patients with non-*C. difficile* diarrhea (NCD) and 2 healthy controls (HC). Patients in each group were matched by age subgroups (<3 years old, 3-18 years old, 18-65 years old, and > 65 years old), and antibiotic exposure. PCR amplification of V3 to V4 hypervariable regions of 16S rRNA gene was performed. Purified amplicons were sequenced at paired ends with an Illumina MiSeq instrument. 16S sequencing data were analyzed using the Phyloseq, Microbiome, MicrobiomeMarker, and MicrobiotaProcess R packages (V4.3.1). Taxa associated with each group were also determined by the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe) algorithm.

We found a significantly higher bacterial richness in the HC group compared to the CDC, NCD and CDI groups. Beta-diversity analysis of the gut microbiota in our cohort showed that the Unifrac index differed significantly between all groups. The gut microbiota of asymptomatic patients colonized with CD was significantly enriched with *Hungatella* sp., *Enterocloster aldenensis*, and *Clostridium scindens*. Healthy controls' gut microbiota was significantly enriched with *Faecalibacterium prausnitzii*, *Sporobacter* sp., *Mediterranibacterium torques*, *Campylobacter hominis*, *Blautia* sp., *Mobiluncus cortisii*, *Anerotignum* sp., and members of the *Lachnospiraceae* family. When compared to the HC group, the most significantly depleted taxa in the gut microbiota of patients with CDI was *Faecalibacterium prausnitzii*.

CASSIR N, COUTURIER J., DELANOYE J, WOLFROMM A, KASSIS-CHIKHANI N., BARBUT J.

Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection:

the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*

Gut Microbes reports 2024, soumis

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

(i) *Publications nationales*

(ii) *Publications internationales*

2023

KRUTOVA M, DAVIS K, GUERY B, **BARBUT F.**

Faecal microbiota transplantation for first and second episodes of *Clostridioides difficile* infection.
Lancet Gastroenterol Hepatol. 2023 Feb;8(2):111-112. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00388-0.
PMID: 36620980

JOLIVET S, COUTURIER J, GROHS P, VILFAILLOT A, ZAHAR JR, FRANGE P, CASETTAA, MOULIN V, LAWRENCE C, BAUNE P, BOURGEOIS C, BOUFFIER A, LAUSSUCQ C, SIENZONIT L, PICARD S, PODGLAJEN I, KASSIS-CHIKHANI N, **BARBUT F.**

Prevalence and risk factors of toxigenic *Clostridioides difficile* asymptomatic carriage in 11 French hospitals.

Front Med (Lausanne). 2023 Jul 19;10:1221363. doi: 10.3389/fmed.2023.1221363. eCollection 2023.
PMID: 37547619

FERRARIS L, DELANNOY J, MAZUET C, DIANCOURT L, MESA-SCHEIN V, **BARBUT F**, AIRES J. *Clostridium neonatale* antimicrobial susceptibility, genetic resistance determinants, and genotyping: a multicentre spatiotemporal retrospective analysis.

J Antimicrob Chemother. 2023 Dec 12:dkad369.

MESA V, DELANNOY J, FERRARIS L, DIANCOURT L, MAZUET C, **BARBUT F**, AIRES J. Core-genome multilocus sequence typing and core-SNP analysis of *Clostridium neonatale* strains isolated in different spatio-temporal settings.

Microbiology spectrum 2023 Nov 1:e0276623. doi: 10.1128/spectrum.02766-23. Online ahead of print. PMID: 37909758

MARCHANDIN H, ANJOU C, POULEN G, FREEMAN J, WILCOX M, JEAN-PIERRE H, **BARBUT F.** In vivo emergence of a still uncommon resistance to fidaxomicin in the urgent antimicrobial resistance threat *Clostridioides difficile*.

J Antimicrob Chemother. 2023 Aug 2;78(8):1992-1999. doi: 10.1093/jac/dkad194.

BENECH N, **BARBUT F**, FITZPATRICK F, KRUTOVA M, DAVIES K, DRUART C, CORDAILLAT-SIMMONS M, HERITAGE J, GUERY B, KUIJPER E, **ESGCD** and ESGHAMI. Update on microbiota-derived therapies for recurrent *Clostridioides difficile* infections, 2023. Clin Microbiol Infect. 2023 Dec 14:S1198-743X(23)00597-9.

COUTURIER J, DAVIES K, **BARBUT F.**

Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe.

Adv Exp Med Biol. 2024;1435:151-168.

HUNAULT L, ENGLAND P, **BARBUT F**, IANNASCOLI B, GODON O, DEJARDIN F, THOMAS C, DUPUY B, GUO C, MACDONALD L, GOROCHOV G, STERLIN D, BRUHNS P. A monoclonal antibody collection for *Clostridioides difficile* typing ? Gut Pathog. 2024 Jan 19;16(1):4.

KHANAFER L., FITZPATRICK F., **BARBUT F.**, KRUTOVA M., DAVIES K., GUERY B., VANHEMS P. Heterogeneity in practices to reduce the risk of transmission of *Clostridioides difficile* in healthcare setting: a survey of the ESCMID study group for *C. difficile* members European J Clin Microbiol Infect. Dis 2024, sous presse

SALANDRE A, DELANNOY J, GOUDIABY MTB, **BARBUT F**, THOMAS M, WALIGORA-DUPRIET AJ, KAPEL N.

A Simple *In Vitro* Test to Select Stools for Fecal Microbiota Transplantation to Limit Intestinal Carriage of Extensively Drug-Resistant Bacteria.
Microorganisms. 2023 Nov 11;11(11):2753.

GODMER A., GIAI GIANETTO Q., LE NEINDRE K., LATAPY V., BASTIDE M., EHMIG M., LALANDE V., VEZIRIS N., AUBRY A., **BARBUT F.**, ECKERT C.
Contribution of MALDI-TOF Mass Spectrometry and Machine Learning Including Deep Learning Techniques for the Detection of Virulence Factors of *Clostridioides difficile* Strains
Microbial Biotechnology 2024 soumis

CASSIR N., COUTURIER J., DELANOYE J., WOLFROMM A., KASSIS-CHIKHANI N., **BARBUT F.**
Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*
Gut Microbes reports 2024, soumis

KOTILA S., **BARBUT F.**, BERGER F., TOTH A., HADJU A., HAJBEL-VEKONY G., PERSSON S., KRUTOVA M., BAKTASH A., KUIJPER E., PERRY M., MORRIS T., MENTULA S., KINROSS P. on behalf of ECDC CDI WGS group
Multi-country, whole genome sequencing-based clusters of *Clostridioides difficile* infection cases with RT176 and related strains, in European healthcare centres, 2006-2020
Eurosveillance 2024, In preparation

MUZYUKINA P., KIRILLOV B., STEPANOV A., **BARBUT F.**, SEVERINOV K., SOUTOURINA O.
Sensitive high resolution CRISPR-based typing for epidemiology and microevolution survey of the human pathogen *Clostridioides difficile* with multi-task deep learning.
In preparation

NUTTENS C., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., **BARBUT F.**, PACCALIN M., LILLIU H., BOURGEOIS M., FIÉVEZ S., LEMAITRE M., MOÏSI J.
Estimation of the burden of *Clostridioides difficile* infection in the community and in hospitals settings in France from 2015-2019: results from a national health insurance database study (CLODICIA SNDS study)
In preparation

Communications nationales,

2023

BARBUT F.
Dysbioses intestinales à *Clostridioides difficile*
Reso Infectio PACA Est
« Actualités sur le Microbiote »
Nice, 18 janvier 2023

EHMIG M, MA L, LALANDE V, FILLION M, COUTURIER J, BARBUT F.
Évaluation du test GI Bacterial PLUS ELITe MGB® Kit pour le diagnostic des infections à *Clostridioides difficile* (symposium Elitech)
42^{ème} RICAI, 18-19 décembre 2023

LECOUTOUR A., MESA V, EHMIG M., MA L., PIGNEUR B., BARBUT F.
Caractérisation phénotypique et génomique des souches de *Clostridioides difficile* impliquées dans les rechutes multiples
42^{ème} RICAI, 18-19 décembre 2023

JOUANS C., STORDEUR .F, FERREIRA C., BARBUT F.

Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?
42^{ème} RICAI, 18-19 décembre 2023

Communications internationales

2023

BARBUT F.

Diagnostic des infections à *Clostridioides difficile* (ICD) : performances et pertinence des tests
Symposium « *Clostridioides difficile* » organisé par les laboratoires Tillotts
Copenhagen 14 avril 2023

VANHEMS P, FOUAD F, LEMAITRE M, GAVAZZI G, PACCALIN M, LILLIU H, BOURGEOIS M, FIÉVEZ S, NUTTENS C, MOÏSI J ET **BARBUT F**

Epidemiology and economic burden of *Clostridioides difficile* infection in community and hospital settings in France, 2015-2019

33th ECCMID Copenhagen (France), 15-18 Avril 2023 (Communication orale)

LEMAIRE A, BRIDOUX L, **BARBUT F.**, PETRI S., POQUET I.

Biofilm of *Clostridioides difficile* strains isolated from Equidae

10th Congress of European Microbiologists

Hamburg, Germany, 9 – 13 July 2023 (Poster).

(v) *Conférences sur invitations. Souligner les noms des auteurs appartenant au CNR.*

BARBUT F

Webinar “Secondary prevention of CDI: facts and future”

Organisé par le « European study group on *C. difficile* » (ESGCD)

6 Juillet 2023

BARBUT F

Webinar “Molecular diagnosis of *C. difficile* infection”

Organisé par le « European study group on molecular diagnosis » (ESGMD)

6 février 2023

BARBUT F.

Dysbioses intestinales à *Clostridioides difficile*

Reso Infectio PACA Est

« Actualités sur le Microbiote »

Nice, 18 janvier 2023

BARBUT F.

Diagnostic des infections à *Clostridioides difficile* (ICD) : performances et pertinence des tests

Symposium « *Clostridioides difficile* » organisé par les laboratoires Tillotts

Copenhagen 14 avril 2023

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

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

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

L'objectif du projet DIFALIBO est d'évaluer la prévalence de *C. difficile* dans les aliments impliqués dans des 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 ribotyping (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 méthronidazole et à la moxifloxacine, et présente une résistance à l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. Pour les isolats d'origine animale, toutes les souches présentent le gène codant pour la toxine A, 96 % le gène codant pour la toxine B (souches appartenant au toxinotype 11) et 73% le gène codant pour la toxine binaire. Les PCR-Ribotypes 126 et 78 sont les ribotypes majoritaires retrouvés dans les échantillons d'origine porcine (81%), les PCR-ribotypes retrouvés chez les autres espèces animales sont beaucoup plus variables. Toutes les souches sont sensibles à la vancomycine et au méthronidazole, 38% sont sensibles à l'érythromycine, 4 % à la clindamycine, 81% à la moxifloxacine et 36 % à la tétracycline.

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

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

Détection et caractérisation de souches de *Clostridioides difficile* dans des élevages de poulets en France
14ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, 9 et 10 mars 2022

Financement de l'ANR CLOSTABAT ("Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses") soumise par le Dr O. FIRMESSE (département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments) (2022-2025)

Le laboratoire *C. difficile* associé au CNR des anaérobies est responsable du WP4 relatif à la caractérisation des souches de *C. difficile* et *C. perfringens*

Co direction de thèse de sciences (Anaïs Lemaire) avec le Dr Poquet Isabelle (Institut Micalis, INRAE, Domaine de Vilvert, Bât 442, 78352 Jouy-en-Josas Cedex) sur : "Clostridioides difficile chez les Equidés : rôle des biofilms dans la colonisation, le portage asymptomatique ou la virulence, et la persistance des infections" (CLODIFFEQUI 2.0).

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

PETRY S.; TAPPREST J.; MAILLARD K.; DUQUESNE F.; KOZAK S.; LE NEINDRE K.; BARBUT F.; BRIDOUX L.; POQUET, I. *Clostridioides difficile* in necropsied equidae, Isolation and caratterisation of the CloDifEqui collection of Strains 11th International Equine Infectious Diseases Conference 2021 Deauville, France, 27 sept-1er oct 2021.

LEMAIRE A., BRIDOUX L., BARBUT F., PETRI S., POQUET I.
Biofilm of *Clostridioides difficile* strains isolated from Equidae
10th Congress of European Microbiologists
Hamburg, Germany, 9 – 13 July 2023.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Le programme d'activité pour 2024 est centré sur les activités suivantes :

Projet avec la DGAL concernant la filière poulet

C. difficile a été mis en évidence dans le tractus intestinal de nombreux animaux, notamment les bovins, les porcs, les moutons, et les volailles. Une étude récente conduite en Allemagne a montré que les viandes de volaille avec peaux étaient contaminées par *C. difficile* à une prévalence de 15,8%. Les souches isolées chez ces animaux correspondaient à celles impliquées dans les infections chez l'Homme.

Une convention a été signée avec la DGAL pour inclure *C. difficile* dans le plan de surveillance des élevages de poulet. Ce plan comprend habituellement *Salmonella* sp et *Campylobacter* sp. Peu de données existent sur *C. difficile* et son statut zootonique est largement discuté au niveau de la communauté scientifique et des instances officielles (EFSA). Les objectifs de ce plan de surveillance sont donc de :

- Déterminer la prévalence de *C. difficile* et le type de souches dans les viandes de poulet en France à la distribution
- Etudier d'éventuelles interactions entre ces pathogènes (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. et *C. difficile*) sur les produits de volailles.
- Comparer la diversité des souches isolées des produits alimentaires avec celles obtenues au stade de la production primaire pour la filière avicole
- Identifier des actions correctives et préventives sur la chaîne alimentaire, le cas échéant.
- Acquérir des données représentatives pour les études d'attribution des sources de salmonelloses, de campylobactérioses et *C. difficile* en France.

Projet de caractérisation des souches de PCR ribotype 638, clone émergent depuis 2022

Projet de mise au point d'un test rapide de screening des souches de *C. difficile* résistante à la fidaxomicine

Co Direction de thèse de sciences (Adriana BADILLA LOBO) avec le Dr Johanne PELTIER (I2BC UMR 9198 Université Paris-Saclay, Rue Gregor Mendel, Bât 400 - 91405 Orsay) sur « Evaluation de la pertinence d'une famille de riboswitches pour le développement d'agents antimicrobiens ciblant *C. difficile* »

L'incidence de ces infections à *C. difficile* continue à augmenter et cette tendance est accentuée par le vieillissement général de la population. Ce pathogène représente aujourd'hui un réel danger pour la santé humaine et animale. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la pathogenèse et la colonisation de *C. difficile* afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques constitue donc un enjeu majeur. Nous nous intéresserons ici à déterminer si des ARN régulateurs de type riboswitch uniques à *C. difficile* sont impliqués dans le contrôle de la virulence et ont donc un intérêt clinique. Les riboswitches sont en effet des cibles thérapeutiques prometteuses car ils sont contrôlés par de petits métabolites faciles à modifier et qui pourraient fonctionner comme des antibiotiques.

Co direction de thèse de sciences (Anais LEMAIRE) avec le Dr Isabelle POQUET (Institut Micalis, INRAE) sur CloDifEqui 2.0

« Le projet de thèse CloDifEqui 2.0 s'appuie sur les acquis de CloDifEqui et une collaboration élargie au CNR C. *difficile* et à l'équipe UBAPS de l'INRAe-Micalis. Il vise à étudier le rôle des biofilms et du portage asymptomatique dans la persistance de *C. difficile* chez ses hôtes, considérés individuellement ou dans leur ensemble, à l'échelle multi-espèce. Sur la base de l'analyse des résultats de CloDifEqui, et notamment du diagnostic de la virulence ou du portage asymptomatique des souches *in vivo*, le projet de thèse s'articulera en deux volets. Le premier consistera en une analyse globale des génomes des souches après séquençage et de leurs déterminants génétiques de colonisation, formation de biofilms, antibiorésistance, virulence et sporulation. Les génomes seront comparés, d'abord entre eux, pour analyser la circulation des souches et l'épidémiologie des infections chez les équidés, puis avec des génomes de toutes origines, pour évaluer leur potentiel de transmission inter-espèce et zoonotique. Dans le second volet, les souches seront étudiées pour leur capacité à former des biofilms *in vitro* (biomasse, structure, antibiotolérance ou non, production ou non de toxines et de spores). En fonction de l'ensemble des résultats du projet, trois souches seront choisies et leur capacité et leur mode de colonisation seront testés *in vivo* en modèle animal Souris. Au final, la thèse contribuera à évaluer le rôle des biofilms et du portage asymptomatique dans le cycle de *C. difficile*, comme réservoirs pour la persistance des infections dans une perspective intégrée de la santé (« One Health »).

Mise au point et apport du typage CRISPR à l'étude épidémiologique de *C. difficile* (collaboration avec O. SOUTOURINA, I2BC UMR 9198, Université Paris -Saclay)

Clostridiooides difficile est une bactérie anaérobie sporulée qui est la principale cause de diarrhées post-antibiotique et de colite pseudomembraneuse. Pendant le cycle d'infection, *C. difficile* survit dans des communautés intestinales riches en bactériophages, en s'appuyant sur des systèmes de défense pour contrôler les échanges génétiques. Les systèmes d'immunité procaryote adaptative contre les éléments génétiques exogènes ont récemment pris une place centrale parmi divers systèmes de défense bactérienne anti-envahisseur. Par conséquent, le polymorphisme du système CRISPR-Cas a été utilisé comme méthode de typage (appelée « spoligotyping ») pour les principaux agents pathogènes (par exemple *Mycobacterium*, *Salmonella*) mais jamais pour *C. difficile*.

L'objectif principal de ce projet est de développer un nouvel outil de typage pour 1) l'analyse de la diversité des « spacers » CRISPR de *C. difficile* à partir d'isolats cliniques et de selles de patients à des fins épidémiologiques et 2) une évaluation rapide de la sensibilité aux phages des souches de *C. difficile*.

Une étude pilote ciblée sur l'amplification répétée des « spacers » de *C. difficile* a démontré la grande efficacité (> 85%) pour l'évaluation le répertoire des « spacers » CRISPR dans les isolats cliniques et les échantillons de selles des patients. Nos objectifs sont i) d'optimiser les pipelines d'amplification et d'analyse bioinformatique pour obtenir une récupération complète des « spacers » à partir d'échantillons de selles et d'isolats cliniques ii) d'appliquer la méthode à une plus grande collection de souches d'origines différentes afin d'estimer son pouvoir discriminant par rapport à d'autres méthodes de typage tels que cgMLST, wgMLST ou MLVA iii) analyser les souches responsables de récurrences afin d'étudier la microévolution de la souche de *C. difficile* par l'adaptation à son environnement riche en phages.

Les résultats escomptés pourraient être utiles pour le développement de futures applications cliniques, et des approches thérapeutiques personnalisées basées sur les phages.

ANR CLOSTABAT («Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses ») (Dr O. FIRMESSE, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments, 2022-2025)

Ce projet de recherche vise à évaluer la contamination des élevages de bovins, volailles et porcin au moment de l'équarrissage et à comparer les souches d'origine animale aux souches isolées d'infections humaines. Le laboratoire *C. difficile* associé au CNR des anaérobies est responsable du WP4 relatif à la caractérisation génomique des souches de *C. difficile* et *C. perfringens*. Cette ANR fait suite au projet DIFALIBO qui a évalué la prévalence de *C. difficile* dans les aliments impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et dans différents élevages animaux.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » a pour principales missions les expertises et le développement des techniques d'identification, de typage et d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de *C. difficile*, ainsi que la contribution à la surveillance et à l'alerte des infections nosocomiales et des cas groupés d'infections dues à cette bactérie. Le laboratoire associé participe à la rédaction de recommandations concernant les techniques de prélèvements et de diagnostic ainsi que la rédaction des aspects cliniques des infections dues à *C. difficile* en collaboration avec la D.G.S. et Santé Publique France qui en assure la diffusion.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

CNR *Clostridioides difficile*

Hôpital Saint-Antoine
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage
34 rue Crozatier
75012 PARIS

Pr Frédéric Barbut +33 1 49 28 30 11 ou frédéric.barbut@aphp.fr

Dr Jeanne Couturier +33 1 71 97 09 85 ou jeanne.couturier@aphp.fr

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	PU-PH	0,15	AP-HP
Muriel Eh mig	Ingénieur hospitalier	1	SPF
Jeanne Couturier	MCU-PH	0,15	AP-HP
V. Lalande/C. Eckert	PH/MCU-PH	0,25	AP-HP
Lina Ma	Technicienne	1	SPF
Marine Fillion	Ingénieur hospitalier	1	SPF
Réception/secrétariat/gestion		0,27	AP-HP

Personnel médical : 3 (ETP global : 0,7)

Personnel non médical : 4 (ETP global : 3,27)

1.3 Locaux et équipements

Le plan du service est représenté sur la **figure 1**.

Localisation :

Hôpital Saint-Antoine

Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage

34 rue Crozatier

75012 PARIS

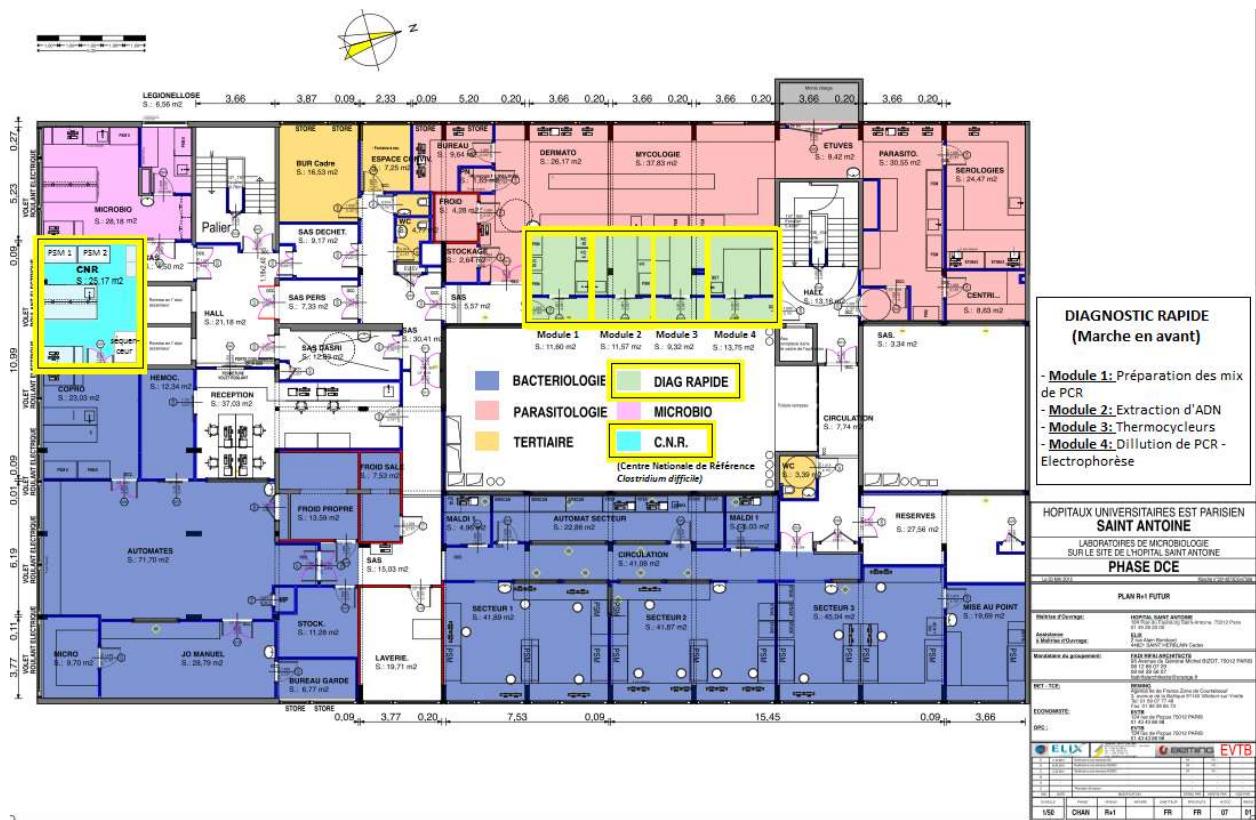


Figure 1 : plan des locaux (encadré en jaune : pièces utilisées par le personnel du CNR)

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

- 1 Centrifugeuse 5430R (Eppendorf)
- 1 Mini Centrifugeuse de paillasse (Extra Gen Bleu)
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)
- 1 Etuve 37°C (Thermo Scientific)
- 2 Balances
- 1 Agitateur magnétique chauffant (Bioblock)
- 5 Cuves électrophorèse BioRad et 4 Cuves Mupid-EX
- 1 Lecteur analyseur d'image (Biorad)
- 2 Hottes PCR (Thermo-copro)
- 2 Hottes Bactériologie (Optimale 12)
- 1 Réfrigérateur-congélateur (Liebherr)
- 3 Réfrigérateurs sous paillasse (Liebherr)

- 2 Congélateurs -20°C (Liebherr)
- 1 Congélateur -20°C sous paillasse (Liebherr)
- 2 Congélateur -80°C (Froilabo)
- 1 Bain-Marie (Julabo)
- 1 Balance de précision (Sartorius)
- 1 Agitateur de microplaques (Labnet)
- 3 Thermocycleurs (1 Applied 9700 + 1 Proflex, 1 Verity)
- 2 Becs chauffant
- 5 Vortex
- 2 Bain-sec chauffant
- 1 Bain-sec (thermomix Bioer)
- 1 Microscope
- 1 Electrophorèse champs pulsé (Gene Path, BioRad)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)
- 1 logiciel GenMapper
- 1 séquenceur ABI3500
- 1 spectrophotomètre 600nm (Biochrom)
- 3 Pipettes Multicanaux (Dutscher)
- 1 McFarland

1.4 Collections de matériel biologique

Toute souche de *C. difficile* reçue au laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » ainsi que les souches de référence sont conservées en milieu glycérolé à -80°C en deux exemplaires. L'ADN des souches est conservé à -20°C.

Une collection de souches de *C. difficile* correspondant aux PCR-ribotypes les plus fréquents en France est disponible (données de l'enquête ICD-RAISIN 2009 et du volet bactériologique de l'étude LuCID 2014). Chaque souche est caractérisée par son toxinotype (souches de l'étude ICD-RAISIN), la nature de la délétion dans le gène *tcdC*, la présence ou non de la toxine binaire et sa sensibilité aux antibiotiques. La mise à disposition des souches est limitée aux établissements publics, privés et d'enseignement disposant d'un laboratoire de bactériologie, sous condition, notamment de présentation d'un projet scientifique et de signature d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA Material transfert agreement). Selon la nature du demandeur (industriel ou académique), ces accords donneront lieu à une compensation financière

Une collection européenne de souches de référence de *C. difficile* est disponible auprès de l'ECDC (Dr Ed Kuijper, Department of Medical Microbiology, Centre for Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands, e.j.kuijper@lumc.nl).

1.5 Démarche qualité du laboratoire

- Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au DMU BioGeM (APHP Sorbonne Université) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 (site cofrac, N° accréditation 8-2542)

- Un **contrôle externe de qualité** a été réalisé en 2023 pour la 9^{ème} année consécutive, en **collaboration avec le Centre National de référence en Belgique** (Kate Soumillon). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridioides difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire), le MLVA et la sensibilité à la moxifloxacine ont également été incluses dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité 2023 a permis de mettre en évidence une **bonne concordance** entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et nos méthodes.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Les techniques de référence disponibles pour la caractérisation des souches de *C. difficile* sont :

- la détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, tétracycline, vancomycine)
- la détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée)
- la détection par PCR des fragments A3 du gène *tcdA* et B1 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B
- la détection par PCR des fragments A1 et A2 du gène *tcdA* et B2 et B3 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B, notamment pour la détermination de certains toxinotypes
- la détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes de restriction.
- la mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : les différents types de délétion du gène *tcdC* existants (18 pb, 39 ou 36 pb et 54 pb) sont déterminés après amplification puis séparation par électrophorèse capillaire et comparaison à des souches témoins
- la détection simultanée de 7 cibles : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvé chez les souches non toxinogènes, par PCR multiplex et détection par électrophorèse capillaire
- le typage par PCR-ribotyping qui est actuellement la technique de référence en Europe permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de comparer les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés. La comparaison des profils de migration obtenus par électrophorèse capillaire se fait par rapport à la base de données WEBRIBO.
- l'amplification de l'ARN 16S, l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) et la spectrométrie de masse (Maldi-TOF, Brücker) permettant l'identification de *C. difficile*
- l'amplification d'une séquence de 115 pb qui remplace le PaLoc chez les souches non toxinogènes, permettant de confirmer l'absence des gènes *tcdA* et *tcdB* (PCR lok1-lok3).
- le typage des souches par MLVA (Multilocus Variable-number tandem repeat Analysis) et MLST (MultiLocus Sequence Typing)
- le WGS et analyses des génomes par les méthodes du cg MLST, wgMLST et cgSNP

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

Cf PDF Annexe_3_lab0_associe