



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Bactéries anaérobies et botulisme

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Institut Pasteur	Dr Christelle MAZUET
Laboratoire Associé	<i>Clostridioides difficile</i> (Saint-Antoine, APHP)	Pr Frédéric BARBUT

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	6
Executive summary	7

Livre 1

Centre National de Référence

Bactéries anaérobies et botulisme

1.	Missions et organisation du CNR	9
	Organigramme	9
	Mission et Organisation	9
	Démarche Qualité	9
2.	Activités d'expertise	11
	2.1 Evolution des techniques	11
	2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	11
	2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	11
	2.4 Collections de matériel biologique	11
	2.5 Activités d'expertises	12
	2.6 Activités de séquençage	13
	2.7 Partage de séquences produites par les CNR	15
3.	Activités de surveillance	16
	3.1 Description du réseau de partenaires	16
	3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	16
	3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux (hormis <i>Clostridoides difficile</i>)	24
	3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	27
	3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	27
4.	Alertes	28
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 ...)	29
6.	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	30
	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	30
	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
9.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	35

9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	35
9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	35
9.3 Locaux et équipements	35
9.4 Collections de matériel biologique	37
9.5 Démarche qualité du laboratoire	38
10. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	39
10.1 Liste des techniques de référence	39
10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	40
11. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	41

Livre 2
Laboratoire associé
Clostridioides difficile

12. Missions et organisation du CNR	43
Organigramme	43
Mission et Organisation	43
Démarche Qualité	43
13. Activités d'expertise	45
13.1 Evolution des techniques	45
13.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	45
13.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	45
13.4 Collections de matériel biologique	45
13.5 Activités d'expertises	46
13.6 Activités de séquençage	46
13.7 Partage de séquences produites par les CNR	48
14. Activités de surveillance	49
14.1 Description du réseau de partenaires	49
14.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	50
14.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	56
14.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	58
14.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	58
15. Alertes	60
16. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	61
16.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	61
16.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	63
16.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	63
17. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	64
17.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	64
17.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	68

18.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	71
19.	Programme d'activité pour les années suivantes	73
20.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	77
	20.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	77
	20.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	77
	20.3 Locaux et équipements	78
	20.4 Collections de matériel biologique	79
	20.5 Démarche qualité du laboratoire	79
21.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	81
	21.1 Liste des techniques de référence	81
	21.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	81
22.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	82

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

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

1) En 2022, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 153 échantillons de sérum et 111 selles. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année reste classique : 6 foyers en France (et un en Suisse) de botulisme alimentaire impliquant 13 patients sur le territoire (et deux en Suisse) ont été identifiés. Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente avec 4 foyers sur 6 dont la source est confirmée biologiquement en France. De plus, trois foyers (3 cas) de botulisme infantile ont également été identifiés.

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (1 foyer de type B, 2 foyers de types A, 2 foyers de types Bnp et 1 foyer de type Bf) (et un type B en Suisse). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour quatre foyers uniquement.

2) En 2022, 151 souches ou prélèvements primaires pour recherche de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR. Les 137 souches d'origine humaine identifiées se répartissent en 17 genres différents.

Bien que les bactéries anaérobies restent en général sensibles aux traitements antibiotiques, le suivi de l'évolution de la résistance effectué par le CNR confirme que certaines espèces (particulièrement les *Bacteroides* du groupe *fragilis*) sont de plus en plus résistantes notamment aux bêta-lactamines incluant les carbapénèmes.

3) *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 2022, 485 prélèvements ont été reçus par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 403 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxigène ; 4% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les trois autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 14/020 (14%), le 106 (8,2%) et le 002 (6,3%). L'année 2022 a été marquée par un regain d'activités (+81,5%, probablement lié à la fin de la crise du COVID-19), un faible nombre d'isollements de souches 027 épidémiques (n=7) et une émergence du RT 638 qui s'est confirmée au début de l'année 2023.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

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

1) In 2022, the CNR proceeded to the biological diagnosis of human botulism from 153 serum and 111 stools. The number of outbreaks and cases of botulism observed in France this year remains classic: 6 confirmed outbreaks of botulism (and one in Switzerland) involving 13 patients (and two in Switzerland) have been identified. Food-born botulism remains the most common form (4 out of 6 confirmed outbreaks). In addition, three outbreaks (3 cases) of infant botulism have also been identified.

As usual in France, most of the food-born outbreaks were of type B (1 type B, 2 types A, 2 types Bnp and 1 type Bnf outbreaks) (and 1 type B in Switzerland). The contaminated food could be confirmed for only four outbreaks.

2) In 2022, 151 strains or primary samples for testing for anaerobic bacteria were recorded by the NRC. The 137 strains of human origin identified fall into 17 different genera.

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

3) *Clostridioides difficile* is the major cause of healthcare-associated diarrhoea. 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 2022, 485 samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 403 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 4% were identified as PCR-ribotype 027. The three other predominant PCR-ribotypes were 14/020 (14%), 106 (8.2%) and 002 (6.3%). This year was marked by an increase of the number of *C. difficile* isolates received (81.5%, likely associated to the end of COVID-19 pandemic), a low number of the epidemic 027 strains (n=7) and the emergence of a new RT 638 which was confirmed in early 2023.

LIVRE 1

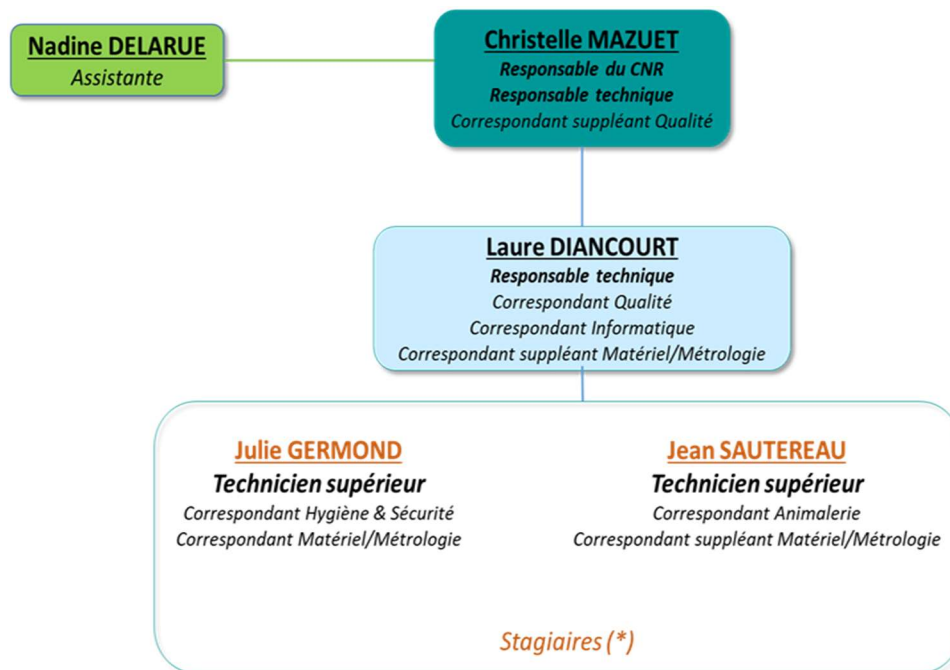
Centre National de Référence

Bactéries anaérobies et botulisme



1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



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 dans l'organisation du CNR.

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 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>).

L'ensemble des CNR participent 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.

En l'absence de tests d'aptitude inter-laboratoires pour la détection de *Clostridium botulinum*, l'Institut belge de la santé, Sciensano, Wageningen Bioveterinary Research (WBRI) et l'Institut Pasteur (CNR Bactéries anaérobies et Botulisme) s'échangent annuellement un ensemble d'échantillons pour évaluer la capacité des trois laboratoires à détecter et identifier *C. botulinum*. En 2022, l'institut belge de la santé n'a pas été en mesure de participer à cet échange mais le LNR du botulisme aviaire (ANSES de Ploufragan) a participé à ce programme.

Les résultats obtenus pour les 5 échantillons artificiellement contaminés par de la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type A et F étaient tous conformes.

L'expérience est renouvelée chaque année avec un tour de rôle de chaque institut pour l'organisation du test. Il est important de noter 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 mettre en place et à réaliser.

L'année qualité 2022 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Audit de renouvellement	27 – 29 juin et du 6-8 juillet 2022
Revue qualité 2022	31 mars 2023
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	Prévue le 04 juillet 2023
Audits internes qualité et technique	10 novembre 2022 et 09 février 2023

Le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en juillet 2022 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Ci-dessous sont détaillées les perspectives 2023 :

Etapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Revue qualité	Début 2024
Audits internes qualité et technique	Septembre-décembre 2023
Revue de direction LREMS	Juillet 2023
Audit de surveillance COFRAC	Fin 2023

La liste des techniques accréditées du CNR est disponible en **annexe 2**.

2. Activités d'expertise

Éléments clefs de l'année 2022 en termes de production d'expertise

670 prélèvements reçus au total pour recherche de toxine botulique ou de *Clostridium botulinum* :

- Nombre classique de foyers/cas de botulisme humain

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

- 20 cas de botulisme animal

151 prélèvements ou souches d'origine humaine reçues en 2022 pour identification bactérienne +/- test de sensibilité aux antibiotiques

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

2.1 Evolution des techniques

Sans objet

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Sans objet

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

2.4 Collections de matériel biologique

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 en 2022 sont donnés dans le tableau suivant :

Origine	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
Humaine	125 (151)
Vétérinaire	4 (7)
Alimentaire	13 (24)
Environnement	2
Autres	2
TOTAL	136 (186)

Soit un nombre équivalent de souches isolées envoyées par les laboratoires de biologie médicale par rapport aux années précédentes.

➤ Activités d'expertise pour le botulisme

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2022 est le suivant :

Botulisme humain		
	sérums (recherche de toxine botulique)	153
	selles (recherche de toxine botulique et de <i>Clostridium botulinum</i>)	111
	sérums (recherche d'anticorps neutralisants les toxines botuliques)	6
Echantillons agro-alimentaires		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	26
	autres	131
Echantillons environnementaux		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	0
	autres	95
Botulisme animal		
	échantillons biologiques	82
Echantillons d'aliment pour animaux		
	échantillons	61
Essais Inter Laboratoires		5
TOTAL		670

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.

En 2022, le CNR a ainsi séquençé le génome complet de la totalité des souches de bactéries anaérobies non-MOT reçues ou isolées, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (ie séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie). L'objectif de séquencer l'intégralité des souches de bactéries anaérobies reçues au CNR a donc été atteint cette année. Les délais d'obtention et d'analyse des séquences ne sont cependant pas toujours compatibles avec les besoins des cliniciens si bien que nous continuons de recourir régulièrement aux techniques de PCR classiques pour l'identification et le toxinotypage.

Cas particulier du séquençage des Microorganismes et Toxines (MOT) :

Clostridium botulinum, étant classé dans la liste I des MOT soumis à réglementation, le séquençage de son génome ne peut être réalisé que sur une plate-forme dont les locaux, l'activité sur le MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. 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 par l'ANSM. Les génomes de *Clostridium botulinum* ont été séquençés 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	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<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-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNRs, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses

des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNRs et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié.

Le CNR utilise la suite CLC Genomics Workbench et le logiciel BioNumerics v7.6 pour l'analyse des séquences et la recherche des gènes d'intérêt. Des outils maison sont également utilisés pour réaliser certaines recherches (récupération des gènes codant pour les ARN 16S, 5S et 23S ; 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	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<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.

En 2022, 27 souches de *Clostridium botulinum* (12 isolées en 2018, 18 en 2019, 7 en 2020 et 17 en 2021) ont ainsi pu être séquencées par le PGP de la CIBU.

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

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)
<p>Le CNR séquence de manière systématique les souches envoyées ou isolées. Ces données viennent en complément d'autres techniques pour l'identification, le toxinotypage et la recherche des mécanismes de résistance de ces souches.</p> <p>Les analyses bio-informatiques réalisées sur ces génomes sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la recherche des gènes codant pour les toxines via des logiciels maison - la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques (ResFinder) - Analyse phylogénétique via BioNumerics ou via JolyTree.

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

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :
Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année :
Aucune sélection : toutes les souches reçues ou isolées au CNR sont séquencées.

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

Dans les bases de données fermées : répertoire sécurisé géré par la DSI de l'Institut Pasteur.

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

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

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

3. Activités de surveillance

Éléments clefs de l'année 2022 en termes de surveillance

670 prélèvements reçus au total pour recherche de toxine botulique ou de *Clostridium botulinum* :

- Nombre classique de foyers/cas de botulisme humain

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

- 20 cas de botulisme animal

151 prélèvements ou souches d'origine humaine reçues en 2022 pour identification bactérienne +/- test de sensibilité aux antibiotiques

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.

➤ Réseau de partenaires pour le botulisme

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

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

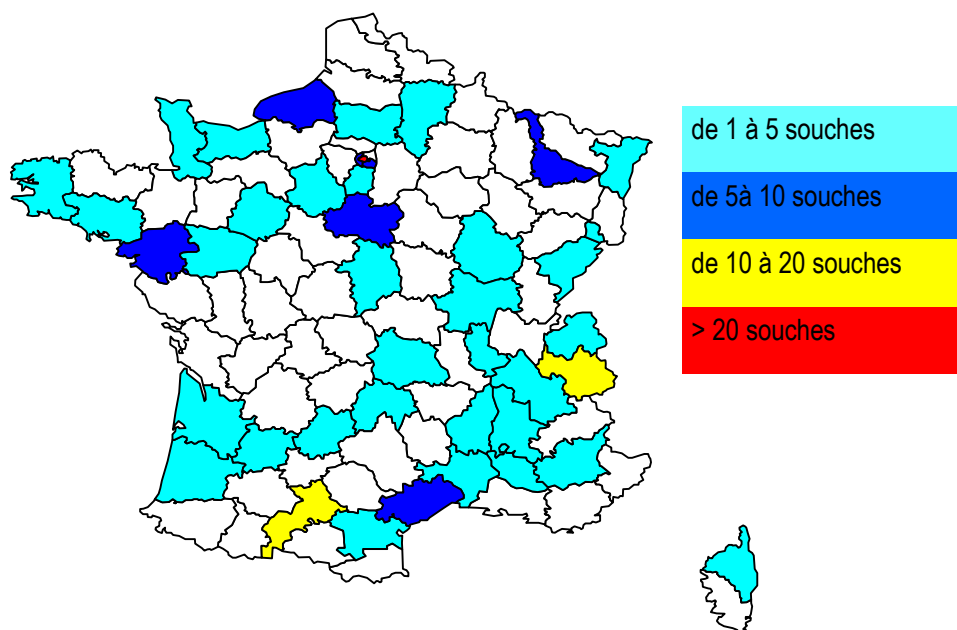
Lors d'alerte de botulisme, le bureau "alerte" de la DGS et la DGAL coordonnent des conférences téléphoniques entre les principaux partenaires (hospitaliers, Santé publique France, ARS, Services vétérinaires, ANSES, ANSM, ...) y compris le CNR qui participe activement à la gestion de la situation. Il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

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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

- Souches d'origine humaine

L'origine géographique des demandes d'identification de souches d'origine humaine parvenues au CNR en 2022 est présentée ci-dessous.



Quarante-trois départements métropolitains ont envoyé 151 souches isolées ou prélèvements primaires d'origine humaine au CNR. Les départements ultra-marins envoient également des souches régulièrement pour identification, toxinotypage ou antibiogramme (4 souches envoyées par les DROM et COM).

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

	Hommes	Femmes	Total
N	63	61	124
Sexe ratio H/F			1,033
Age (ans)			
Moyenne	59	57	58
Médiane	62	62	62
Intervalle	7 -> 95	3 -> 96	3 -> 96

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

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

LOCALISATION	FREQUENCE
Appareil digestif	3
Coproculture	23
Hémoculture	34
Infections cutanées et musculaires	2
infections intra-abdominales	2
infections osseuses	8
Infections ostéo-articulaires	6
Infections péri-rectales et périnéales	4

Infections pleuro-pulmonaires	1
Infections post-opératoires	4
Plaie	3
Urologie/néphrologie	1
Non précisé	33
Total	124

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement d'hémoculture (34), de coprocultures (23) et d'infections osseuses ou ostéo-articulaires (15).

Le CNR a isolé 13 souches de *Clostridium botulinum* en 2022. Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté avec 67/137 (124+13) souches soit 48.9% suivi du genre *Bacteroides* (35/137=25.54%)

Au total les 137 souches identifiées se sont réparties en 17 genres différents de bactéries anaérobies.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le tableau suivant :

Genre	Nombre (Espèce)
<i>Actinotignum</i>	1 (<i>schaalii</i>)
<i>Bacillus</i>	5 (<i>cereus</i>)
<i>Bacteroides</i>	35 (<i>fragilis</i> (16), <i>intestinalis</i> (1), <i>ovatus</i> (1), <i>thetaiotaomicron</i> (12), <i>uniformis</i> (2), <i>vulgatus</i> (3))
<i>Christensenella</i>	1 (<i>hongkongensis</i>)
<i>Citrobacter</i>	1 (<i>murlinae</i>)
<i>Clostridium</i>	67 (<i>argentinense</i> (3), <i>baratii</i> (1), <i>botulinum</i> (14), <i>innocuum</i> (1), <i>perfringens</i> (40), <i>septicum</i> (2), <i>sporogenes</i> (3), <i>tetani</i> (3))
<i>Cutibacterium</i>	3 (<i>acnes</i>)
<i>Erysipelatoclostridium</i>	1 (<i>ramosum</i>)
<i>Finnegoldia</i>	3 (<i>magna</i>)
<i>Fusobacterium</i>	2 (<i>Nucleatum</i>)
<i>Gemella</i>	1 (<i>Morbilorum</i>)
<i>Peptostreptococcus</i>	1 (<i>Anaerobius</i>)
<i>Phocaeicola</i>	1 (<i>Massiliensis</i>)
<i>Prevotella</i>	5 (<i>bivia</i>)
<i>Sutterella</i>	1 (<i>Wadsworthensis</i>)
<i>Tannerella</i>	1 (<i>Forsythia</i>)
<i>Veillonella</i>	8 (<i>atypica</i> (3), <i>nakazawae</i> (1), <i>parvula</i> (4))

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

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

○ Souches d'origine vétérinaire

Les 7 prélèvements d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font partie des espèces suivantes :

Espèce	Nombre
<i>Clostridium chauvoei</i>	5
<i>Clostridium perfringens</i>	2
TOTAL	7

De plus, le CNR a isolé, à partir de prélèvements vétérinaires envoyés pour recherche de botulisme, huit souches des espèces suivantes :

Espèce	Nombre
<i>Clostridium botulinum</i> de type C/D	3
<i>Clostridium botulinum</i> de type D/C	3
<i>Clostridium haemolyticum</i>	2
TOTAL	8

- Souches d'origine alimentaire

En 2022, les 20 souches anaérobies strictes d'origine alimentaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font partie des espèces suivantes :

Espèce	Nombre
<i>Bacillus cereus</i>	6
<i>Clostridium botulinum</i> type A	4
<i>Clostridium botulinum</i> type B	1
<i>Clostridium botulinum</i> type Bf	1
<i>Clostridium novyi</i> B	1
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	4
<i>Clostridium tepidum</i>	1
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	1
TOTAL	20

➤ **Surveillance du botulisme**

- Botulisme humain

En 2022, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 153 échantillons de sérum, 111 selles. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 6 foyers confirmés en France (et un en Suisse) de botulisme impliquant 13 patients (et deux en Suisse) ont été identifiés.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente.

Trois foyers (3 cas) de botulisme infantile (3 types B) ont également été identifiés.

Un bilan du nombre de foyers et cas des 12 dernières années est synthétisé dans le tableau ci-dessous :

Année	Foyers (cas) déclarés
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)
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (1 foyer de type B, 2 foyers de types A, 2 foyers de types Bnp et 1 foyer de type Bf) (et un type B en Suisse). L'aliment contaminé a pu être confirmé pour quatre foyers uniquement.

Description détaillée des foyers :

- un foyer (un cas confirmé et un cas suspect) en Suisse pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans le sérum d'une patiente (quantité estimée à 1 DL/mL) suite à l'apparition de troubles de l'accommodation, xérostomie, xérophtalmie, difficultés de déglutition et constipation après une période diarrhéiques. La patiente n'a pas été admise en réanimation et n'a pas bénéficié d'assistance respiratoire. La recherche de toxine botulique et de *Clostridium botulinum* dans les selles n'a pas été réalisée devant l'absence d'échantillon de selles. La sœur de la patiente a également présenté une xérostomie mais n'a pas été prélevée. Nous n'avons pas reçu d'échantillons alimentaires pour ce cas dans le cadre de l'enquête alimentaire dont la source reste non documentée (une préparation familiale suspectée).
- un foyer (un cas confirmé) lié à la consommation de restes de tajine de bœuf contenant une quantité très élevée de toxine botulique (400 000 DL/g). La présence de toxine botulique de type A (à 20 DL/mL) et de *Clostridium botulinum* a été confirmée à partir de 2 échantillons de selles du patient présentant une diplopie, des troubles bulbaires et une insuffisance respiratoire, nécessitant une hospitalisation en réanimation et une assistance respiratoire. La recherche de toxines botuliques sur sérum était négative sur plusieurs échantillons. Les souches de *Clostridium botulinum* ont pu être isolées à partir des 2 échantillons de selles ainsi que du tajine impliqué.
- un foyer (un cas confirmé) pour lequel la présence de toxine botulique de type A a été mise en évidence dans un prélèvement de sérum de la patiente, et la présence de *Clostridium botulinum* a été mise en évidence dans les selles de la patiente. La patiente a présenté une dysphagie et une tétraparésie avec un flou visuel et des troubles respiratoires nécessitant une hospitalisation en réanimation et une assistance ventilatoire. La présence de *Clostridium botulinum* a été mise en évidence dans plusieurs aliments, notamment des barquettes de tajine, du bœuf bourguignon et du rôti, tous récupérés dans la poubelle au domicile du patient. Les souches ont pu être isolées à partir des selles et des trois aliments.
- un foyer (deux cas confirmés et deux cas probables) confirmé par la présence de *Clostridium botulinum* de type Bnp dans les selles de deux patients confirmés, et une faible quantité de toxine botulique (10 DL/g et 20 DL/g). Les 4 patients ont développé des symptômes type nausées, diarrhéiques, flous visuels, difficultés de déglutition, d'élocution, sécheresse de la bouche, asthénie (au moins un couple, leur petite fille de 4 ans et la grand-mère). Ces premiers symptômes n'ont pas conduit a priori à une consultation médicale à ce moment-

là. Les prélèvements ont été reçus après que le couple ait de nouveau consommé le même jambon et développé à nouveau des symptômes de botulisme. Les patients n'ont pas nécessité d'hospitalisation. Le jambon a été jeté sur recommandation du médecin donc absence de source alimentaire identifiée. 2 souches ont pu être isolées à partir des selles.

un foyer (quatre cas confirmées et un cas probable) confirmé par la mise en évidence de *Clostridium botulinum* de type Bnp et de toxine botulique dans du jambon (10 000 DL/g) envoyé par l'hôpital devant une forte suspicion d'intoxication dans une famille. La toxine botulique de type B a ensuite été mise en évidence en faible quantité dans le sérum de 4 membres de la famille ayant partagé le repas. La souche a pu être isolée du jambon.

un foyer (un cas confirmé) par la mise en évidence de toxine botulique et de *Clostridium botulinum* de type Bf dans un prélèvement alimentaire (ail des ours) et secondairement dans le prélèvement de selles du patient, qui a dû être hospitalisé en réanimation et placé sous assistance ventilatoire. Les souches ont pu être isolées de l'aliment suspect et des selles du patient.

un foyer (un cas confirmé) par la mise en évidence de *Clostridium botulinum* de type B dans plusieurs prélèvements de selles d'un patient hospitalisé en réanimation et sous assistance ventilatoire. Aucun prélèvement alimentaire n'a été reçu pour l'enquête. 3 souches ont pu être isolées des 3 prélèvements de selles positifs du patient.

Concernant le botulisme infantile :

- un cas de botulisme infantile a concerné un petit garçon colonisé à *Clostridium botulinum* de type B (avec présence de toxine préformée à 2000 DL/g) présentant une absence de réveil et de mouvements nécessitant une intubation et une hospitalisation en service de réanimation pédiatrique. Il n'a pas été retrouvé de *Clostridium botulinum* dans le pot de miel suspect d'être impliqué. La souche a pu être isolée à partir du prélèvement de selles positif.
- Le deuxième cas de botulisme infantile a concerné une petite fille de 26 jours hospitalisée en réanimation pédiatrique pour une hypotonie globale et colonisée également à *Clostridium botulinum* de type B (détection de toxine préformée négative). L'évolution a été favorable. La souche a pu être isolée à partir du prélèvement de selles positif.
- Le dernier cas de botulisme infantile en 2023 concerne une petite fille colonisée également à *Clostridium botulinum* de type B (avec présence de toxine préformée supérieure à 10 000 DL/mL). Cet enfant était strictement allaité par sa mère et a présenté une hypotonie axiale et une diminution des apports alimentaires nécessitant une hospitalisation. Deux souches ont pu être isolées à partir des deux prélèvements de selles positifs.

Nombre de foyers et de cas de botulisme humain
Période du 01/01/2022 au 31/12/2022

MOIS	N° DOSSIER	PRELEVEMENT	FOYER	Nombre de cas	Autres prélèvements biologiques	Aliment suspect / Source potentielle contamination	Souches isolées
Février	2022/00084	Ecouvillon rectal (> 4DL/mL)	PARIS Botulisme infantile Type B	1	2022/00085 : Selles 2000 DL/g 2022/00086 : sérum (négatif) 2022/00107 : selles 4000 DL/g 2022/00124 : sérum (négatif)	2023/00099 : Miel (négatif) DDS : 27/01/2022 Asthénie	<i>Clostridium botulinum</i> type B 2022/00092 (isolé de 2022/00084)
	2022/00116	Sérum 10DL/mL	SUISSE Botulisme alimentaire Type B	2	NA	DDS : 06/02/2022 Troubles d'accommodation - xérostomie	NA
	2022/00123	Sérum	PARIS Botulisme alimentaire Type A	1	2022/00130 : sérum 2022/00141 : selles 2022/00149 : sérum 2022/00171 : sérum 2022/00172 : selles 2022/00173 : selles 2022/00178 : selles 2022/00191 : sérum 2022/00193 : selles	2022/00155 : conserve choucroute 2022/00156 : conserve cassoulet 2022/00157 : conserve cassoulet 2022/00158 : conserve saucisses lentilles 2022/00159 : Plat poulet coco 2022/00181 : Reste tajine de bœuf 400000 DL/g	<i>Clostridium botulinum</i> type A 2022/00145 (isolé de 2022/00141) 2022/00184 (isolé de 2022/00172) 2022/00200 (isolé de 2022/00181)
Avril	2022/00227	Ecouvillon rectal	BORDEAUX Botulisme infantile Type B	1	2022/00245 : selles 2022/00304 : selles	DDS : 08/04/2022 Hypotonie globale	<i>Clostridium botulinum</i> type B 2022/00244 (isolé de 2022/00227)
Mai	2022/00286	Sérum	SURESNES Botulisme alimentaire Type A	1	2022/00287 : selles	2022/00288 : tajine 2022/00289 : beauf bourguignon 2022/00290 : rôti de porc alerte Fleury Michon : 2022/00306 jusqu'à 2022/00318	<i>Clostridium botulinum</i> type A 2022/00292 (isolé de 2022/00287) 2022/00293 (isolé de 2022/00288) 2022/00294 (isolé de 2022/00289) 2022/00295 (isolé de 2022/00290)

Juin	2022/00366 2022/00369	Selles 10 DL/g selles 20 DL/g	LANDES Botulisme alimentaire Type Bnp	4	NA	Développements de symptômes type nausées, diarrhées, flous visuels, difficultés de déglutition, d'élocution, sécheresse de la bouche, asthénie pour plusieurs convives (au moins le couple, leur petite fille de 4 ans et la grand-mère). Le 14/06/22, le jeune couple a de nouveau consommé ce même jambon et développé à nouveau des symptômes de botulisme. Ils ont cette fois consulté leur médecin traitant. Le jambon a été jeté sur recommandation du médecin.	<i>Clostridium botulinum</i> type Bnp 2022/00435 (isolé de 2022/00366) 2022/00436 (isolé de 2022/00369)
Aout	2022/00496	Jambon 10 000 DL/g	LIMOGES Botulisme alimentaire Type Bnp	5	2022/00498 : sérum 2022/00499 : selles 2022/00500 : sérum 2022/00506 : sérum 1DL/mL 2022/00529 : selles	DDS : 14/08/2022 Repas contaminant le 12/08	<i>Clostridium botulinum</i> type Bnp 2022/00528 (isolé de 2022/00496)
	2022/00502	Ail des ours <20DL/g	METZ Botulisme alimentaire Type Bf	1	2022/00509 : selles 20DL/g	DDS : 18/08/2022	<i>Clostridium botulinum</i> type B5f2 2022/00540 (isolé de 2022/00502) 2022/00541 (isolé de 2022/00509)
Novembre	2022/00713	Selles (>10 000DL/mL)	RODEZ Botulisme infantile Type B	1	2022/00714 : écouvillon rectal 2022/00717 : écouvillon rectal 2022/00790 : selles	DDS : 14/11/2022 hypotonie axiale	<i>Clostridium botulinum</i> type B2 2022/00745 (isolé de 2022/00713) 2023/00004 (isolé de 2022/00790)
	2022/00725	Selles	THONON LES BAINS Botulisme alimentaire Type B	1	2022/00718 : sérum 2022/00723 : sérum 2022/00728 : sérum 2022/00729 : selles 2022/00747 : sérum 2022/00748 : selles (10 DL/mL) 2022/00774 : selles	DDS : 30/10/2022. Clinique très compliquée. Initialement pris en charge pour pneumopathie puis sepsis à Klebsielle.	<i>Clostridium botulinum</i> type B2 2022/00746 (isolé de 2022/00725) 2023/00759 (isolé de 2022/00729) 2023/00760 (isolé de 2022/00774)

Concernant la recherche et le titrage d'anticorps anti-toxine botulique A :

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

6 échantillons de sérum ont été analysés en 2022 ; seulement un était neutralisant de la toxine botulique de type A de type A1.

- Botulisme animal

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

En 2022, le CNR a reçu 96 prélèvements d'origine vétérinaire (contenus intestinaux, foies, sérums) dont vingt se sont révélés positifs.

- Botulisme agroalimentaire et environnemental

En dehors des échantillons d'aliments qui nous sont adressés dans le cadre de foyers avérés ou suspects de botulisme humain par les agents chargés des enquêtes d'hygiène alimentaire pour le compte des Agences Régionales de Santé et Directions Départementales de la Protection des Populations ou parfois sur réquisition de la Préfecture de Police ou du Tribunal lors d'enquête judiciaire, nous recevons des échantillons alimentaires ou environnementaux de la part d'industriels pour des contrôles de fabrication ou d'enquêtes sur le botulisme animal.

En 2022, le CNR a ainsi reçu 180 prélèvements d'origine alimentaire et 96 prélèvements environnementaux pour expertise. Six prélèvements alimentaires se sont révélés positifs et sont impliqués dans les cas de botulisme humain précédemment décrits. Huit prélèvements environnementaux ont été diagnostiqués positifs, 7 de ces 8 prélèvements proviennent d'échantillons récoltés sur le lac du Der (51) où une étude en collaboration avec le LNR du botulisme aviaire de Ploufragan est en cours pour évaluer la distribution de *Clostridium botulinum* dans ce lieu.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux (hormis *Clostridoides difficile*)

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

En 2022, le CNR a donc réalisé 119 antibiogrammes avec pour chaque souche les données de séquençage des génomes associés.

Sur les 119 souches testées, 113 souches sont d'origine humaine (dont 12 souches de *C. botulinum*), 1 souche d'origine vétérinaire et 4 d'origine alimentaire (dont 3 souches de *C. botulinum*). Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Les données d'antibiorésistance sont décrites ci-dessous :

- Métronidazole

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

Sur les 119 souches testées, 31 sont résistantes au métronidazole dont 14 souches du genre *Bacteroides*, toutes porteuses d'un gène *nim*, 5 souches du genre *Prevotella* sans présence de gène type *nim*. Une souche de *Clostridium botulinum* de type A est porteuse du gène *nimA*.

- Amoxicilline et Amoxicilline - clavulanate

Les résistances à l'amoxicilline sont observées essentiellement chez les bactéries anaérobies à Gram -, notamment du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. Le CA-SFM a d'ailleurs supprimé cet antibiotique pour les bactéries de ce genre. Effectivement sur 43 souches résistantes à l'amoxicilline, le genre *Bacteroides* représente 80% des souches.

Une souche de *Clostridium botulinum* de type A est résistante à l'amoxicilline et est porteuse du gène *bla_{CBP}*.

Vingt souches sont résistantes à l'association amoxicilline + acide clavulanique dont 18 souches appartenant aux genres *Bacteroides/Phocaeicola*.

- Pipéracilline - tazobactam

La résistance à la Pipéracilline associée au tazobactam a été observée sur 20 souches uniquement des genre *Bacteroides* (14 souches) et *Veillonella* (6 souches).

- Imipénème

Neuf souches étaient résistantes à l'imipénème, toutes du genre *Bacteroides*. Sept souches sont porteuses d'un gène *cfiA* qui code pour une carbapénémase active sur cet antibiotique et une souche est porteuse du gène *bla_{OXA-347}*.

Pour la dernière souche, la recherche d'autres gènes de résistance via ResFinder n'a renvoyé aucun résultat.

- Clindamycine

La résistance à la clindamycine a été observée pour 29 souches sur les 119 testées. 22 souches appartiennent au genre *Bacteroides* soit 75% des souches. Ce chiffre est comparable aux années précédentes.

La présence d'un gène de la famille *erm* est détectée dans 72% des souches dont 18 des 22 souches du genre *Bacteroides*.

Une souche de *Clostridium perfringens* est résistante à la clindamycine et possède le gène *erm(T)*.

- Rifampicine

En 2022, 5 souches sont résistantes contre 4 en 2020. Sur ces 5 souches, une souche d'*Erysipelatoclostridium ramosum* (ancien *Clostridium ramosum*) est naturellement résistante à la rifampicine et les deux souches de *Clostridium septicum* reçus en 2022 sont également résistantes.

- Moxifloxacin (Fluoroquinolone 3^{ème} génération)

Parmi les 19 souches résistantes à la moxifloxacin, les deux souches de bactéries anaérobies Gram + sont de l'espèce *Fingoldia magna* (ancien *Peptostreptococcus magnus*), toutes les autres sont des Gram – dont 13 du genre *Bacteroides* et 3 du genre *Prevotella*.

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

Pour le genre *Bacteroides*, deux mutations sont décrites : S82F et F86L. Sur 2022, 8 souches sur les 13 possèdent la mutation S82F.

- Vancomycine

Selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, la résistance à la vancomycine est recherchée uniquement pour les Gram +. Cette dernière a été observée pour aucune souche en 2022.

- Chloramphénicol

En 2022, aucune souche n'était résistante au chloramphénicol.

- Linézolide

Le linézolide est un antibiotique actif sur les bactéries anaérobies, qu'elles soient à Gram + ou à Gram –.

Les mécanismes conférant une résistance au linézolide comprennent des mutations ponctuelles du gène de l'ARNr 23S, la méthylation de l'ARNr 23S par une méthyl transférase codée par le gène *cfr* ou des modifications d'acides aminés dans la protéine L4 de la sous-unité ribosomale 50S.

La résistance au linézolide a été observée sur 2 souches : une souche de *Clostridium perfringens* et une souche de *Phocaeicola massiliensis* sans détection du gène *cfr*.

- Tigécycline

Cinq souches ont été testées résistantes : 3 souches de *Bacteroides fragilis*, 1 souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* et une souche de *Veillonella atypica*.

L'association du gène *tetQ* codant pour la « tetracyclin resistance protein » TetQ et du gène *ermF* codant pour la rRNA adénine N-6-méthyltransférase est trouvée dans 3 souches.

- Ertapénème

Les treize souches résistantes à l'ertapénème sont toutes du genre *Bacteroides*. La présence du gène *cfiA* est confirmée pour 8 souches (62%), une modification des pompes à efflux peut expliquer cette résistance.

En conclusion, le CNR confirme en 2022, comme les autres années, que le genre *Bacteroides* représentent la plus grande partie des souches résistantes aux antibiotiques.

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. Des études communes présentant la situation du botulisme en France sont régulièrement publiées dans le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH).

Contribution aux réseaux de surveillance européens et international :

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

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

3.5 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.

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

Le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme a mis à disposition des numéros de téléphone (01 45 68 84 56 / 01 45 68 83 10), des adresses email (christelle.mazuet@pasteur.fr, laure.diancourt@pasteur.fr et cnranaerobies@pasteur.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, pré analytiques, interprétation des résultats). Des cahiers d'enregistrement/traçabilité/transmission des prestations de conseils délivrées aux professionnels de santé, vétérinaires, industriels, particuliers ont été mis en place à chaque poste téléphonique. Ainsi en 2022, le CNR a répondu à environ 250 emails et à plus de 200 appels téléphoniques enregistrés (équivalent à l'année précédente).

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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

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

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

Sans objet

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)

Ce projet de recherche vise à évaluer la contamination des élevages de bovins, volailles et porcins 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.

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

Clostridium botulinum type C, D, C/D, and D/C: An update.

Meurens F, Carlin F, Federighi M, Filippitzi ME, Fournier M, Fravallo 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. eCollection 2022.

Human and animal botulism surveillance in France from 2008 to 2019.

Le Bouquin S, Lucas C, Souillard R, Le Maréchal C, Petit K, Kooh P, Jourdan-Da Silva N, Meurens F, Guillier L, **Mazuet C**. Front Public Health. 2022 Nov 24;10:1003917. doi: 10.3389/fpubh.2022.1003917. eCollection 2022.

A Young Couple with Rapidly Progressive Muscle and Respiratory Paralysis.

Curtiaud A, Merdji H, **Mazuet C**, Boyer P, Demiselle J. Am J Med. 2022 Dec;135(12):e425-e426. doi: 10.1016/j.amjmed.2022.08.018. Epub 2022 Sep 3.

Core-, pan- and accessory genome analyses of *Clostridium neonatale*: insights into genetic diversity.

Mesa V, Monot M, Ferraris L, Popoff M, **Mazuet C**, Barbut F, Delannoy J, Dupuy B, Butel MJ, Aires J. Microb Genom. 2022 May;8(5):mgen000813. doi: 10.1099/mgen.0.000813.

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 coût des prélèvements, souches et ADN du fait de la réglementation MOT/ANSM.
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications. Cette mise en commun des données de surveillance des différents acteurs a été reprise et élargie dans le cadre d'une demande de la DGAL d'actualisation des connaissances du botulisme animal et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.
- 3) Le CNR et le LNR coopèrent à l'investigation des foyers de botulisme bovin et aviaire, notamment des oiseaux sauvages en collaboration étroite avec l'ONCFS et le réseau SAGIR.
- 4) Christelle Mazuet fait partie du comité de thèse de l'étudiant de Caroline Le Maréchal (responsable du LNR) dont le sujet porte sur l'isolement et la caractérisation génétique des souches de *Clostridium botulinum* du groupe III.

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

- 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

➤ Programme d'activité en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

○ Identification et typage des souches de bactéries anaérobies

Le CNR assurera les identifications bactériennes et les toxinotypages des souches d'anaérobies qui lui sont adressées sur la base des connaissances actualisées dans ce domaine.

Notre laboratoire a jusqu'à présent réalisé l'identification des souches courantes et peu courantes de bactéries anaérobies adressées par les laboratoires d'analyses et de biologie médicale. Les techniques utilisées (séquençage notamment 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), ont été utilisées pour plusieurs groupes bactériens. Il faut souligner l'abondance et l'extrême diversité des bactéries anaérobies, plus de 80 genres et 500 espèces actuellement identifiées. La caractérisation des souches d'intérêt médical repose aussi sur la mise en évidence des gènes potentiels de virulence (toxines, facteurs d'adhésion, flagelles, enzymes hydrolytiques ...) et des gènes d'antibiorésistance. Ces techniques notamment basées sur des amplifications par PCR de gènes spécifiques ont permis d'améliorer les identifications et caractérisations des souches, notamment l'identification de nouveaux genres et espèces. Cependant, la complexité et le nombre de gènes ciblés pour ces caractérisations ont considérablement augmenté, plus de 30 pour *C. perfringens* par exemple. Etant donné l'amélioration des techniques et procédés de séquençage de génomes complet et la plus grande facilité d'accéder à ces ressources via la structure P2M, nous séquençons systématiquement le génome complet des souches à identifier et traitons bio-informatiquement les données.

Les axes d'étude privilégiés concerneront une approche génétique plus détaillée incluant des études phylogénétiques des souches isolées de façon à apprécier la variabilité génétique et à permettre leur traçabilité pour déterminer dans la mesure du possible les voies ou les modes de transmission de ces agents.

○ Typage toxinique des souches de bactéries anaérobies

Les facteurs majeurs de virulence des souches de bactéries anaérobies sont des toxines, qui sont le plus souvent sécrétées. La grande majorité des toxines de bactéries anaérobies ont été caractérisées au niveau génétique, ce qui permet d'utiliser des méthodes de biologie moléculaire pour la détection de leurs gènes. Nous avons développé des méthodes de mise en évidence et d'identification des gènes des toxines par amplification génique (PCR) pour le typage toxinique des bactéries anaérobies, notamment les *Clostridium* toxinogènes, les *Bacteroides* entérotoxinogènes, les *Fusobacterium necrophorum*. Ces techniques sont actuellement utilisées en routine pour le typage toxinique des souches adressées par les laboratoires d'analyses médicales. Cette approche se révèle être fiable, reproductible et réalisable en série et dans un délai rapide. Pour les espèces bactériennes dont le potentiel en gènes de toxines et de virulence est volumineux, comme *C. perfringens* et *C. botulinum*, nous procédons systématiquement au séquençage de génome complet et analyse par bio-informatique des gènes d'intérêt. La présence d'un gène de toxine ne signifie pas nécessairement que la toxine est synthétisée et est fonctionnelle. Dans certains cas, le typage toxinique moléculaire est confirmé par des tests d'activité biologique, notamment pour les souches de *Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* toxinogènes pour lesquelles nous disposons du test de létalité sur souris.

○ Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies notamment des *Bacteroides* du groupe *fragilis*

Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*). Nous procédons à l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des bactéries anaérobies qui nous sont adressées par la technique d'antibiogramme par

diffusion en gélose. Les concentrations minimales inhibitrices sont déterminées (notamment par Etest) lorsque les souches présentent des diamètres d'inhibition anormalement réduits. Nous évaluons également en parallèle le système Sensititre. Ces examens sont d'un intérêt plus marqué pour les bacilles anaérobies à Gram négatif et les Cocci anaérobies.

Bacteroides fragilis est l'une des principales espèces de bactéries anaérobies présentant des résistances aux antibiotiques nombreuses et préoccupantes pour le clinicien. La surveillance de la résistance fera toujours l'objet d'une attention particulière pour ces souches.

- Design de plaques à façon Sensititre

Afin d'améliorer son expertise sur les souches de bactéries anaérobies reçues, en plus de la réalisation d'un antibiogramme classique par méthode de diffusion en milieu gélosé, en 2017 le CNR a implémenté 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 sont des plaques commerciales faisant partie de la gamme de produit Sensititre, dont le design n'est pas toujours cohérent avec les besoins du CNR (plusieurs antibiotiques testés non pertinents, nouveaux antibiotiques absents).

En 2023, avec l'aide de ThermoFisher Scientific, le CNR va réaliser le design de ses propres plaques afin d'améliorer le service rendu et de le rendre plus cohérent avec les référentiels actuels (CASFM) :

- Mise en place de valeurs de CMI testées plus précises pour l'ensemble des antibiotiques (valeurs 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

- Projet FED-AMR

Le consortium FED-AMR mènera une étude longitudinale sur une période d'un an en surveillant et en comparant 11 matrices différentes («Compartiments») provenant de zones agricoles (ou d'unités de production) situées dans quatre régions européennes. Grâce à des comparaisons de séquences d'ADN (métagénomique et séquençage d'ARN 16S), nous identifierons les voies de transmission de la résistance aux antimicrobiens via l'ADN extracellulaire. Afin de tenter de réduire la propagation, nous procéderons d'abord à une évaluation comparative des risques sur la diffusion de la résistance via l'exDNA entre les régions de l'UE au moyen de modèles probabilistes, puis le projet identifiera des stratégies de surveillance et d'intervention réalisables. Des analyses épidémiologiques et le lien entre les réservoirs humains et non humains (zoonotiques) seront explorés.

- Projet ClostAbat

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 *Clostridioides 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).

➤ **Programme d'activité pour le botulisme**

○ Diagnostic du botulisme

La surveillance du botulisme humain, qui est le plus souvent d'origine alimentaire, repose sur la confirmation biologique de cette affection incluant le typage de la toxine. Les essais sont réalisés à partir d'échantillons biologiques (sérum, selles) provenant des malades suspects et d'échantillons alimentaires afin d'identifier l'aliment responsable et de prévenir d'autres contaminations. Cette activité prioritaire sera poursuivie pendant la période à venir. L'accréditation COFRAC de la technique de détection des gènes de neurotoxines de *Clostridium botulinum* par PCR dans les prélèvements biologiques humains a été étendue à *Clostridium baratii*.

Nous continuerons de répondre au quotidien à toutes demandes téléphoniques ou par messagerie électronique concernant des renseignements utiles à propos du botulisme et autres affections à bactérie anaérobie auprès de cliniciens, biologistes des hôpitaux ou autres laboratoires d'analyse.

○ Reconstitution des stocks de sérums neutralisant les toxines botuliques

Le CNR dispose d'un stock de sérums neutralisant les toxines botuliques.

Le stock actuel a été constitué entre 2004 et 2008 dans un contexte où la réglementation MOT et OGM était beaucoup moins contraignante. Reconstituer un stock de sérums 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 ;
- 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 sérums anti-botuliques peut prendre entre 18 et 36 mois.

9. 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 et 2017.

9.1 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 *C. 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 et 2017. 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 et d'accès aux ressources biologiques.

9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Effectif 2020 du CNR en Equivalent Temps Plein (ETP) et financement :

Fonctions	ETP réels	Financement
Scientifique / Biologiste	0,8	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	0,25	Institut Pasteur & SpF

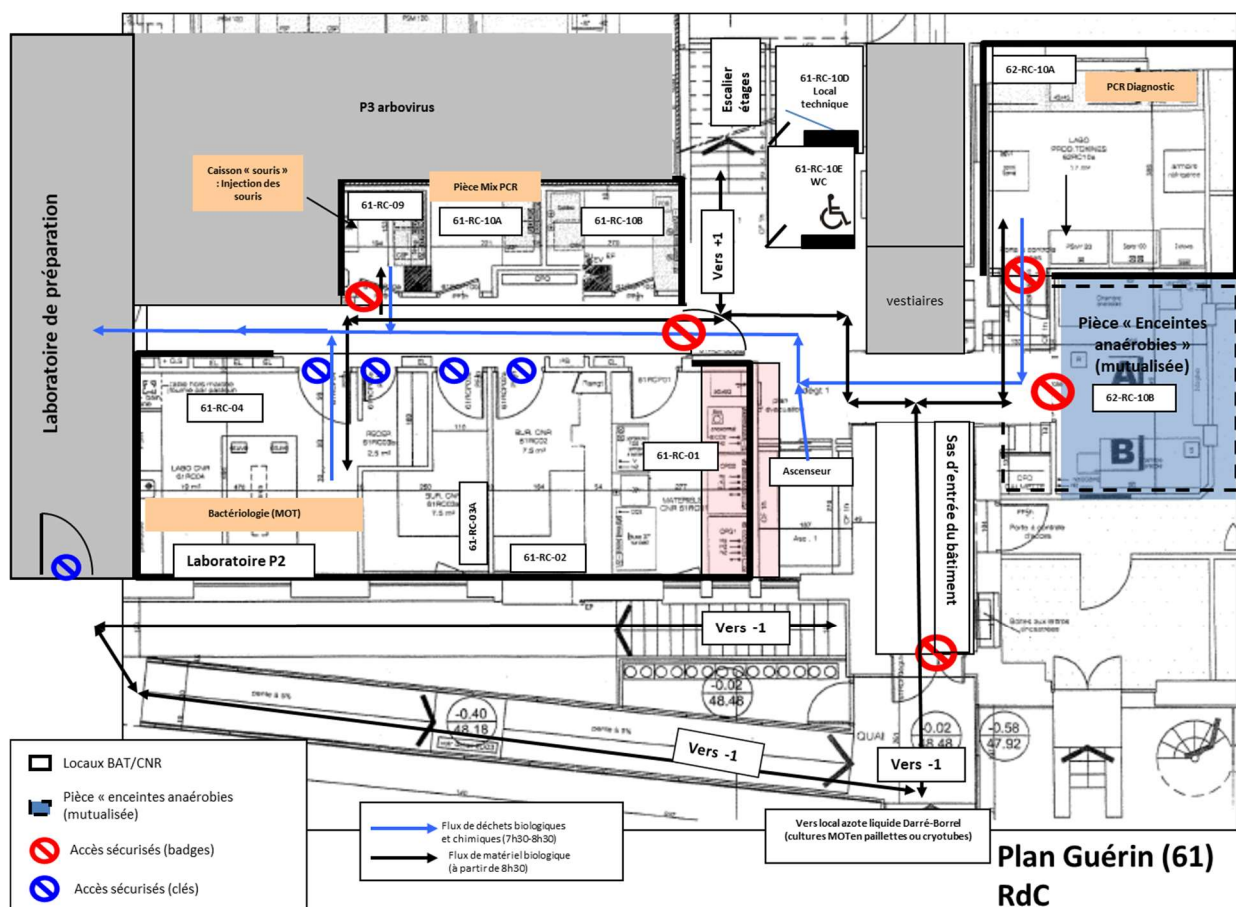
9.3 Locaux et équipements

➤ 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). Ces locaux comprennent :

- 2 espaces bureaux de 7,5m² chacun.
- un laboratoire P2 de 19m² qui contient un PSM de type II
- 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 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 "PCR" avec thermocycleurs, électrophorèses d'ADN, système de visualisation de gels GelDoc.
- une pièce partagée avec une autre unité située au Rez-de-chaussée du même bâtiment renferme une chambre anaérobie.
- 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.

Le secrétariat est partagé avec deux autres entités et se situe au 1er étage dans le même bâtiment.



➤ 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 anaérobie :

- Equipements de base de bactériologie standard
- Jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system)
- Enceinte anaérobie

- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II
- Enceinte climatique à 37°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. Hottes 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 (une extension au dossier technique ANSM devra être constituée).
- *Plateformes techniques* du campus de l'Institut Pasteur
P2M (Séquenceur automatique d'ADN et bioinformaticiens), Pôle PGP de la CIBU pour le séquençage des MOT, Plateforme de protéines recombinantes (une extension au dossier technique ANSM devra être constituée).

9.4 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 duplicatas 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 théoriquement 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 théoriquement exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a 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 théoriquement 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.

9.5 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>).

10. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

10.1 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)
- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturels et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques)
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique.
- 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).
- Amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage
- Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide 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, thêta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine thêta à l'aide d'une PCR spécifique. Détermination du support (chromosomique ou plasmidique) du gène de l'entérotoxine
- Gènes des toxines Hbl, Nhe, Cyt-k1, Cyt-k2 de *Bacillus cereus*
- 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 codant l'ADN ribosomal 16S
- 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 fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*]
- Détermination de la sous-espèce de *Fusobacterium necrophorum* (subsp. *necrophorum* ou *funduliforme*) à l'aide de PCR spécifiques (basées sur la séquence du gène gyrB). Détection par PCR des gènes codant la leucotoxine (lkt), le promoteur du gène lkt, les gènes de l'hémagglutinine et d'une «Hemagglutinin related protein »

10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

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

Cf PDF Annexe_3_CNR

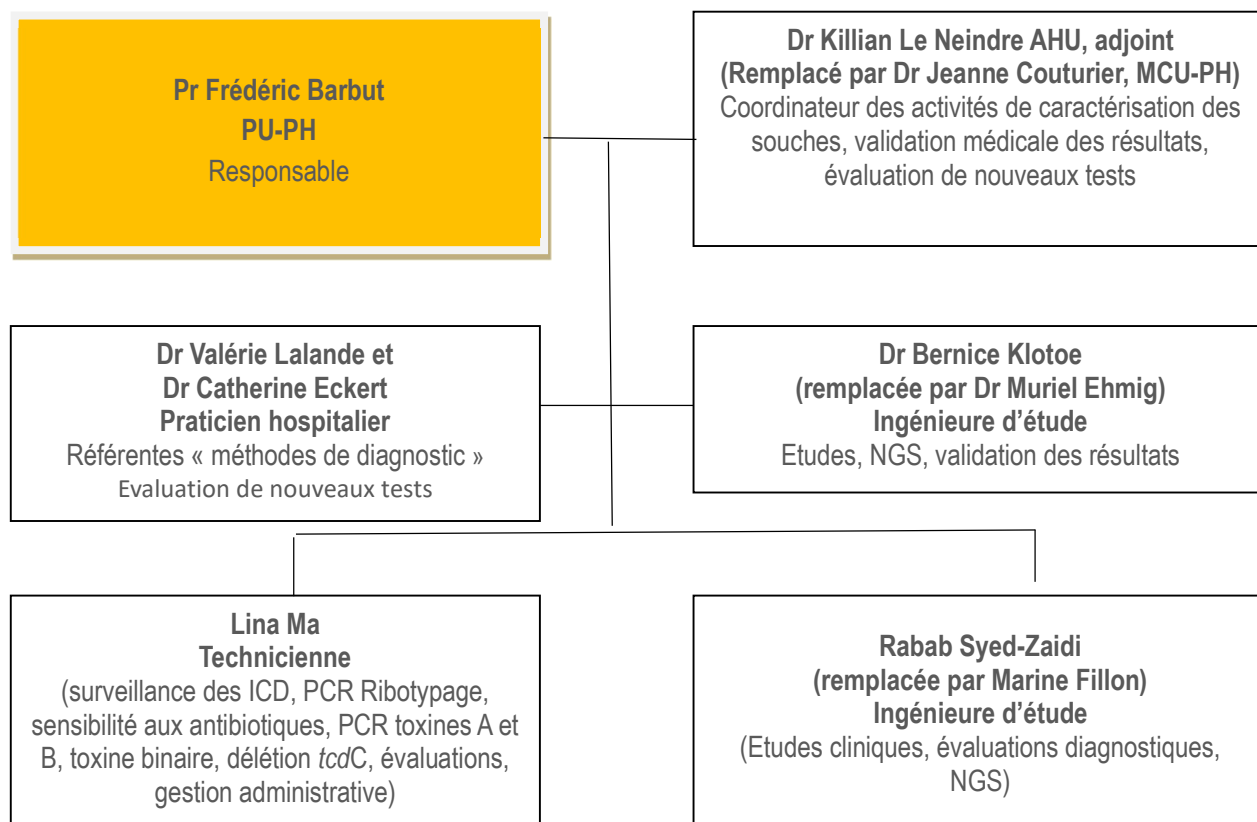
LIVRE 2

Laboratoire associé

Clostridioides difficile

12. Missions et organisation du CNR

Organigramme



La fin de l'année 2022 a été marquée par le départ du Dr Killian Le Neindre (Assistant hospitalo-universitaire) en Octobre 2022, remplacé par Jeanne Couturier (Maitre de conférences des universités – praticien hospitalier), ainsi que le départ de Mme Bernice Klotoe (Ingénieur d'étude Hospitalier) en Novembre 2022, remplacée par Mme Muriel Ehmig en Janvier 2023. Mme Rabab Syed-Zaidi, a également quitté le CNR en fin d'année et a été remplacée par Mme Marine Fillon qui a pris ses fonctions mi-Janvier 2023.

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 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 (CEQ) a été réalisé en 2022, pour la huitième 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 moxifloxacin 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.

13. Activités d'expertise

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

13.1 Evolution des techniques

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

13.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

- Poursuite de l'étude de l'interférence du DAV-132 (Da Volterra) sur le diagnostic immuno-enzymatique et moléculaire de *C. difficile*
- Evaluation du BD Max *C. difficile* assay (Becton Dickinson Diagnostics) en collaboration avec l'équipe de Lyon (Pr Frédéric Laurent)

13.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

13.4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**.

Pas d'évolution par rapport à 2021.

13.5 Activités d'expertises

En 2022, nous avons reçu 485 prélèvements au total contre 254 en 2021, ce qui représente une hausse de 81,5%.

Le **tableau I** présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2022 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 2022, la durée médiane de restitution était de **8 jours**.

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

Année	2022
Nb de prélèvements reçus	485
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	463
Nb de souches toxigènes	399
Recherche du fragment A3 (%)	100%
Recherche du fragment B1 (%)	100%
Recherche de la toxine binaire (%)	100%
Recherche délétion dans <i>tcdC</i> (%)	100%
Antibiogramme (%)	100%
PCR-ribotypage (%)	100%

13.6 Activités de séquençage

Dans le cadre d'études épidémiologiques ou de collaborations, le laboratoire associé a effectué **82** séquençages de génomes complets (NGS) (62 dans le cadre du projet CLOdiff Equi et 20 dans le cas d'une étude sur les récidives multiples).

Le CNR a un accès à une plate-forme de séquençage (PIBnet interne à Institut Pasteur, mais aussi plateformes externes comme Eurofins genomics...). 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). En 2022, les données ont été analysées par **K. Le Neindre** et **R. Syed Zaidi** (qui avaient tous deux suivi la formation sur Bionumerics Webinar "WGS typing ») et par **B. Klotoe**.

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 de son 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)
	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
	BioNumerics

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations d'épidémies, identification des souches de réceptives 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, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) 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 ribotypage	

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :
82

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :
82 (dont 60 dans le cas d'une surveillance zoonotique)
Epidémies

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?
Dans les bases de données fermées : Précisez
Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : ENA avec meta data

13.7 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

14. Activités de surveillance

Le clone épidémique 027 représente toujours moins de 5% des souches reçues. Emergence du clone RT638 dans plusieurs régions de France (77, 75, 93) qui se confirme début 2023.

14.1 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 GenXpert 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)	2022		
	(485 prélèvements)		
	oui	non	NR*
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	26	141	318
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	8	163	314
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	5	164	316
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	22	142	321
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	1	162	322
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	100	81	304

*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.

14.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Le plus grand nombre de prélèvements (n=141) a été envoyé par les centres hospitaliers du Cpias des Pays de la Loire. Cette observation dans certains départements 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**.

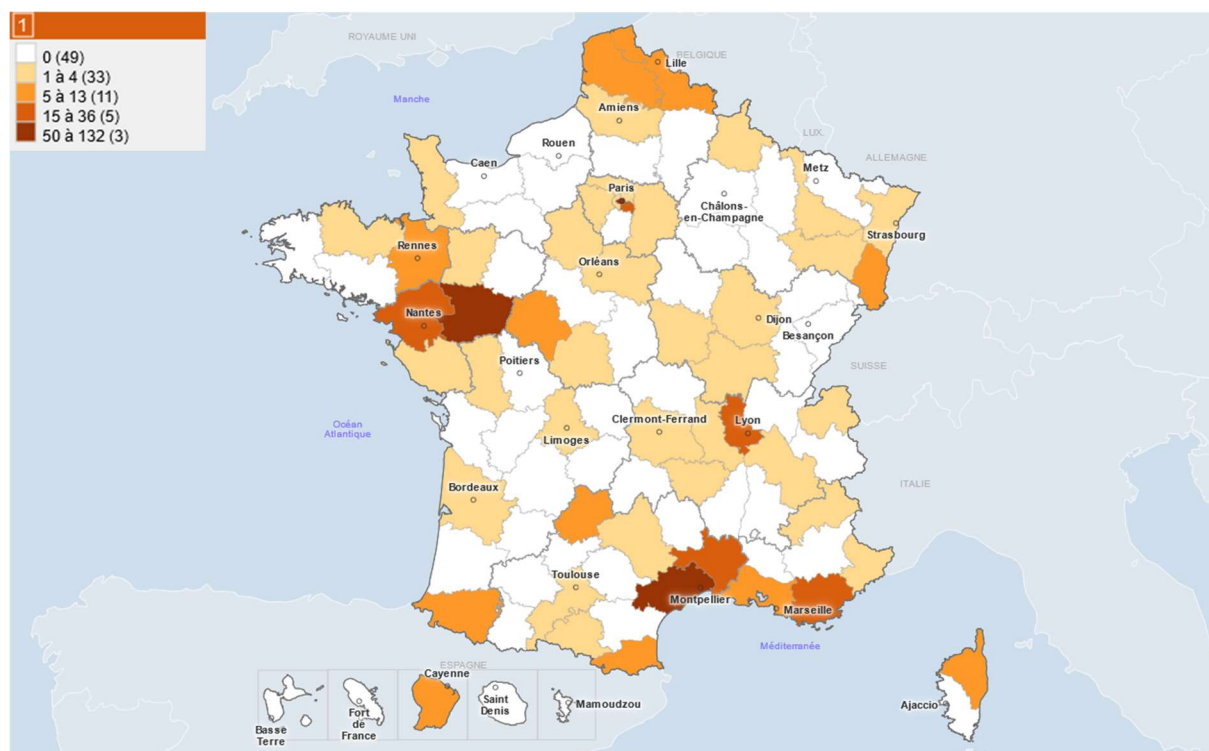


Figure 1 : Répartition des prélèvements (n=485) envoyés par département, en 2022

A noter : les départements en blanc n'ont pas envoyé de prélèvement.

En 2022, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient principalement de selles (99,18%). Cent quatre-vingt-quinze souches (195/399 soit 48,87%) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes et cent quatre-vingt-huit (188/399 soit 47,11%) chez les hommes (pas de mention du sexe sur 16 feuilles de demande). On note que 66,55% (191/287) des patients ont plus de 65 ans (versus 68,1% en 2021). La distribution en âge des patients chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représentée sur la **figure 2**.

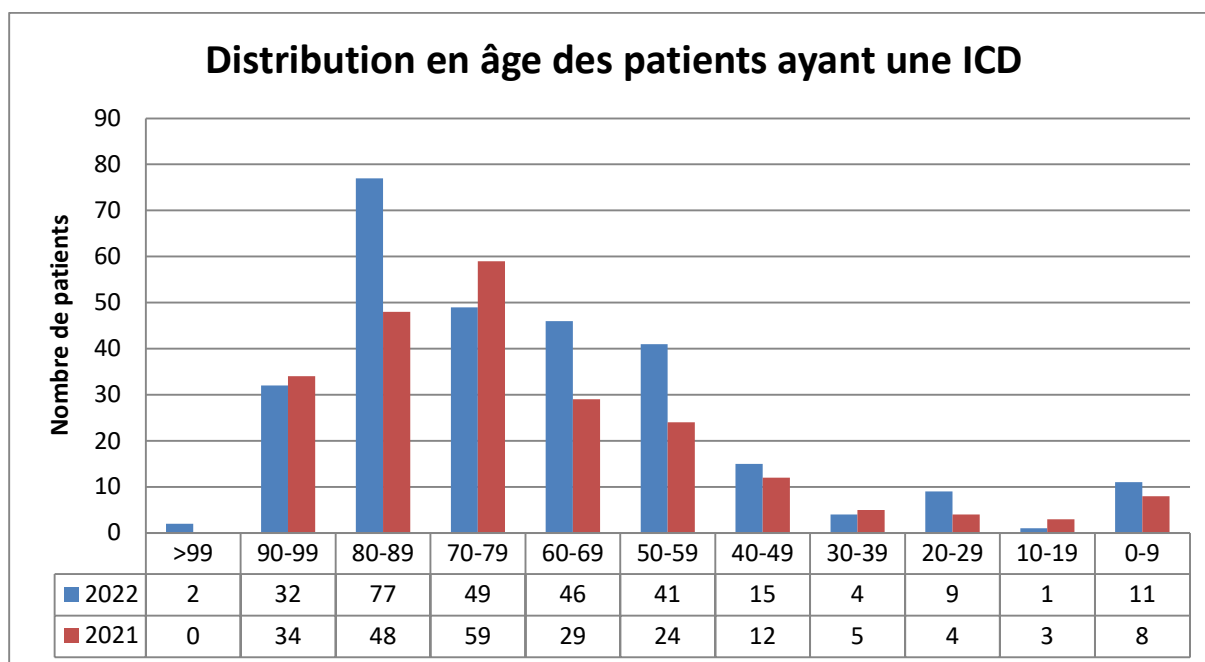


Figure 2. Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge (2021 et 2022).

Les souches 014/020, 106, 002, 078/126, 105/211 et 027 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 51,71% (soit 196/379) des souches (**Tableau III et figure 3**). Les autres PCR-ribotypes les plus fréquemment retrouvés, sont les PCR-ribotypes 651/005/010.

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

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)			
	2022	2021	2020	2019
027	18 (3,9)	8 (3,3)	16 (5,1)	11 (4,5)
014/020 ^a	63 (13,6)	30 (12,5)	37 (11,7)	33 (13,5)
106	38 (8,2)	25 (10,4)	14 (4,4)	12 (4,9)
002	29 (6,3)	15 (6,2)	15 (4,7)	15 (6,1)
078/126 ^b	27 (5,8)	22 (9,16)	24 (7,6)	26 (10,7)
015/211 ^c	22 (4,8)	6 (2,4)	17 (5,4)	10 (4,2)
651	14 (3,0)	4 (1,6)	5 (1,6)	3 (1,3)
005	13 (2,8)	10 (4,1)	12 (4)	6 (2,4)
010	13 (2,8)	4 (1,6)	6 (1,9)	2 (<1)
039	10 (2,2)	3 (1,2)	22 (7,0)	0 (<1)
638	10 (2,2)	2 (<1)	1 (<1)	1 (<1)
001	9 (1,9)	5 (2,08)	6 (1,9)	1 (<1)
Autres	207 (44,7)	99 (41,25)	185 (58,5)	99 (40,6)
Non déterminé	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)
Total	463	240	316	244

^a : PCR ribotype 014, n=30 / PCR ribotype 020, n=33

^b : PCR ribotype 078, n=11 / PCR ribotype 126, n=16

^c : PCR ribotype 015, n=10 / PCR ribotype 211, n=12

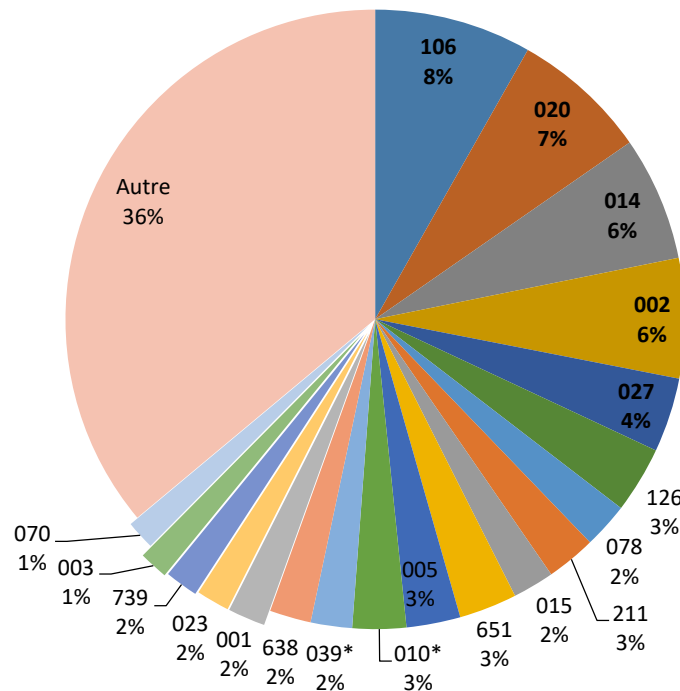


Figure 3. Répartition des PCR-ribotypes en 2022. Les PCR-ribotypes avec un nombre inférieur ou égale à 8 souches sont mis en évidence par détachement du camembert. Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

Parmi les 399 souches de *C. difficile* toxigènes, 18 (3,90%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, 11 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **historique** » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine. Elles ont été isolées à Saint-Etienne (42) en Janvier, à Grenoble (38) en Février, à Cholet (49) en Avril et Décembre, à Niort (79) en Avril, à Montpellier (34) en Juillet, à Châlons Sur Soane (71) en Juillet, à Lyon (69) en Juillet et Aout, à Saint-Brieuc (22) en Aout, et à Limoges (87) en Novembre (**figure 4a**).

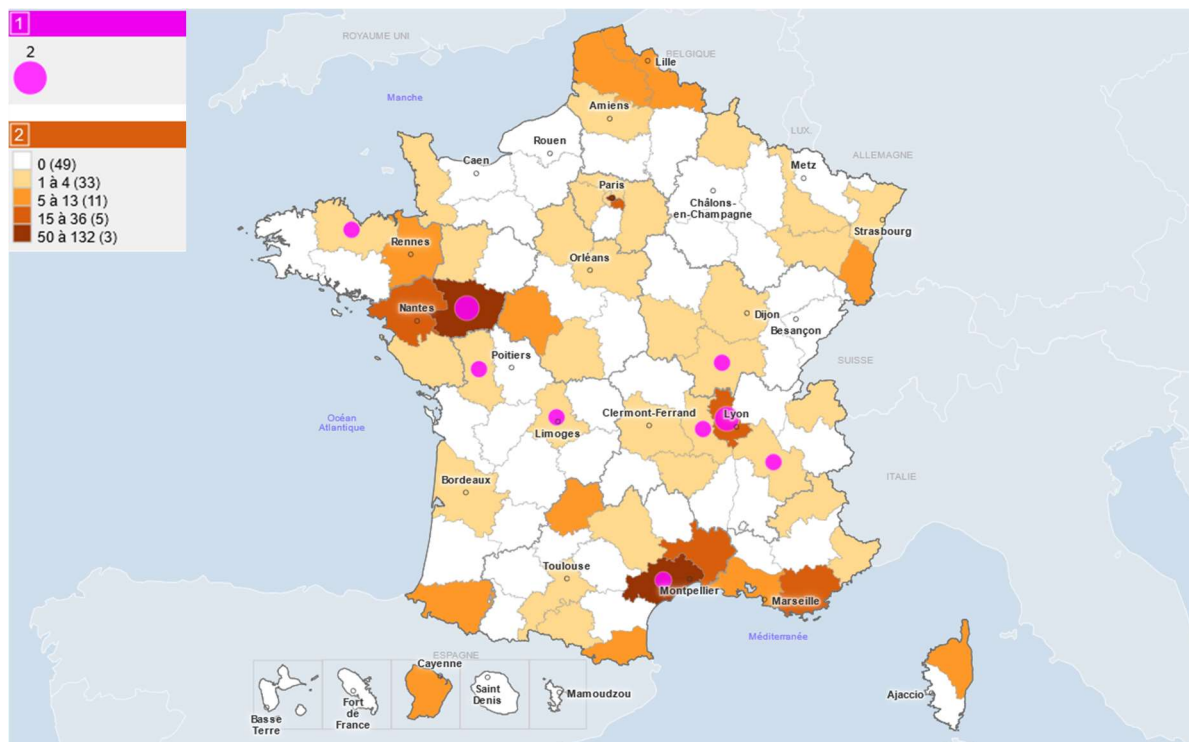


Figure 4a : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques (cercles roses) en fonction des départements, en 2022. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches 027, 7 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **épidémique** » c'est-à-dire résistantes à la moxifloxacine. Elles ont été isolées à Nîmes (30) en Février, Elbeuf (79) en Mars, Béthune (62) en Mai, Boulogne (09) en Août et Rodez (12) en Août et Octobre (**figure 4b**).

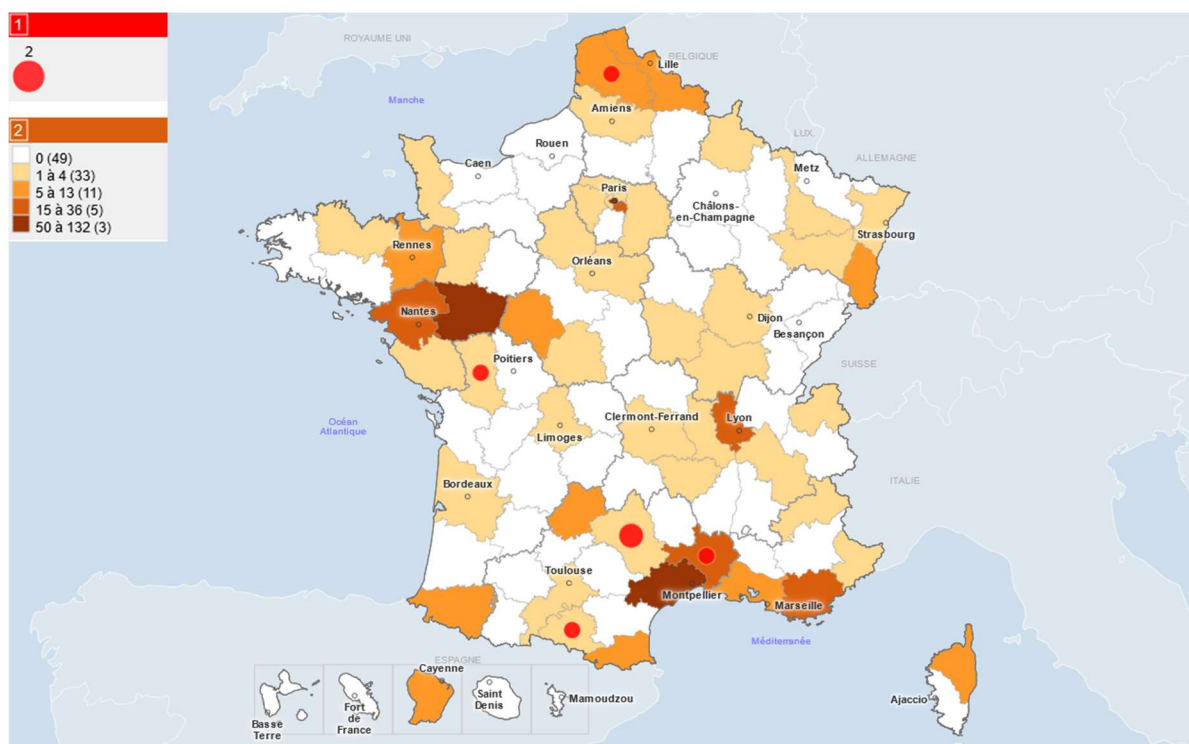


Figure 4b : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémique (cercle rouge) en fonction du département en 2022. Les départements n'ayant pas envoyés de souches sont représentés en blanc.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches toxigènes reçues au laboratoire est le 014/020 : il est isolé sur tout le territoire (**Figure 5**).

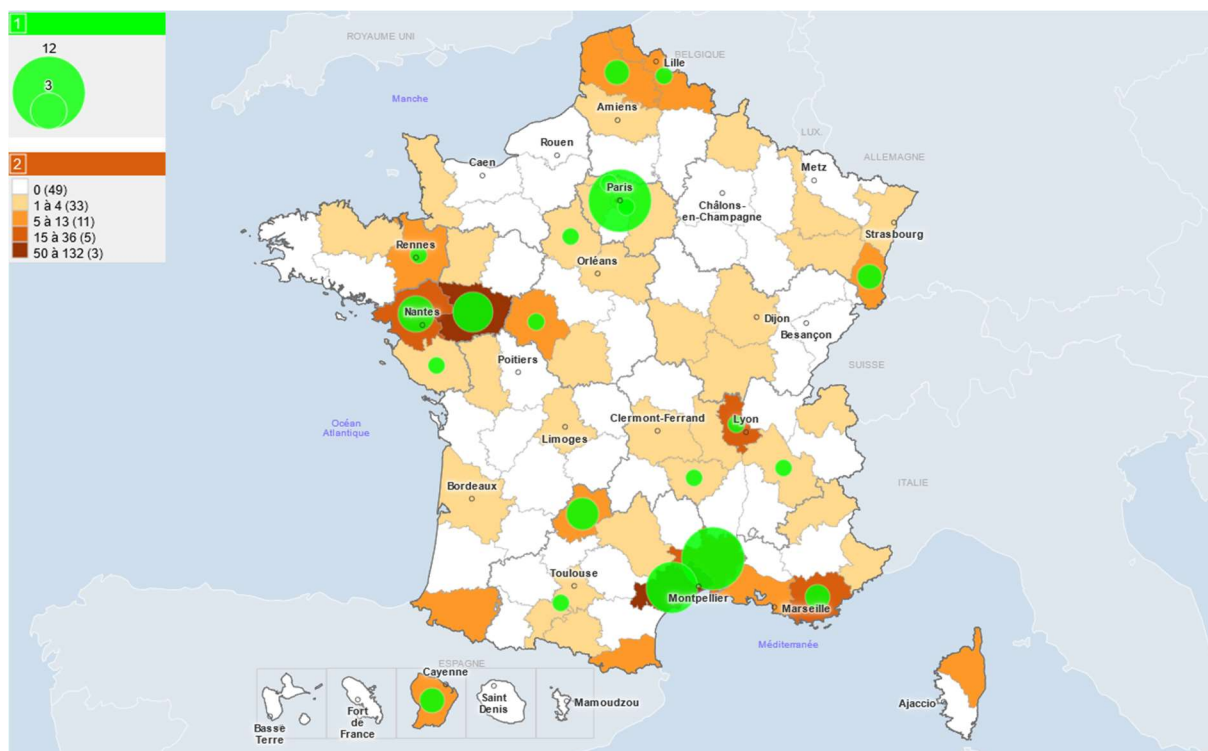


Figure 5 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020 (cercles verts) en fonction des départements en 2022. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Les souches de **PCR-ribotype 106** et **002** arrivent respectivement en **2ème** et **3ème** position, excluant les souches non-toxigène et les RT027 (**Figure 6** et **7**).

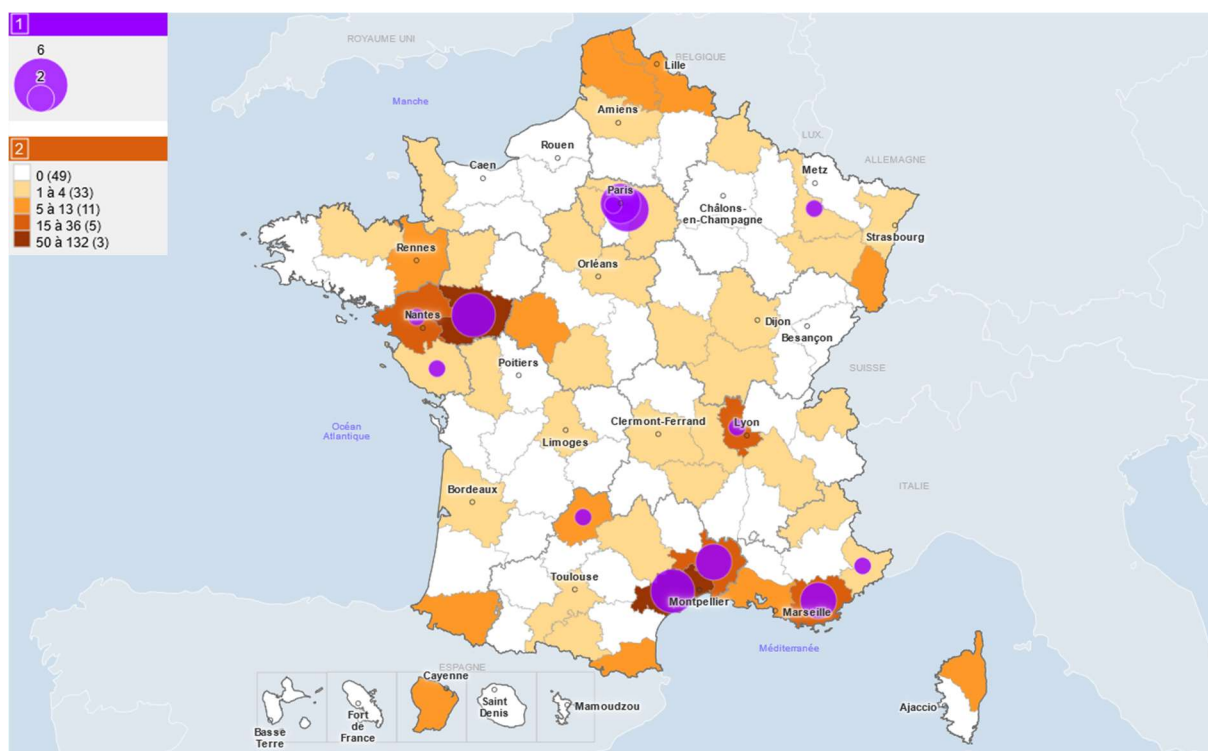


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 106 (cercles violets) en fonction des départements en 2022. Les départements n'ayant pas envoyé des souches sont représentés en blanc.

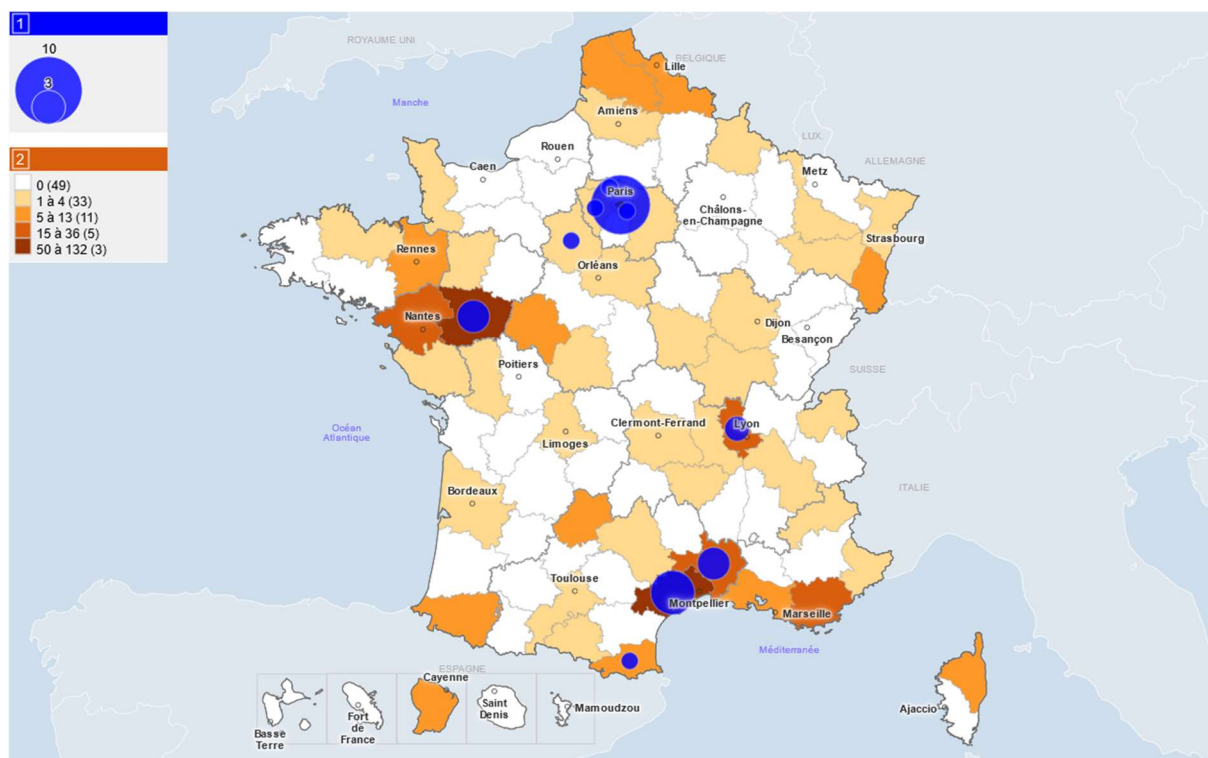


Figure 7 : Répartition des souches PCR-ribotype 002 (cercles bleu) en fonction des départements en 2022. Les départements n'ayant pas envoyé des souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches de *Clostridioides difficile* reçues cette année, 19 sont non toxigènes, et les ribotypes 010 et 039 sont dominants (**Tableau IV**).

Tableau IV : Ribotypes des souches non toxigènes reçues en 2022.

Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre
010	13	FR168	3	FR313	2
039	10	FR309	3	084	1
031	6	035	2	205	1
009	4	715	2	629	1
593	3	FR248	2	FR316	1
595	3	FR295	2		
FR111	3	FR312	2		

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

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

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

14.3 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 et à la tétracycline (méthode des disques) a été testée pour les 399 souches de *C. difficile* en 2022. Une détermination des CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 399 souches.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm)¹ de 16,04%, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm)¹ de 97,99%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21 mm)² de 14,29%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm)¹ de 2,51% (**Tableau VI**). On note, en 2022, une augmentation de la résistance des souches de *C. difficile* à la moxifloxacine.

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

	Erythromycine (%R+I)	Clindamycine (%R+I)	Moxifloxacine (%R+I)	Tétracycline (%R+I)
Diamètres R+I	<22 mm	<15 mm	<21 mm	<19 mm
2020	19,3	91,1	7,3	6,3
2021	14,2	95,5	7,6	1,3
2022	22,5	98,1	13,6	2,8

Toutes les souches étaient sensibles à la vancomycine (les CMI étaient ≤ 2 mg/l)², et 7 souches étaient résistantes au métronidazole (principalement des souches non toxigènes) (**Tableau VII**).

Tableau VII : Caractéristique des souches résistantes au métronidazole reçue en 2022.

N° de souche	PCR Ribotype	Toxines A et B	CMI Métronidazole
CD22-033	010	Absence	4
CD22-442	010	Absence	8
CD22-423	010	Absence	12
CD22-257	010	Absence	16
CD22-227	010	Absence	32
CD22-073	010	Absence	256
CD22-137	005	Présence	256

La répartition des CMI pour les 399 souches **toxigènes** est présentée sur la **figure 7**.

¹ Selon CASFM 2013

² Selon CASFM-EUCAST Octobre 2020

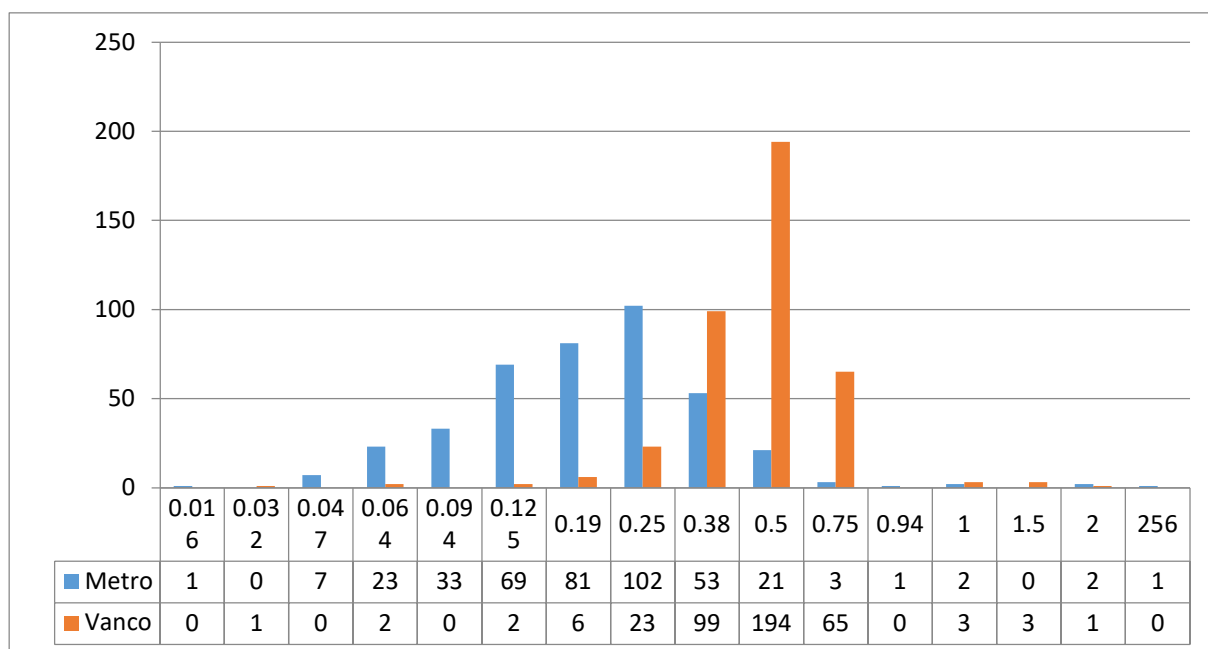


Figure 7 : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 399 souches toxigènes.

14.4 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 participe à la révision du protocole « ECDC CDI WGS study, 2022 ».

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://epidmio.pasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf). Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches et d'éditer un compte-rendu des résultats. L'identification des PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) se fait selon les recommandations européennes et repose sur la base de données Web-ribo. L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à SPF.

Ce site est consultable dans sa totalité par Santé Publique France, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les ARS ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site est régulièrement mis à jour. Ce site anciennement hébergé par l'Institut Pasteur a été relocalisé en janvier 2016 au niveau de la société Epiconcept, sans que cela n'affecte le rendu ou la consultation des résultats. Des modifications du site et de la feuille de demande sont envisagées en 2023.

b) Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

F. Barbut est le coordonnateur français de l'étude européenne **COMBACTE-CDI**. Il s'agit d'une étude **non interventionnelle** dont les objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire.

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

14.5 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 précédant 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.*

15. 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.

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

16.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Enseignements sur *C. difficile*

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours
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 :

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

Activités de formations continues

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées- Année
Hôpital Clermont Ferrand Microbiologie	Microbiologistes, infectiologues	Médecins, chercheurs	Staff recherche	17/02/2022
Hôpital Saint Antoine MIT	Infectiologues	Médecins	Staff de service	02/02/2022
Hôpital Saint Antoine Service de Gastroentérologie	Gastroentérologues	Médecins	Staff de service	11/02/2022

Stagiaires accueillis

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	2021-2022
DU « création, analyse et valorisation de données omiques » Killian Le Neindre	Mémoire de DU : projet ColoDIFF	2021-2022
École pratique des hautes études Sciences de la Vie et de la Terre Certificat de capacité à la recherche Rabab Zyed Saidi	Apport du Whole Genome Sequencing (WGS) dans la compréhension de l'épidémiologie des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	2021-2022

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

KUIJPER E., REUSBAET FAG, BARBUT F.

« *Clostridium, Clostridioides and other clostridia* »

In « Manual of Clinical Microbiology », 13th edition, ASM press 2021, sous press

Fiche EFFICATT . « *Clostridium difficile* » INRS 2022

Modalités et cibles de diffusion

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

- BARBUT F
Webinar « How to diagnose *Clostridioides difficile* infections (CDI) ?
Organisé par "European Society of Neurogastroenterology and Motility (ESNM)"
28 June 2022

- BARBUT F
Webinar “Infection prevention and control of *Clostridioides difficile* using WGS”
Organisé par le « European study group on *C. difficile* » (ESGCD)
30 mars 2022
- BARBUT F
Webinar SFM – REMIC : *Clostridioides difficile*
Diagnostic biologique : aspects pratiques et pièges
7/10/2021
- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>
Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017.
- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé 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)

16.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

F. Barbut et Killian Le Neindre ont été régulièrement en contact avec A. Carbonne et M. Colomb-Cotin (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 (Colomb-Cotin M, Euro Surveill. 2019 Aug;24(35):1800638. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638. PMID: 31481147).

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

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

Sans objet

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

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

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

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

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

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

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

COUTURIER J., LEPAGE P., JOLIVET S., DELANNOY J., ANCEL PY, ROZÉ JC, BUTEL M.J., BARBUT F. and AIRES J.
Gut microbiota diversity of preterm neonates is associated with *Clostridioides difficile* colonization
Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jul 6;12:907323. doi: 10.3389/fcimb.2022.907323

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

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

Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des anaérobies a été chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Cette étude a été réalisée auprès de 22 laboratoires d'établissements hospitaliers. Chaque laboratoire a envoyé un aliquot de selles reçues (indépendamment de la prescription de *C. difficile*) à 2 journées différentes au centre hospitalier de Leeds (UK) pour recherche systématique de *C. difficile* et analyse des souches (PCR ribotypage, WGS). Il a ensuite demandé aux laboratoires de compléter, après avoir recueilli le consentement le patient, des données rétrospectives cliniques concernant l'évolution de certains patients infectés par *C. difficile* et de témoins négatifs. L'objectif était de déterminer la proportion de sous-diagnostic d'ICD et de connaître les clones de souches qui circulent en Europe

VIPREY VF and al.

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

Clin Microbiol Infect. 2022 Dec 29:S1198-743X(22)00643-7. doi: 10.1016/j.cmi.2022.12.019.

Evaluation de la dissémination environnementale de *C. difficile* à partir des toilettes

Environ 5% des infections associées aux soins sont dues à des microorganismes de l'environnement. Nous avons investigué 2 séries de cas groupés (la première liée à une souche de *Citrobacter freundii* productrice de carbapénémase OXA48 entre 2016 et 2018 et la seconde liée à une souche de *Legionella pneumophila* en 2016) dont la source probable était les toilettes. Par ailleurs, une autre étude a montré que 11,32% des prélèvements de l'environnement (dont l'air) des chambres de patients ayant une diarrhée à *Clostridioides difficile* étaient contaminés par des spores de *C. difficile*. L'objectif de cette étude expérimentale était d'évaluer le rôle potentiel des toilettes dans la dissémination environnementale de ces bactéries lors du tirage de la chasse d'eau. 100 ml d'une suspension de densité comprise entre 2 et 4 McFarland de chacune des bactéries étudiées (*C. freundii*, *C. difficile*, *L. pneumophila*) ont été versés dans le siphon d'une toilette. L'eau du siphon a été aussitôt prélevée et les bactéries ont été numérées par dilution sériée. Après avoir tiré la chasse d'eau, la contamination environnementale a été évaluée en disposant 15 boîtes de Pétri (milieux sélectifs et spécifiques de chacune des bactéries étudiées) autour des sanitaires à distance variable par rapport à la lunette des toilettes. L'air (1 m³) a été également prélevé par impaction à l'aide d'un biocollecteur. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37°C pendant une durée et sous des atmosphères adaptées à chacune des bactéries.

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

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

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

Apport du whole genome sequencing (WGS) dans la compréhension de l'épidémiologie des infections à *Clostridium difficile*.

Clostridioides difficile est une cause majeure de diarrhée nosocomiale. L'objectif de cette étude était de déterminer la fréquence et les modes de transmission de *C. difficile* dans un contexte non épidémique par typage multi-locus du génome entier (wgMLST) et par l'analyse de polymorphisme nucléotidique du core génome (cgSNP).

Cette étude rétrospective a été menée dans un hôpital universitaire de 680 lits entre janvier 2016 et février 2017. Au total, 191 souches isolées de 169 patients symptomatiques infectés par *C. difficile* (ICD) ont été analysées par WGS. Les séquences ont été comparées à l'aide des analyses wgMLST et cgSNP. Les données génétiques et les mouvements de service ont ensuite été combinés pour identifier le taux de transmission et le type de transmission. Le taux de transmission variait de 19,5 % à 32,5 %, selon les analyses WGS utilisées. La plupart des transmissions étaient considérées comme cryptiques, quelle que soit l'analyse génétique (69,1 % à 75,8 %). Aucune transmission au sein d'un même service n'a été observée.

Dans un contexte non épidémique, la plupart des transmissions de *C. difficile* proviennent de sources autres que les patients symptomatiques atteints d'ICD.

COURBIN V., COUTURIER J., GATEAU C., SYED ZAIDI R., YOUSSEF A., BARBUT F.
Transmission patterns of *Clostridioides difficile* in a non-epidemic setting based on WGS analysis.
Microbiol. Res. 2022, 13, 530–538. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030037>

Discrimination des souches de *C. 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-ribotypage, 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 (coefficient 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, YOUSSEF A, SYED ZAIDI R, AUBRY A, VEZIRIS1, N, BARBUT F, ECKERT C.
Discrimination des souches de Clostridioides difficile par MALDI-TOF MS
RICA, Paris, décembre 2021 communication affichée.

Prévalence et facteurs de risque du portage asymptomatique de *Clostridioides difficile* toxigène (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 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, 2099 patients ont été inclus et dépistés. L'âge médian était de 66 ans (écart interquartile 47-80 ans) et 1010 étaient des hommes (48%). Dix-neuf patients avaient déjà eu une infection à CD (1,1 %). Au total, 121/2099 patients étaient CD+ (5,8%), dont 73 tox+ (3,5%) : 61 (83,5%) étaient asymptomatiques alors que 8 (10,9%) étaient diarrhéiques. Les souches toxigènes les plus fréquentes appartenaient principalement aux ribotypes PCR étaient 039 (n=26, 13,2%), 010 (n=12, 9,9%) et 014 (n=12, 9,9%). En analyse multivariée, 2 facteurs étaient associés au portage asymptomatique CD tox+ (n=61 patients comparés à 1720 CD- asymptomatiques) : le co-portage d'ESBLE (Odd Ratio ajusté [ORa] 2,5, IC95% 1,2-5,1, p = 0,01) et un antécédent d'ICD (ORa 5,7, IC95 % 1,2-28,1, p = 0,03). La consommation de produits laitiers crus (ORa 2,2, IC95% 1,2-4,2, p=0,01) avait un effet protecteur significatif (ORa, IC95% 1,2-4,2, p=0,01). Nous avons montré qu'il y avait une faible prévalence de portage CD tox+ asymptomatique 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 toxigène de Clostridioides difficile chez l'adulte dans onze hôpitaux français
ECCMID 2022, 21-24 avril 2022, Lisbonne. Poster

Projet coloCDIF : génomique comparative des souches de *C. difficile* impliquées dans le portage asymptomatique et les ICD

Les facteurs de risque de colonisation à *C. difficile* sont à ce jour mal connus. Une étude ancillaire à un projet hospitalier de recherche clinique (PHRC CODBAHRE) a permis le recrutement de patients porteurs asymptomatiques de *C. difficile* toxinogènes.

L'objectif était de caractériser les génomes de souche de portage asymptomatique par séquençage haut débit et de les comparer à celui des souches isolées d'infection symptomatique. Le groupe « COLO » regroupe les souches provenant de patient porteur asymptomatique (20 souches). Le groupe « ICD » regroupe les souches isolées de patient présentant des signes cliniques d'ICD (20 souches).

Le séquençage génomique a été effectué en pair-ends (150 nucléotides) par NextSeq 500 (Illumina). Les données obtenues ont été nettoyées (fastp v.0.23.2), assemblées (unicycler v.0.5.0), contrôlées (fastQC v.0.11.9 et quast v.5.0.2) et annotées (prokka v.1.14.6 et emapper v.2.1.7). L'analyse pan-génomique a été effectuée à l'aide du logiciel roary (v.3.13.0) et l'identification de gènes spécifiques à l'un des groupes à l'aide du logiciel scoary (v.1.6.16).

Le « pan » génome des 40 souches analysées comprend 7735 gènes dont 6142 gènes accessoires (dont 1331 uniques). Le nombre moyen de gènes accessoires dans les souches « ICD » est significativement plus important que dans les souches « COLO » (1229,6 vs – 1103,2 gènes respectivement, test de student $p=0,022$). Il y a une plus grande diversité retrouvée dans le génome accessoire des souches « COLO » (total de 6035 gènes) par rapport aux souches « ICD » (5365 gènes). Neuf gènes sembleraient être plus souvent retrouvés au sein du groupe « ICD » (Sensibilité et spécificité $\geq 75\%$). Cette première analyse décrit un potentiel génomique des souches responsable d'ICD lié à la plasticité génétique sans mettre clairement en évidence des facteurs génétiques discriminant.

17.2 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

COUTURIER J., RABATE M., NESA D., ADAM M., PRAT L., JOLIVET S. BARBUT F.
Évaluation de la dissémination des bactéries à partir des toilettes: étude expérimentale
Hygiène 2022, 30, 1-7

BARBUT F., ECKERT C., LALANDE V., LE NEINDRE K., COUTURIER J.
Clostridioides difficile :des recommandations actualisées
La revue du praticien 2022, 73, 1-7

(ii) Publications internationales

VIPREY VF, DAVIS GL, BENSON AD, EWIN D, SPITTAL W, VERNON JJ, RUPNIK M, BANZ A, ALLANTAZ F, CLEUZIAT P; COMBACTE-CDI National Coordinators, Wilcox MH, Davies KA; COMBACTE-CDI consortium; Members of the COMBACTE-CDI National coordinators
Key differences in diagnosis and patient populations between community and in-patients *C. difficile* infection : results from Combatting bacterial resistance in Europe CDI (COMBACT CDI).
Euro Surveill. 2022 Jun;27(26):2100704. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.26.2100704. PMID: 35775426

RANC AG, SENTIS C, COUTURIER J, BARBUT F, TRISTAN A, BUIS C, SANTOS K, FARRAH S, DURAFFOURG P, VANDENESCH F, DAUWALDER OI, LAURENT F.
Performances of BD MAX™ CDIFF assay for detection of toxigenic *Clostridioides difficile* using Cary-Blair preserved samples.
Diagn Microbiol Infect Dis. 2022 Jul;103(3):115701. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115701. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35596982

BOUDJELAL Y, KRUTOVA M, DJEBBAR A, SEBAIHIA M, ROUABHIA S, COUTURIER J, SYED-ZAIDI R, BARBUT F. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance patterns of *Clostridioides difficile* isolates in Algerian hospitals.
J Infect Dev Ctries. 2022 Jun 30;16(6):1055-1063. doi: 10.3855/jdc.16056.

COUTURIER J, LEPAGE P, JOLIVET S, ANCEL PY, BUTEL MJ, AIRES J, BARBUT F.
Gut microbiota diversity of preterm neonates is associated with *Clostridioides difficile* colonization
Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jul 6;12:907323. doi: 10.3389/fcimb.2022.907323. eCollection 2022. PMID: 35873148

MESA V, MONOT M, FERRARIS L, POPOFF M, MAZUET C, BARBUT F, DELANNOY J, DUPUY B, BUTEL MJ, AIRES J.
Core-, pan- and accessory genome analyses of *Clostridium neonatale*: insights into genetic diversity.
Microb Genom. 2022 May;8(5). doi: 10.1099/mgen.0.000813. PMID: 35550024

GATEAU C, MELO GD, URIAC P, TASSEAU O, RENAULT J, BLONDEL A, GOUAULT N, BARBUT F, MINOPRIO P.
Irreversible inhibitors of the proline racemase unveil innovative mechanism of action as antibacterial agents against *Clostridioides difficile*.
Chem Biol Drug Des. 2022 Apr;99(4):513-526. doi: 10.1111/cbdd.14005. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34918458

GROHS P, VILFAILLLOT A., ZAHAR J-R.; BARBUT F., MOULIN V., BAUNE P., BOURGEOIS C., BOUFFIER A., LAUSSUCQ C., SIENZONIT L., KASSIS-CHIKHANI N., FRANGE P., CASETTA A., LAWRENCE C., PICARD S., PODGLAJEN I.
Fecal carriage of multidrug-resistant bacteria and associated risk factors
J Antimicrob Chemother. 2022 Sep 30;77(10):2667-2678. doi: 10.1093/jac/dkac289.

COURBIN V, LE NEINDRE, COUTURIER J, GATEAU C, SYED ZAIDI, R. , YOUSSEF A., BARBUT F.
Transmission patterns of *Clostridioides difficile* in a non-epidemic setting based on WGS analysis.
Microbiol. Res. 2022, 13, 530–538. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030037>

(iii) *Communications nationales,*

GROHS P, VILFAILLLOT Aurélie, ZAHAR , BARBUT F , FRANGE P,CASETTA A, MOULIN V., LAWRENCE C., BEAUNE P, PODGLAJENI I., KASSIS-CHIKHANI N.
Portage digestif de EBLSE et BHRE :Prévalence et facteurs de risque
33e Congrès de la SF2H, Lyon, 1-3 Juin 2022
Communication orale (CL-04)

FAURY H., JOLIVET S, LEPLAY C, LE NEINDRE K, COUTURIER J., DHENIN G., AUDRAIN N., GOUOT C., ANTIGNAC M., LAPIDUS N., BARBUT F.
Impact de la pandémie de covid-19 sur les bactéries multirésistantes et infections à *Clostridioides difficile*
33e Congrès de la SF2H, Lyon, 1-3 Juin 2022 (CL-015).

BARBUT F., FOUAD F , LEMAITRE M, GAVAZZI G, PACCALIN M, LILIU H, BOURGEOIS M, FIEVEZ S, NUTTENS C, MOÏSI J ET VANHEMS P.
Evolution des infections à *Clostridioides difficile* en ville et à l'hôpital en France, 2015-2019
41ème RICAI, 12-13 décembre 2022. (P-093)

LE NEINDRE K., COUTURIER J, JOLIVET S, BARBUT F
Caractérisation génomique de souche de portage asymptomatique de *Clostridioides difficile*
41ème RICAI, 12-13 décembre 2022. (P-266)

(iv) *Communications internationales*

COUTURIER J., LEPAGE P., JOLIVET S., DELANNOY J., ANCEL P.Y., ROZE J.C, BUTEL M.J, BARBUT F., AIRES J.
Changes in the gut microbiota of preterm neonates according to *Clostridioides difficile* colonization
32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23-26 avril 2022.
Lisbonne, (communication orale)

LE NEINDRE K, DESLANDES A, SYED ZAIDI R, FAURY H, DUFRESNE M., ROUILLARD L., TAN C., FITUSSI K, BARBUT F.

Experimental evaluation of pulsed-xenon light disinfection on multi-drug resistant bacteria and spores of *Clostridioides difficile*.

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23-26 avril 2022.

Lisbonne, (poster)

JOLIVET S, COUTURIE J.R, GROHS P, VILFAILLLOT 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 eleven French hospitals

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23-26 avril 2022.

Lisbonne, (poster)

GODMER A, LE NEINDRE K, LATAPY V., BASTIDE M., YOUSSEF A., SYED ZAIDI R., AUBRY A, VEZIRIS N, BARBUT F, ECKERT C.,

Discrimination of *Clostridioides difficile* strains by MALDI-TOF MS

32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23-26 avril 2022.

Lisbonne, (poster)

NUTTENS C., BARBUT F., FAYSSOIL F., KOUTANGNI T., LEMAITRE M., LILLIU H., VANHEMS P., MOISI J., GAVAZZI G.

Clostridium difficile infection prognosis remains severe in the oldest. A study based on French national health insurance claims data.

EuGMS 2022 Congress,

Londres, 28-30 septembre 2022

LEMAITRE M., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., BARBUT F., PACCALIN M., LILLIU H., BOURGEOIS M., FIEVEZ S., NUTTENS C., MOISI J.

Estimation of the burden of *C. difficile* infection in the community and the hospital settings in France from 2015-2019: results from a SNDS study (CLODICIA)

ISPOR 2022

Vienne, 6-9 novembre 2022

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

BARBUT F

Webinar « How to diagnose *Clostridioides difficile* infections (CDI) ?

Organisé par "European Society of Neurogastroenterology and Motility (ESNM)"

28 June 2022

BARBUT F

Webinar "Infection prevention and control of *Clostridioides difficile* using WGS"

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

30 mars 2022

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

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

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

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

Le projet DiaBoClo a pour objectifs de :

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

Le projet DiaBoClo permettra de connaître les caractéristiques (sensibilité aux antibiotiques, typage des souches via l'utilisation de méthodes de référence et du séquençage des génomes d'une sélection de souches) des souches de *C. botulinum* et de *C. difficile* qui circulent dans la filière bovine et qui sont susceptibles d'être disséminées dans l'environnement lors de l'épandage des fumiers ou des digestats de méthanisation.

DERONGS L, DRUILHE C, LE MARÉCHAL CA, BARBUT F, HEURTEVENT L, BUFFET J, MARTIN L, ZIEBAL C, POEZEVARA T, ROUXEL S, HOUARD E, POURCHER AM

Influence of operating conditions on the persistence of indicator bacteria and of two pathogenic clostridia in semi-continuous mesophilic anaerobic reactors

Waste management, 2021 Nov;135:275. doi: 10.1016/j.wasman.2021.09.001. Epub 2021 Sep 21.

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

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

L'objectif du projet DIFALIBO est d'évaluer la prévalence de *C. difficile* dans les aliments impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et dans différents réservoirs animaux. Un total de 564 échantillons d'aliments impliqués dans des TIAC (241 plats cuisinés, 103 végétaux, 78 viandes et ovoproduits, 43 féculents, 43 produits laitiers, 30 produits de la mer, 23 légumes, 3 d'origine inconnue) et de 1033 échantillons de fèces d'animaux (130 bovins, 567 porcs, 83 animaux de compagnie, 190 volailles, 33 cliniques, 30 dans un élevage multi-filière) ont été testés par méthode culturale. Les souches ont été caractérisées par PCR ribotypage (PR), par PCR multiplex pour les différents facteurs de virulence (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*), et leur sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par diffusion en milieu gélosé. *C. difficile* a été détecté dans 1 aliment (0,17%) (fromage au lait cru de vache) et dans 218 (21,1%) échantillons d'origine animale. Dix isolats (à partir de l'aliment contaminé) et 99 isolats d'origine animale ont ensuite été caractérisés par le CNR *C. difficile*. Pour le fromage au lait cru, les 10 isolats prélevés ont tous les mêmes caractéristiques indiquant probablement la présence d'une seule souche dans cet aliment. Cette souche possède les gènes codant pour les toxines A, B et binaire, appartient au PCR-ribotype 126 (PCR-ribotype retrouvé également en santé humaine), est sensible à la vancomycine, au métronidazole et à la moxifloxacine, et présente une résistance à l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. Pour les isolats d'origine animale, toutes les souches présentent le gène codant pour la toxine A, 96 % le gène codant pour la toxine B (souches appartenant au toxinotype 11) et 73% le gène codant pour la toxine binaire. Les PCR-Ribotypes 126 et 78 sont les ribotypes majoritaires retrouvés dans les échantillons d'origine porcine (81%), les PCR-ribotypes retrouvés chez les autres espèces animales sont beaucoup plus variables. Toutes les souches sont sensibles à la vancomycine et au métronidazole, 38% sont sensibles à l'érythromycine, 4 % à la clindamycine, 81% à la moxifloxacine et 36 % à la tétracycline. Cette étude est la première réalisée à partir de l'analyse d'aliments impliqués dans des TIAC et la première en France portant sur l'évaluation des animaux comme réservoir de *C. difficile*.

LE MARECHAL C, GUYARD M, MARTIN L, GATEAU C, ROUXEL S, COUTURIER J, POEZEVARA T, SYED-ZAIDI T, MARAULT M, YOUSSEF 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

19. Programme d'activité pour les années suivantes

Le programme d'activité pour 2022-2023 est centré sur les activités suivantes :

Evaluation de l'automate Ingenius (Elitech) pour le diagnostic des infections à *C. difficile*

Collaboration avec Elitech Italie.

Projet avec la DGAL concernant la contamination par *C. difficile* de 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 zoonotique 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.

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 pathogénèse 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.

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 caracterisation of the CloDifEqui collection of Strains

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 CNRS *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)

Clostridioides 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 « spoligotypage ») 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.

Portage asymptomatique de *C. difficile* et relations avec le microbiote intestinal (Collaboration avec B. Dupuy, Institut Pasteur).

Le portage asymptomatique de *C. difficile* en milieu hospitalier est fréquent mais varie en fonction de nombreux paramètres : la durée moyenne d'hospitalisation, les caractéristiques des patients ou des services étudiés, la méthode d'étude (mono- ou multicentrique), le type d'étude (incidence ou prévalence), les techniques diagnostiques utilisées, la prise en compte des souches non toxigènes. Au cours d'une étude multicentrique française de prévalence, 11% des patients hospitalisés étaient porteurs asymptomatiques de *C. difficile*. Ce portage asymptomatique suscite un intérêt croissant pour plusieurs raisons :

- Les porteurs asymptomatiques de souches toxigènes sont plus à risque de développer une infection que les patients non porteurs.
- Les porteurs asymptomatiques de souches non toxigènes pourraient à l'inverse être protégés des ICD. Des essais thérapeutiques basés sur l'administration d'une souche non toxigène visant à protéger de l'infection par une souche toxigène sont actuellement en cours.
- Les porteurs asymptomatiques contaminent leur environnement par des spores de *C. difficile*.
- Des études récentes reposant sur un dépistage systématique des patients et le typage des souches ont suggéré que les porteurs asymptomatiques pouvaient également être une source de transmission.

Par ailleurs, peu de données concernant les spécificités du microbiote intestinal de patients colonisés non diarrhéiques sont disponibles à l'heure actuelle, la majorité des études se focalisant chez des patients symptomatiques.

L'objectif principal de ce projet est d'identifier par analyse du microbiote intestinal par métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S des signatures bactériennes associées au portage asymptomatique de souches toxigènes de *C. difficile*. Les objectifs secondaires sont les suivants :

- i) Comparer le microbiote intestinal des patients atteints d'ICD, des porteurs asymptomatiques de *C. difficile* et celui de patients (diarrhéiques ou non) indemnes de *C. difficile* (Jeanne Couturier).
- ii) Effectuer une analyse comparative par whole genome sequencing des souches isolées chez des patients porteurs asymptomatiques et des souches responsables d'infections afin d'identifier des différences dans leur environnement génétique (Killian Le Neindre). Le génome de ces souches (notamment le génome accessoire) sera comparé aux génomes de souches responsables d'infection à *C. difficile*. Les comparaisons seront appariées par le PCR-ribotype des souches sélectionnées (objectif réalisé en 2022)

Nous bénéficierons pour ce projet de 2397 échantillons de selles recueillies dans le cadre d'un PHRC (étude CODBAHRE, Dr N. Kassis-Chikhani) visant à étudier les facteurs de risque de portage de BHRé (bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes) chez tous les patients hospitalisés dans 11 centres hospitaliers. Chaque prélèvement est adossé à un questionnaire clinique détaillé.

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.

20. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

20.1 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.

20.2 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 frederic.barbut@aphp.fr

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

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	Professeur des universités – Praticien hospitalier	0,3	AP-HP
Klotoe Bernice	Ingénieur hospitalier	1	SPF
K. Le Neindre	Assistant Hospitalo-universitaire	0,15	AP-HP
V. Lalande/C. Eckert	Praticien Hospitalier	0,25	AP-HP
Lina Ma	Technicienne	1	SPF
R. Syed-Zaidi	Technicienne	1	SPF
Réception/secrétariat/gestion		0,27	AP-HP

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

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

20.3 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

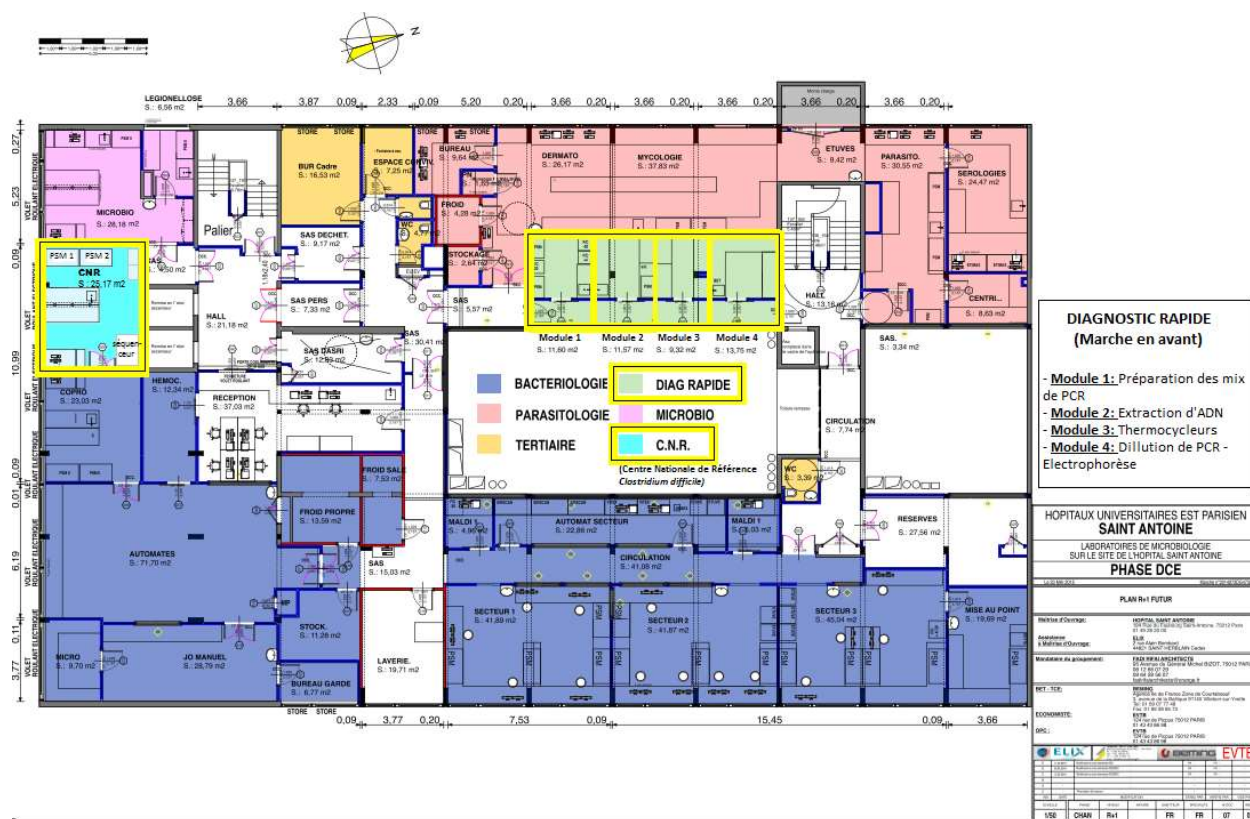


Figure 1 : plan des locaux (encadré en jaune : pièces utilisées par le personnel du CNR)

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 microplaque (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

20.4 Collections de matériel biologique

Toute souche de *C. difficile* reçue au laboratoire associée « *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 (Pr Ed Kuijper, Department of Medical Microbiology, Centre for Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands, e.j.kuijper@lumc.nl).

20.5 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 2021, pour la huitième 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 moxifloxacin ont également été incluses dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité 2021 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.

21. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

21.1 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, moxifloxacin, 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 retrouvée chez les souches non toxigènes, par PCR multiplex et détection par électrophorèse capillaire
- le typage par PCR-ribotypage 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 toxigènes, 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

21.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

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

Cf PDF Annexe_3_laboratoire_associe