

Rapport d'Activité 2007

Centre National de Référence *Escherichia coli* / *Shigella*

Unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes

Institut Pasteur - Paris

Et

Laboratoire associé

Service de Microbiologie

Hôpital Robert - Debré - Paris

Responsables :

CNR-IP :

Weill François Xavier Tél : 0145688345

Filliol Ingrid Tél : 0145688344

Téléphone : 0145688339 (Secrétariat)

colishig@pasteur.fr

fxweill@pasteur.fr

ifilliol@pasteur.fr

Télécopie : 0145688837

Laboratoire associé (HRD) :

Bingen Edouard Tél : 0140032340

Mariani-Kurkdjian Patricia Tél : 0140032341

Stéphane Bonacorsi Tél : 0140035792

Téléphone : 0140032340 (Secrétariat)

edouard.bingen@rdb.aphp.fr

patricia.mariani@rdb.aphp.fr

stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr

Télécopie : 0140032450

Sommaire :

<u>1- Introduction</u>	4
1.1-Missions et Objectifs du CNR	4
1.2- Résumé d'activité 2007	5
1.3- Les équipes	6
a- Le CNR (IP) : Effectif / Qualification du Personnel	6
b- Le laboratoire associé (RD) : Effectif / Qualification du Personnel	6
c- Démarche qualité	7
1.4- Les locaux et équipements	8
a- Institut Pasteur	8
a- Hôpital Robert Debré	9
<u>2- Activités d'expertise</u>	10
2.1- Capacité techniques du CNR	10
a- Techniques de référence	10
b- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	14
c- Collection de souches	15
2.2- Activités d'expertise de l'année 2007	15
<u>A- E. coli</u>	16
a- Inventaire global des souches et selles de E. coli en 2007	16
b- Résultats obtenus sur les prélèvements de selles	17
c- Analyse des souches de E. coli d'origine humaine productrices de Shigatoxines	18
d- Sérotypage moléculaire des souches STEC non sérotypables	22
e- Analyse globale des gènes de virulence des souches de E. coli non STEC reçues au CNR (IP)	23
f- Sérodiagnostic des Syndromes Hémolytiques et Urémiques (IP)	24
g- Souches de E. coli extra intestinaux	25
<u>B-Shigella</u>	27
a-Analyses des 752 souches reçues de 740 patients en France métropolitaine en 2007	27
c- Bilan des feuilles d'informations reçues au CNR (197 fiches pour 195 patients)	30
c- Souches reçues d'outre-mer (95 souches pour 92 patients)	31
d- Shigella d'origine non humaine (5 souches)	31
<u>C- Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR</u>	32
<u>3. Activités de Surveillance</u>	32
3.1- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	32
A- Réseau partenaire	32
B- Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances	32
C- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS	40
D- Collaboration avec des partenaires nationaux : animal, alimentaire, Environnement	40

E- Collaboration avec des partenaires internationaux	41
3-2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux	42
A- Étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches STEC	42
B- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E. coli</i> responsables de méningites	42
C- Étude de la résistance aux antibiotiques de souches de <i>Shigella</i>	43
a- Surveillance globale.....	43
b- Surveillance de <i>S. sonnei</i>	44
3-3 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....	49
a-Épidémie dans la communauté juive d'Ile de France.....	49
b- Cas de contamination d'une technicienne par un contrôle de laboratoire	54
c-Épidémie chez les gens du voyage de la région d'Auxerre	54
3-4- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier Européens.....	54
<u>4-Alerte.....</u>	55
<u>5- Activités d'information, de formation et de conseil</u>	55
a-Enseignements.....	55
b-Information et conseil aux biologistes et praticiens.....	56
c-Diffusion des données de surveillance à l'InVS.....	57
d- Activités d'expertises après du ministère chargé de la santé, de l'InVS, la DGS, l'AFSSA, l'OMS.....	57
<u>6- Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....</u>	58
<u>A- <i>E. coli</i> : (IP).....</u>	58
a. <i>E. coli</i> extra intestinaux.....	58
b. <i>E. coli</i> intestinaux	59
<u>B-<i>Shigella</i> (IP)</u>	61
<u>7- Liste des publications et communications 2007</u>	65
<u>8- Programme de travail 2008-2009.....</u>	66
A/ Pour les <i>E. coli</i> responsables d'infections digestives.....	66
B/ Pour les <i>E. coli</i> responsables de méningites néonatales.....	69
C/ Pour les <i>Shigella</i>	71
ANNEXES.....	74

1- Introduction

1.1-Missions et Objectifs du CNR

Les objectifs du Centre National de Référence des *Escherichia coli* et *Shigella* (CNR-ECS) sont de surveiller au niveau national et de caractériser les souches d'*E.coli* et *Shigella* sur le plan moléculaire afin d'analyser leurs diversités génétiques et leurs facteurs de pathogénicité.

Le cahier des charges du CNR E. coli et Shigella a été réparti entre le CNR de l'Institut Pasteur (IP) et le laboratoire associé de l'Hôpital Robert Debré (RD) comme suit :

Pour les E. coli responsables d'infections digestives :

- Contribuer au développement du diagnostic de routine des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et en particulier des *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) dans les laboratoires de diagnostic : (IP, RD).
- Contribuer à la surveillance des infections à STEC et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en confirmant l'infection à STEC par sérologie (IP), et/ou mise en évidence de STEC dans les selles (RD, IP).
- Participer, en lien avec l'InVS, à l'investigation de cas groupés par typage des souches et comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources (IP, RD en collaboration avec les structures en charge de la surveillance ou d'études ponctuelles sur les STEC chez l'animal, dans les aliments et dans l'environnement telles que l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments...).
- Contribuer à des études de recherche appliquée (IP, RD).
- Contribuer avec l'InVS aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen (Enter-Net) notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE (IP, RD).
- Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles, etc. (IP, RD).

Pour les E. coli responsables de méningites néonatales : (RD)

- Développer et mettre en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches permettant de les caractériser (typage, génotypage, empreinte de virulence) et de distinguer les souches responsables de cas groupés de celles qui sont responsables de cas sporadiques et l'affiliation des souches aux différents clones,
- Développer en liaison avec l'InVS un réseau de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques, etc.),
- Étudier et suivre la résistance des souches aux antibiotiques,
- Apporter une expertise pour une aide au diagnostic des méningites décapitées par antibiothérapie,

- Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, cas groupés, formes cliniques ou souches inhabituelles, etc.

Pour les Shigella (IP)

- Suivre les tendances évolutives temporelles des différentes espèces de *Shigella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyses de biologie médicale sur tout le territoire,
- Suivre l'évolution de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques et des mécanismes de résistance en liaison avec le CNR de la résistance aux antibiotiques,
- Contribuer à la détection et l'investigation des cas groupés en lien avec l' InVS,
- Contribuer à des études de recherche appliquée,
- Participer, en lien avec l'InVS, aux réseaux de surveillance et d'alerte internationaux et en particulier européens
- Contribuer à l'alerte en signalant à l' InVS, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance, apparition de souches inhabituelles, etc...

Toutes ces missions sont possibles avec la collaboration de nombreux hôpitaux et laboratoires répartis dans toute la France, et à une collaboration étroite avec l'InVS.

1.2- Résumé d'activité 2007

Concernant l'ensemble de l'activité du CNR et du Laboratoire Associé : un total de **1408** souches, **172** selles et **330** sérums ont été analysés.

Les *Shigella* ont été le problème majeur de cette année 2007 avec une épidémie persistante dans des écoles et crèches de la communauté juive de Paris, caractérisée par deux pics épidémiques: un premier pic de janvier à avril (50 souches reçues au CNR) et un second de septembre à décembre (33 souches reçues au CNR). Toutes les souches épidémiques étaient de type *Shigella sonnei* biotype g avec un profil de résistance aux antibiotiques identique à celui observé dans les épidémies survenues dans la même communauté en 1996, 2002 et 2003 : c'est à dire souches avec résistance à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT). Le premier cas survenu dans une école a été signalé le 24 janvier 2007 par le Laboratoire Associé (hôpital Robert Debré) avec le signalement de l'apparition d'une résistance supplémentaire à azithromycine (AZM). L'AZM étant l'antibiotique préconisé pour le traitement des shigelloses résistantes à AMX et SXT, le CNR a aussitôt mis en place la détection de la résistance à l'AZM pour les souches résistantes AMX-SXT. Ainsi 90% des souches du premier pic épidémique étaient résistantes à l'AZM avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) $\geq$ 256mg/L par Etest. La résistance à AZM a été retrouvée chez 6% des souches du second pic épidémique. La collaboration avec l'InVS, les CIRE, les LABM, les hôpitaux et les médecins, a permis de mettre d'adapter le traitement dans le cas de résistance à l'AZM. De façon globale, 853 souches de *Shigella* correspondant à 834 patients ont été sérotypées en 2007 et 197 feuilles d'information reçues.

Aucune épidémie collective à *E. coli* producteurs de shigatoxine (STEC) n'a été signalé en 2007.

Sur un total de 509 souches d'*E. coli* (477 patients) analysées en 2007, seules 53 souches (52 patients) ont révélé la présence de Shigatoxine (10,9%). Pour les 172 selles analysées (164 patients) pour la présence de gènes de virulence spécifiques des *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC ou STEC), seules 24 (pour 24 patients) se sont révélées positives (14,6%). Pour les EHEC, 330 sérologies anti-LPS ont été réalisées pour 250 patients avec 73 patients positifs (29.2%).

1.3- Les équipes

a- Le CNR (IP) : Effectif / Qualification du Personnel

✓ Effectif par catégories de fonctions

En 2007, Le CNR *E. coli* et *Shigella* faisait partie de l'unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes (BBPE) dirigé par Le Pr. Patrick Grimont (MD, PhD). Le personnel du CNR se répartissant comme suit :

Nom - Prénom	Libellé Emploi	ETP
M. WEILL François-Xavier	Cadre Confirmé B - Responsable CNR	0,10
Mme FILLIOL Ingrid	Cadre Confirmé A - Adjoint CNR	0,90
Mme CARLE Isabelle	Technicien supérieur de laboratoire 1er degré	1,00
Mme ISSENHUTH-JEANJEAN Sylvie	Technicien supérieur de laboratoire 1er degré	0,50
Melle LE ROUX Karine	Technicien supérieur de laboratoire 1er degré	1,00
Mme LEJAY-COLLIN Monique	Technicien supérieur de laboratoire 1er degré	0,90
Mme MARTIN-DELAUTRE Sylvie ^a	Technicien de laboratoire qualifié	
Melle ROUX Chrystelle	Technicien de laboratoire	0,10
Mme SYLVAIN Chantal	Secrétaire de direction 2ème degré	0,12
Mme ABIHSSIRA Marie-Valérie	Employé administratif hautement qualifié	0,20
Melle PRETESAC Annie	Responsable de préparation	0,10
M. TOMMASINO Patrice	Agent de laboratoire	0,10

^a en congé parental d'éducation jusqu'au 10/10/2007 puis démission (remplacée par Karine LE ROUX jusqu'au 10/10/2007) puis par Martine Lefèvre au 02/02/2008.

✓ Qualification du personnel cadre

- **François-Xavier Weill**, Médecin Biologiste, DEA de Biologie Moléculaire, ancien interne et Assistant Hospitalier Universitaire.

- **Filliol Ingrid**, Docteur en Pharmacie, Doctorat d'Université.

b- Le laboratoire associé (RD) : Effectif / Qualification du Personnel

✓ Effectif par catégories de fonctions

Nom - Prénom	Libellé Emploi	ETP
M. BINGEN Edouard	PU-PH	0,2
Mme MARIANI-KURKDJIAN Patricia	PH	0,4
M. BONACORSI Stéphane	MCU-PH	0,2
Melle AIT-IFRANE Shadia	Technicienne	1

c- Démarche qualité

L'unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes (BBPE) pour ses activités d'identification, de sérotypage, de lysotypage, et de typage moléculaire est engagée dans une **démarche Qualité** : la totalité des membres du personnel impliqué dans ces activités a suivi une formation à l'Assurance Qualité depuis 2000 et un **correspondant qualité** a été nommé pour animer le projet qualité du CNR. Le référentiel choisi est le Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale (GBEA), (Arrêté du 26 Novembre 1999 paru au Journal Officiel du 11 Décembre 1999).

Ces actions s'inscrivent dans le cadre de la **Démarche qualité** de l'Institut Pasteur qui a pris son essor en Février 1998 par la mise en place de la **Mission Qualité**, mission transformée en **Service Qualité** en janvier 2000. Ce service a notamment la charge de coordonner les démarches des différents services de l'Institut Pasteur parmi lesquels les Centres Nationaux de Référence. Le Service Qualité propose des procédures générales répondant aux diverses exigences des référentiels normatifs. Ces procédures sont mises en place au fur et à mesure de nos disponibilités. Un laboratoire de métrologie a également été créé à l'Institut Pasteur pour répondre aux besoins des laboratoires en contrôle de température et de volume. Des procédures spécifiques à l'activité du CNR ont été rédigées tel qu'un projet Assurance Qualité en 2002 ayant conduit à :

- la rédaction des modes opératoires, des procédures générales (protocoles de milieux de culture, tampons...) et spécifiques (protocoles PCR...).
- et le suivi du matériel scientifique.

De plus, le CNR-IP a participé de 2005 à 2007 à des **contrôles de qualité** externes internationaux organisés par le **Réseau européen de Surveillance aux infections à EHEC** (Enter-Net) : « **Enter-Net ring trial** » sur le sérotypage (1), détection de gènes de virulence (2).

Les scores obtenus ont été identiques en 2005 et 2006 avec :

(1) 100% pour le sérogroupage « O » par agglutination ou *rfb*-RFLP, et 80% pour le type flagellaire « H » par *fliC*-RFLP et/ou séquençage *fliC*.

(2) 100% pour la détection PCR des gènes *stx*, *eae* et *hlyA* recherchés

En 2007, les scores ont été de :

(1) 90% pour le sérogroupage « O » par agglutination ou *rfb*-RFLP, et 100% pour le type flagellaire « H » par *fliC*-RFLP et/ou séquençage *fliC*.

(2) 100% pour la détection PCR des gènes *stx*, *eae* et *hlyA* recherchés

Le laboratoire associé est également engagé dans une démarche Qualité au sein du service de Microbiologie de l'hôpital Robert Debré, qui a par ailleurs été engagé dans la démarche d'accréditation dès 2003. Le référentiel choisi est le GBEA.

1.4- Les locaux et équipements

a-Institut Pasteur

Locaux

Le CNR-ECS est situé dans l'Unité BBPE à l'Institut Pasteur. Ce centre comprend :

- Une grande pièce pour le sérotypage moléculaire des *E. coli* et *Shigella*, les amplifications géniques (PCR) et le séquençage (poste de sécurité PCR)
- Une petite pièce avec poste de sécurité microbiologique pour l'étude des *Shigella* (identification et sérotypie),
- Une petite pièce climatisée pour le RiboPrinter (automate de ribotypie), les électrophorèses en agarose et en champ pulsé (pièce partagée avec les autres CNR de l'Unité BBPE)
- Un bureau avec deux ordinateurs Macintosh (G3 et iMac) reliés au réseau Ethernet de l'Institut Pasteur et une imprimante couleur.

Pour réduire les coûts, le circuit des souches est commun pour tous les CNR de l'Unité BBPE (ouverture des paquets, enregistrement des informations épidémiologiques sur Macintosh, secrétariat, même informatique, local commun pour conserver les souches, chambre froide commune).

Matériel, équipement de la structure actuelle

- Équipement habituel de laboratoires de bactériologie : enceintes climatiques (+4°C, 30°C, 37°C, réfrigérée de 4° à 30°C), microscope...,
- Postes de sécurité microbiologique de type II (x 2),
- Matériel d'électrophorèse en agarose et d'hybridation, capture électronique des images *
- Thermocyclers (x 5), *
- Riboprinter ou appareil de ribotypage automatisé (Qualicon), *
- Appareil d'électrophorèse en champ pulsé Biorad DRIII, en pièce climatisée *
- Système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes OSIRIS (Bio-Rad) avec logiciel d'épidémiologie *
- Équipement informatique : 4 ordinateurs Macintosh en réseau protégé, sauvegardes des données assurées sur disque dur externe., 1 PC
- Congélateurs à -80°C (x4) *
- Laverie et autoclaves. *

* Partagé avec les autres CNR de l'Unité

Moyens extérieurs à la structure :

- Structures transversales notamment (CIBU, Plate-forme génomique Puces à ADN, séquences, Coordination épidémiologique), mais aussi les structures disponibles sur le campus (animaleries, etc...) et nécessaires aux missions du CNR.
- Collaboration avec la Plateforme de Santé Publique de l'Institut Pasteur (PF8) pour les différents projet impliquant du séquençage.
- Réseau informatique de l'IP.
- Accès à un laboratoire P3 dans le bâtiment.

b- Hôpital Robert Debré

Locaux

Le laboratoire associé est situé au sein du Service de Microbiologie du Pr Bingen à l'hôpital Robert Debré à Paris dont il utilise une partie de la structure, en particulier :

- Une pièce pour l'étude des selles avec un poste de sécurité microbiologique (isolement et identification des *E.coli*)
- Un poste de sécurité PCR
- Une pièce dédiée aux électrophorèses en agarose et au champ pulsé

Matériels et Equipements de la structure actuelle

Locaux en propre

- Poste de sécurité microbiologique de type II
- Étuve
- Microscope
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur à -20°C

Locaux communs

- Pièce pré PCR avec poste de sécurité PCR
- Une pièce climatisée comprenant :
 - Thermocyclers (x 3)
 - Appareil d'électrophorèse en champ pulsé (Chef mapper- Biorad)
- Pièce post PCR comprenant
 - Matériel d'électrophorèse en agarose
 - Appareils de capture électronique des images (Gel docXRS /Biorad et Biocapture/Vilbert Lourmat)
- Laverie
- Réserve matériel en verre et matériel plastique à usage unique
- Chambre froide
- Congélateurs à -80°C (x 4)
- Logiciel de gestion des laboratoires (Lab400)
- Équipements informatiques de bureau en réseau protégé avec sauvegarde en salle informatique centrale de l'hôpital
- Bureaux médicaux

Moyens extérieurs à la structure

- Accès à la structure universitaire EA 3105
- Utilisation d'un prestataire de service (Génome Express) pour des séquençages

2- Activités d'expertise

Actuellement, la seule connaissance du sérotype d'une souche d'*E. coli* ne permet pas de dire si celle-ci est pathogène. Pour pouvoir affirmer son caractère pathogène, il est nécessaire de mettre en évidence les gènes de pathogénicité.

Bien que la virulence de chaque pathovar soit multi factorielle, l'identification courante repose sur la recherche d'un facteur de virulence caractéristique de l'effet pathogène ou des gènes qui en contrôlent l'expression, et parfois sur la recherche d'une caractéristique phénotypique associée à la virulence.

2.1- Capacité techniques du CNR

a- Techniques de référence

- Méthodes d'identification

Bactériologie classique pour l'isolement et la différenciation d'espèce

- Possibilité de culture sur différents milieux (Drigalski, TSA, BCP, XLD, Hektoen, Kligler-Hajna, Mannitol-Mobilité, Mac Conkey-sorbitol).

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

Lactose, o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG), Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), Gaz/Glucose, Mannitol, Gaz/Mannitol, Dulcitol, Rhamnose, Xylose, Indole, Citrate de Simmons, Citrate de Christensen, Acétate de trabulsi, Mucate, sulfure d'hydrogène (H₂S), tétrathionate réductase (TTR), Glycérol, beta-glucuronidase. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, Biomérieux).

Remarque : les *Shigella* sont des *E. coli* adaptés à l'homme. L'identification des *E. coli* et *Shigella* s'effectue habituellement à l'aide des caractères biochimiques, mais les caractères différentiels entre *E. coli* et *Shigella* sont parfois peu nombreux, en particulier dans le cas des variants immobiles et agazogènes de *E. coli*. La différenciation par tests biochimiques des sous espèces de *Shigella* reste essentielle.

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisées en routine

- La recherche par **PCR du gène *iudA*, codant pour le bêta-glucuronidase**, la présence de ce gène permet de valider l'identification *E. coli* – *Shigella*.

- **La détection par PCR des gènes codant pour l'invasivité (*ial* et *ipaH*)** pour différencier une souche déficiente de *E. coli* d'une *Shigella*. Ces gènes sont aussi présents chez les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), mais ces derniers sont plus rares.

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisables si besoin

- **Le séquençage du gène *rrs* (codant pour l'ARN 16S) ou du gène *rpoB* (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase)** permet de vérifier l'appartenance des souches aux genres *E. coli*-*Shigella* ou de les classer avec les autres entérobactéries correspondantes grâce à la comparaison aux bases de données.

- **99 tests d'utilisation de sources carbonées avec la galerie Biotype-100** (BioMérieux) pour la caractérisation phénotypique, aidée du logiciel d'identification Recognizer (Taxotron package, IP). Les *Shigella* utilisent moins de substrats que *E. coli*.

- La détection possible au microscope des souches appartenant aux genres *E. coli-Shigella* par **Hybridation *in situ* grâce à une sonde fluorescente spécifique.**

- Méthodes de typage

Sérotypage par agglutination

*** *E. coli***

Il est très difficile d'obtenir des sérums spécifiques pour le sérotypage des *E. coli*. Les sérums utilisés par le CNR proviennent de différents fournisseurs (Eurobio, Biorad, Sifin) et quelques sérums sont fabriqués par le CNR. Chaque sérum est testé à réception avec les souches témoins du sérotype afin d'être validé.

Les sérotypes testés en routine au laboratoire sont : O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164.

La méthode immunologique est très souvent mise en défaut pour les souches de *E. coli* car le nombre de sérotypes potentiels est élevé et le schéma antigénique n'est pas exhaustif.

L'agglutination avec le sérum anti-capsulaire K1 est aussi effectuée en fonction de la demande et du contexte clinique (femmes enceintes, nouveau-nés)

*** *Shigella***

Concernant les *Shigella*, les sérums utilisés sont les sérums Eurobio ou de Sifin ainsi que quelques sérums spécifiques fabriqués au CNR.

On peut ainsi identifier 20 sérogroupes de *S. boydii*, 17 sérogroupes de *S. dysenteriae* et 8 sérogroupes de *S. flexneri*. Les souches de *S. sonnei* sont divisées en 5 biotypes en fonction des caractères biochimiques

Pour les *Shigella*, certains antigènes somatiques O sont identiques ou apparentés à ceux de certaines souches d'*E. coli*. La diversité antigénique de *Shigella* s'exprime par la possible émergence de nouveaux sérogroupes de *Shigella*.

En l'absence d'agglutination avec les sérums dirigés contre les sérotypes connus il paraît important d'utiliser des méthodes de sérotypage moléculaire.

Le sérotypage moléculaire par PCR-RFLP

L'agglutination des souches de *E. coli* est la technique de base, mais cette méthode immunologique est très souvent mise en défaut pour *E. coli* en raison d'un nombre de sérotypes très élevé (plus de 170 antigènes O et 50 antigènes H connus) et le schéma antigénique n'est pas exhaustif (à la différence des *Salmonella*). Le Statens Serum Institut de Copenhague effectue en référence le sérotypage (environ 100 Euro par souche). **Le sérotypage moléculaire**, mis au point à l'IP, **consiste en une analyse des profils de restriction obtenus après amplification de la région génétique *rfb* (antigène O) et du gène *fliC* (antigène H) des *E. coli* et *Shigella*.**

- **L'antigène O** est déterminé après amplification du groupe de gènes *rfb*, codant pour cet antigène, puis restriction enzymatique avec *MboI*. Le profil de restriction ainsi obtenu est comparé à une base de données. Cette base regroupe 250 profils 148 sérogroupes O pour *E. coli* et 55 profils pour 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes O déterminés de façon moléculaire sont notés R (et non O).

- **L'antigène H** est déterminé après amplification du gène *fliC*, codant pour la flagelline chez *E. coli* (gène cryptique chez *Shigella*), puis restriction enzymatique avec *HhaI*. Le profil de restriction ainsi obtenu est comparé à une base de données de plus de 200 profils contenant à l'heure actuelle 70 sérogroupes H de *E. coli* et 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes H déterminés de façon moléculaire sont notés F (et non H).

Cette méthode développée dans notre laboratoire permet presque toujours d'obtenir des résultats (contrairement au typage classique par agglutination). Nous prévoyons d'effectuer le sérotypage moléculaire sur un maximum de souches non agglutinables particulièrement lorsque celles-ci sont responsables d'épidémie ou encore si elles possèdent des gènes de virulence. Les souches qui sont testées en priorité sont les EHEC responsables de SHU.

Le sérotypage moléculaire de l'antigène H par séquençage du gène fliC

Une base de données de séquences de référence pour 92 sérogroupes H de *E. coli* et près de 40 sérotypes de *Shigella* permet de comparer les séquences obtenues par alignement afin de déterminer le H moléculaire (F). Pour *Shigella*, la base est en cours de validation, mais les comparaisons sont plus difficiles à effectuer du fait de l'insertion fréquente de séquences d'insertion (IS) intra-géniques. L'identification bien que plus laborieuse reste le plus souvent possible.

La ribotypie

Cette méthode inventée par l'équipe du Pr Grimont en 1986, est très utilisée pour certaines espèces bactériennes. Cette méthode utilise une sonde d'ARN ribosomique constituée de 5 oligonucléotides correspondant aux deux extrémités de l'ARN 16S et 23S et à la région médiane de l'ARN 23S. Cette sonde est marquée à la digoxigénine et révélée par une méthode immunoenzymatique. Elle est surtout utilisée au CNR en cas d'épidémie à EHEC (on distingue bien O157:H7, O103:H2...)

Cette méthode a été automatisée sous la forme du RiboPrinter® qui permet le ribotypage en 7 h (au lieu d'une semaine)

Le typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) avec l'endonucléase XbaI pour E. coli et Shigella

Cette méthode a fait l'objet d'une standardisation par le réseau PulseNet USA puis PulseNet Europe afin d'obtenir des profils comparables inter laboratoire. Cette méthode permet de vérifier la clonalité des souches, elle est utilisée au CNR et au Laboratoire associé en cas d'épidémie, particulièrement à EHEC.

La méthode reste longue et fastidieuse (environ 3 jours). D'autres endonucléases peuvent aussi être utilisées tel que *BlnI*.

- Détection par PCR des gènes de pathogénicité

La panoplie des gènes de pathogénicité présents chez *E. coli* est imposante. Au CNR, nous effectuons différentes PCR, avec par ordre de priorité :

- La détection des gènes *stx* (*vt*) codant pour les Shiga-toxines ou Vérotoxines chez les *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC ou EHEC) ou encore chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1). Il nous est possible de sous-typier le gène *stx* en 6 variants par un système de PCR et restriction enzymatique.

- La détection du gène d'adhésion **eae** codant «l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales». Ce gène est reconnu comme facteur de pathogénicité important chez les STEC et les *E. coli* entéropathogènes (EPEC).

- La détection du gène **ehlyA** (*hlyA*) codant pour l'entérohémolysine. Ce gène est présent dans 90% des cas chez les STEC.

- La détection de gènes codant l'invasivité : le locus **ial** (Invasion Associated Locus) qui est situé sur le plasmide d'invasivité, et le gène **ipaH** qui est situé à la fois sur le chromosome et le plasmide d'invasivité. Ces gènes sont utilisés pour l'identification des *Shigella* et des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

- La détection du gène **st** codant pour la toxine thermostable ST1a et du gène **lt** codant pour la toxine thermolabile LT. Ces deux toxines peuvent être présentes chez les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC).

- La détection du gène **astA** codant pour l'entérotoxine 1 thermostable (EAST1) présente chez les *E. coli* entéroaggrégants (EAggEC).

- La détection du gène **aggA** codant pour les fimbriae I (AAF/I) responsables de l'adhésion aggrégative présente chez les EAggEC.

- La détection des gènes codant pour les adhésines **PAP, SFA, AFA** chez des souches responsables de diarrhées ou uropathogènes (UPEC).

- La détection d'autres gènes tels que **cnf1** et **aer** dans des souches responsables de septicémie.

La détection par PCR de tous ces gènes s'effectue sur souches isolées ou directement sur les selles. Des systèmes de PCR multiplex sont utilisés pour certains gènes. Certaines PCR sont réalisées dans des cas particuliers (méningite ou sépticémie):

- PCR spécifique du clone hypervirulent O45 : K1, responsable de méningite néonatale en France

- PCR de détection du sous groupe d'ExPEC hautement virulent (ribotype B2₁ / ST 29)

- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Un antibiogramme est réalisé en routine depuis 2006 sur toutes les souches de *Shigella* reçues au CNR. Cet antibiogramme comprend les antibiotiques suivants :

Amoxicilline	Acide nalidixique
Ceftriaxone	Ofloxacin
Ceftazidime	Ciprofloxacine
Streptomycine	Chloramphénicol
Spectinomycine	Tétracycline
Kanamycine	Sulfamides
Gentamicine	Triméthoprim
Amikacine	Cotrimoxazole

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Dans certains cas, la méthode du E-test (AB-Biodisk) est utilisée pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Suite à l'épidémie survenue en 2007, la sensibilité à l'azithromycine est testée en plus, à la fois par la méthode de diffusion et par E-test, pour toutes les souches de *Shigella sonnei* g résistantes à l'amoxicilline et au cotrimoxazole.

- Sérodiagnostic

Seule la recherche dans le sérum des patients d'anticorps anti-LPS, appartenant aux deux classes d'immunoglobulines IgA et IgM, dirigés contre un panel de 23 sérogroupes de *E. coli* fréquemment associés à la survenue de SHU est effectuée, le taux d'anticorps anti-Shiga-toxine étant trop faible. La technique de « line-blot » avec 8 LPS purifiés (liste réduite) ou 24 LPS (liste complète) est utilisée. La recherche est effectuée sur 2 sérums de malades : le 1^{er} prélevé le plus tôt possible après le début du SHU (J-0) et le 2nd prélevé environ 15 jours après (J-15). Cette méthode est très utile dans la surveillance des SHU quand la bactérie n'est plus retrouvée dans les selles.

Liste réduite des LPS

E. coli O26
E. coli O55
E. coli O91
E. coli O103
E. coli O111
E. coli O128
E. coli O145
E. coli O157

Liste complètes des LPS

E. coli O1 ; *E. coli* O2 ; *E. coli* O4
E. coli O14 ; *E. coli* O26 ; *E. coli* O29
E. coli O55 ; *E. coli* O91 ; *E. coli* O103
E. coli O104 ; *E. coli* O105 ; *E. coli* O111
E. coli O113 ; *E. coli* O115 ; *E. coli* O118
E. coli O127 ; *E. coli* O128 ; *E. coli* O136
E. coli O145 ; *E. coli* O153 ; *E. coli* O157
E. coli O163 ; *E. coli* O164

Contrôles : *Shigella. dysenteriae* 1, *Salmonella enterica* sérotypes Enteritidis et Urbana

b- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Dans le cas d'épidémie, la plupart des techniques exposées précédemment sont utilisables pour le suivi de l'épidémie. Pour *E. coli*, nous observons en priorité le sérotypage (par agglutination ou moléculaire) et la présence des gènes de virulence. Par la suite, la clonalité des souches est vérifiée par l'utilisation du PFGE ou encore du ribotypage.

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE ou ribotypage peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

c- Collection de souches

Au CNR-ESC, toutes les souches d'*E. coli* et *Shigella* ont été conservées au laboratoire depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs milliers de souches conservées sommairement avec les informations associées. Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances aux antibiotiques. Les souches importantes sont conservées à -80°C, parmi ces souches, on trouve :

- Les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *E. coli*
- Les souches de référence pour les ribotypes des espèces étudiées.
- Les souches bactériennes servant de marqueur de poids moléculaire pour la ribotypie (France et Etranger)
- Les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- Toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines.

Pour les autres souches, elles sont ensemencées en gélose de conservation et une pièce climatisée est réservée aux collections de souches de l'unité.

À l'hôpital Robert Debré, les souches sont conservées à -80°C dans une pièce dédiée. Plusieurs collections de souches humaines sont ainsi disponibles depuis 1987 :

- Les souches de *E. coli* responsables de SHU de l'enfant.
- Les souches de *E. coli* responsables de méningites néonatales.
- Les souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires de l'enfant.

2.2- Activités d'expertise de l'année 2007

Un total de 1353 souches, 28 selles et 330 sérums ont été reçus et analysés au CNR-IP en 2007. Un total de 55 souches, 144 selles ont été reçues et analysés au laboratoire associé RD en 2007. Soit globalement, **1408** souches, **172** selles et **330** sérums analysés par le CNR-ESC en 2007. La répartition de ces prélèvements est décrite dans le tableau 1.

Tableau 1 : répartition des prélèvements reçus au CNR :

	France métropolitaine	France outre-mer	Étranger	Total
Selles IP	28	0	0	28
Selles RD	144	0	0	144
Total Selles	172	0	0	172
<i>E. coli</i> IP	446	7	2	455
<i>E. coli</i> RD	55	0	0	55
Total <i>E. coli</i>	501	7	2	510
Absence de culture	7	1	0	8
Non <i>E. coli-Shigella</i>	35	2	0	37
Sérums	327	2	1	330
<i>Shigella</i>	757 dont 15 de RD	95	1	853

En plus de ces prélèvements, 197 feuilles d'informations concernant des cas de *Shigella sonnei* ont été renvoyées au CNR, dont 11 de RD. (Exemple de feuille d'information : cf. Annexe 1)

A- *E. coli*

a- Inventaire global des souches et selles de *E. coli* en 2007

Le CNR-IP a reçu au total 455 souches et 28 selles, et le laboratoire associé (RD) a reçu 55 souches et 144 selles, adressées par de nombreux laboratoires hospitaliers, laboratoires d'analyses médicales, facultés de médecine, centres de santé, laboratoires départementaux, et Instituts médicaux ou vétérinaires (tableau en annexe 2).

Parmi les 455 souches reçues à l'IP, 2 venaient de l'étranger (Belgique, Monaco) et 7 d'outre-mer (cf. annexe 2), nous détaillerons les 446 souches provenant de France métropolitaine.

Tableau 2 : Inventaires des souches et selles reçues au CNR pour *E. coli*

	IP	RD	Total
Souches d'origine humaine	442 pour 426 patients	55 pour 52 patients	497 pour 477 patients
Souches d'origine animale ou alimentaire	4		4
Souches vaginales (test K1)	11 pour 11 patients (5 +)		11 pour 11 patients
Souches isolées de selles	350 pour 338 patients*	40 pour 37 patients***	390 pour 374 patients****
Souches urinaires	37 pour 36 patients *	6 pour 6 patients	43 pour 42 patients
Souches sanguines	13 pour 13 patients**	4 pour 4 patients***	17 pour 17 patients
Souches d'autres origines (biopsies, LCR, pus, liq. péritonéal...)	7 pour 6 patients**	5 pour 5 patients	12 pour 11 patients
Souches d'origines non précisées	24 pour 24 patients	5 pour 5 patients	29 pour 29 patients
Selles	28 pour 26 patients dont 12 dans le cadre de la surveillance du SHU	144 dont 7 écouvillons rectaux pour 138 patients***** dont 59 dans le cadre de la surveillance du SHU	172 pour 164 patients***** dont 71 dans le cadre de la surveillance du SHU

* pour un patient, une souche a été isolée dans les selles et dans l'urine

** pour un patient, une souche a été isolée dans le sang et la bile

*** pour un patient, une souche a été isolée dans le sang et les selles

**** pour un patient une souche a été analysée à la fois à l'IP et à RD

***** pour 28 patients à la fois selles et souches ont été envoyés.

b- Résultats obtenus sur les prélèvements de selles

Les 172 prélèvements de selles humaines (164 patients) ont été avec des étiologies variées détaillées dans le tableau 3.

Tableau 3 : étiologies des patients pour lesquels les selles ont été analysées :

Etiologie	Nombre de patients
Inconnue	11
SHU atypique	2
SHU typique ou suspicion	48
Sujets contacts patients SHU	15
Choc septique	3
Crohn	2
Diarrhée (D)	5
Diarrhée sanglante (DS)	40
D + SHU	6
IR / étiologies diverses	7
Hématurie	1
HTA sévère	1
Iléite	2
Micro Angiopathie Thrombotique (MAT)	15
Péritonite	1
Pyélonéphrite	2
Recto Colite Hémorragique (RCH)	2
Syndrome d'Evans	1

De plus, afin d'étudier la prévalence des STEC dans la population d'enfants consultants aux urgences de l'hôpital pour une diarrhée, la recherche de *E.coli* O157 : H7 a été systématiquement réalisée sur les selles aqueuses, et les selles glairo-sanglantes soit, en 2007, 441 selles sur les 1904 selles reçues dans le service de Microbiologie pendant cette période.

Sur les 172 prélèvements de selles, la recherche directe des gènes de pathogénicité par amplification génique *in vitro* a été positive dans 30 cas (dont 22 *stx*+), avec les profils de virulence suivants :

- 15 profils *stx2*+ *eae*
- 4 profils *stx2*
- 1 profil *stx1* + *stx2*
- 2 profils *stx1* + *eae*
- 3 profils *eae*
- 2 profils *eae* + EAST1 (même patient)
- 1 profil EAST1
- 1 profil *eae* + *ial*
- 1 profil *hlyA*

Les résultats de la PCR directe sur les selles ont été corrélés aux résultats obtenus après culture des selles sauf dans 4 cas pour lesquels la PCR directe était négative en raison de la présence d'inhibiteurs dans les selles.

La culture des selles a été réalisée, avant et après enrichissement en eau peptonnée (4 à 6h à 37°C) sur différents milieux : Mac Conkey-Sorbitol (+ tellurite et cefixime), milieu de Drigalski. Seules, dix neuf souches ont pu être isolées, à partir des 22 selles *stx*+, avec les caractéristiques suivantes (Tableau 4):

Tableau 4 : Profils de virulence des 19 souches isolées de selles positives en Shigatoxine

Sérotypes	Nombre de selles	Profil de virulence			
		<i>stx2</i>	<i>stx1 + stx2</i>	<i>stx2 + eae</i>	<i>stx1+ eae</i>
O157 H7	5	1		4	
O 26	2			2	
O 111	1				1
NT	11	1	1	8	1
Total	19				

NT = *E.coli* non sérotypable

c- Analyse des souches de *E. coli* d'origine humaine productrices de Shigatoxines

La présence des gènes codant les **Shigatoxines ou Verotoxines Stx1 (VT1), Stx2 (VT2)** et variants, produites par les *E. coli* responsables de Colite Hémorragique (CH) et de SHU a été recherchée dans tous les prélèvements reçus. Il a également été détecté le **gène *eae*** codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC.

Sur les 449 souches d'origine humaine reçues de France (métropolitaine et outre mer) au CNR IP, en excluant les souches vaginales (11) envoyées pour détermination du K1, reste 438 souches à l'IP (422 patients), et 55 souches à RD (52 patients), soit 493 souches (473 patients, un patient étant commun à IP et RD). En ajoutant les 19 souches précédemment isolées de selle, l'analyse portera sur **512** souches correspondant à **477** patients.

53 souches STEC ou VTEC ont été mises en évidence pour **52** patients (10,9%).

En ne considérant qu'une souche par patient, les **52** souches sont réparties de la façon suivante: (Tableau 5)

Tableau 5 : Répartition des souches STEC par sérotype

	O26	O91	O118	O111	O157	NT	Total
<i>stx1, stx2</i>						1	1
<i>stx1, stx2, eae</i>	1						1
<i>stx1, stx2, eae, ehlyA</i>					1		1
<i>stx1</i>						2	2
<i>stx1, eae</i>				1		2	3
<i>stx2, ehlyA</i>		1*				1	2
<i>stx1, eae, ehlyA</i>	6						6
<i>stx2</i>					1	7*	8
<i>stx2, eae</i>	2				6	12	20
<i>stx2, eae, ehlyA</i>	1		1		6		8
TOTAL	10	1	1	1	14	25	52

NT = *E.coli* non sérotypable , * présence du gène *east1* pour la souche O91 et une des souches NT.

Sérotype O26

Les 10 patients pour lesquels des souches de sérotype O26 ont été isolées se répartissent comme indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6 : Répartition par symptômes, âge et sexe des souches O26
(M= Masculin, F= Féminin)

	< 1 an	1 à 5 ans	
	M	M	F
SHU		2	1
Diarrhée	1	3	1
Non précisé		1	1
Total par sexe et âge	1	6	3

Sérotype O157

Les 14 patients pour lesquels des souches de sérotype O157 ont été isolées se répartissent comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7 : Répartition par symptômes, âge et sexe des souches O157
(M= Masculin, F= Féminin)

	< 1 an	1 à 5 ans		6 à 15 ans	
	M	M	F	M	F
SHU		4	4		1
Diarrhée sanglante					1
Diarrhée	1				
Non précisé		1	1	1	
Total par sexe et âge	1	5	5	1	2
Total par âge	1	10		3	

Souches de Sérotype O91, O111, O118

Ces souches n'ont été isolées que dans un seul cas, soit respectivement :

- O91 : chez une femme de 71 ans présentant une diarrhée banale
- O111 : chez une femme de 78 ans présentant une microangiopathie thrombotique.
- O118 : chez un garçon de 1 an présentant une diarrhée banale

E. coli non sérotypables (NT)

Parmi les souches NT, on retrouve 25 patients dont la répartition en fonction de l'âge du sexe et des signes cliniques est indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Répartition par symptômes, âge et sexes des souches NT, *stx*+
(M= Masculin, F= Féminin).

	< 1 an		1 à 5 ans		6 à 15 ans		> 15 ans	
	M	F	M	F	M	F	M	F
SHU	1	2	6	2*	1	1		1
Diarrhée sanglante				1				1
SHU + diarrhée								1
Diarrhée								2
Entourage /patient SHU				1		1	1	
MAT								1
Non précisé						1		
Total	1	2	6	4	1	3	2	6

*Pour un patient, souche isolée dans l'hémoculture et dans l'écouvillonnage rectal chez une enfant âgée de 3 ans qui est décédée.

Tableau 9 : Caractérisation de la composition en gènes des souches *stx*+ en fonction des signes cliniques

Profil de virulence	SHU	Diarrhée sanglante (DS)	Diarrhée (D)	SHU + DS	SHU + D	Entourage patient SHU	MAT	Non Précisé
<i>stx1, stx2</i>	1							
<i>stx1, stx2, eae</i>								1
<i>stx1, stx2, eae, ehlyA</i>								1
<i>stx1</i>			2					
<i>stx1, eae</i>		1					2	
<i>stx2, ehlyA</i>	1		1					
<i>stx1, eae, ehlyA</i>			5					1
<i>stx2</i>	4	1			1			2
<i>stx2, eae</i>	16					3		1
<i>stx2, eae, ehlyA</i>	2	1	2	1				2
TOTAL	24	3	10	1	1	3	2	8

La mise en évidence de 2 des variants du gène *stx2*(*stx2c*, *stx2d*) a été réalisée sur 48 souches de notre collection selon la méthode J. Osek (Journal of Applied Microbiology 2003). Parmi ces 48 souches, 22 étaient de sérotype O157, 24 non sérotypables, une de sérotype O111 et une de sérotype O26. Les profils de virulence étaient les suivants : *eae+stx2* (n=39), *eae+stx1+stx2* (n= 2), *stx2* seul (n=5), *stx1+stx2* (n=2)

Les résultats de la recherche des variants *stx2* sont reportés dans le tableau 10.

Tableau 10 : analyse des variants *stx* :

STEC	N	Variants <i>stx2</i>			
		<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2c+ stx2d</i>	negatif
O157	22	2	1	13	6
O111	1		1		
O26	1				1
NST	24		1	3	20

NST= non sérotypable

Le profil *stx2c+stx2d* a été retrouvé le plus fréquemment chez les STEC O157.

Cette recherche sera étendue aux autres variants *stx* et réalisée sur l'ensemble de notre collection et ce afin de corréler la présence d'un variant *stx2* à la survenue de complications majeure au décours d'une infection à STEC.

d- Sérotypage moléculaire des souches STEC non sérotypables

Les résultats du sérotypage moléculaire de 26 souches : 14 de 2007 et 12 de 2006 souches sur les 26 souches non sérotypables par agglutination sont présentés ci dessous. L'analyse des autres souches est en cours.

Tableau 11 : Résultats du sérotypage moléculaire de 26 souches non sérotypables

Année	N°RD	N°IP	Agglutination	PCR	Sérotypage moléculaire	
			NT	virulence	O	H
2007		#07-1753	NT	<i>stx1</i>	NT*	F18
2007		#07-7850	NT	<i>stx1</i>	R117	F7
2007	CABSYB	#08-0477	NT	<i>stx1, stx2, hlyA, saa</i>	R5**	F18
2007		#07-3141	NT	<i>stx2</i>	R174	F21
2007		#07-7369	NT	<i>stx2</i>	NT*	F16
2007	ALAABD	#07-1546	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	NT*	F 19
2007	AUDALE	#08-0482	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R121	F19
2007	HEITOB	#08-0475	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R121	F19
2007	LAFQUE	#08-0484	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R121	F19
2007	LAUMEL	#07-1552	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R 121	F 19
2007	VANFLO	#07-1542 (C2)	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	NT*	F 25
2006	DABDIA	#07-1548	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R 123	F 11
2006	JARMAR	#07-1550	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R 157	F 7
2006	ROUNOE	#07-1549	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	NT*	F 25
2006	SENTHY	#07-1545	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	R 80	F 2
2006	VILLUC	#07-1547	NT	<i>stx2, eae, hlyA</i>	NT*	F 25
2007		#07 0287	NT	<i>stx2, east1</i>	R8a	F8
2007		#07 2787 ou #07 2800	NT	<i>stx2, hlyA</i>	NT*	F18
2006	DELFAB	#07-1553	NT	<i>stx2, hlyA</i>	NT*	F 14
2006	PERPAU	#07-1554	NT	<i>stx2, hlyA</i>	R 145	F 28
2006	DEBMAT	#07-1555	NT	VT- (<i>stx2, eae</i>) ^a	R 101/162	F 7
2006	DUG ^b	#07-1544	NT	VT- (<i>stx2, eae</i>) ^a	R26a, NT*	Nd, F 18
2006	LORYUN	#07-1556	NT	VT- (<i>stx2, eae</i>) ^a	R 2b	F 1
2006	MERCHA	#07-1551	NT	VT- (<i>stx2, eae</i>) ^a	R 4	F 5
2006	WATPET	#07-1543	NT	VT- (<i>stx2</i>) ^a	NT*	F 4 ?
2007	HEIBEA	#08-0474	NT	VT- (<i>stx2, eae</i>) ^a	NT*	F17

NT= non sérotypable

^a type RD, VT+, souche recue par IP, VT-.

^b type RD, VT+, 2 souches recue par IP, VT-, une R26, l'autre nst.

* : pas de profils correspondant dans la base de donnée

** : profil le plus proche dans la base

Il est intéressant de noter l'appartenance de 4 souches au sérotype O121. On peut aussi remarquer le défaut de sensibilité des réactions d'agglutination car les sérotypes O157 et O145 devraient être identifiés par agglutination.

e- Analyse globale des gènes de virulence des souches de *E. coli* non STEC reçues au CNR (IP).

Sur les 497 souches d'origine humaine (pour 477 patients) reçues de France métropolitaine, en excluant les souches vaginales (11 souches pour 11 patients) envoyées pour détermination du K1, et les souches STEC (53 souches pour 52 patients), 433 souches (414 patients) ont été étudiées.

Pour l'étude de la répartition par sérotype et gènes de virulence nous considérerons une souche par patient, sauf dans les cas où chez un même patient a été isolé des souches avec un sérotype ou une composition en gène différent.

Tableau 12 : analyses des sérotype et gènes de virulence des souches non-STECC

	<i>AAF1</i>	<i>aer</i>	<i>AFA</i>	<i>AFA, aer</i>	<i>eae</i>	<i>bfpA</i>	<i>eae, EAST1</i>	<i>eae, EAST, ehlyA</i>	<i>eae, ehlyA</i>	<i>EAST1</i>	<i>EAST1, ehlyA</i>	<i>EAST1, PAP</i>	<i>EAST1, PAP, SFA</i>	<i>ipaH</i>	<i>ial, ipaH</i>	<i>PAP</i>	<i>PAP, aer</i>	<i>PAP, SFA</i>	<i>SFA</i>	<i>hlyA</i>	<i>LT</i>	sans gène	Total
NT		6 ^a	2	1	17				1	28 ^b		2	1	1	1	9	2	2	4	1 ^b	1	219 ^{acd}	298
O25										1												3	4
O26					7			1	8													7	23
O44																						4	4
O55					5																	3	8
O78										1												1	2
O86	1				2					1												4	8
O91																						3	3
O103							1															1	2
O111										5	1											2	8
O114																						1	1
O118																						1	1
O119					3	2																1	6
O125																						2	2
O126										2												7	9
O127					4																	3	7
O128					3					1 ^c												5	9
O142						2																	2
O145									1														1
O157					1				2														3
O158										1													1
rough			1							5								2				8	16
Total	1	6	3	1	42	4	1	1	12	45	1	2	1	1	1	9	2	4	4	1	1	263	418

Les 4 patients pour lesquels deux souches avec des résultats différents ont été isolées sont indiqués par une lettre en exposant sur les caractéristiques des 2 souches qui lui correspondent.

^d= un patient pour lequel une souche STEC a été retrouvée.

f- Sérodiagnostic des Syndromes Hémolytiques et Urémiques (IP)

Un total de **330 sérums**, reçus de différents services pédiatriques et de laboratoires d'analyses médicales ayant participé au réseau de surveillance des SHU, ont été analysés.

Le CNR-ESC a recherché les anticorps anti-LPS, appartenant aux 2 classes d'immunoglobulines IgA et IgM, dirigés contre 8 sérogroupes de *E. coli* (O157, O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145) dans la majorité des cas .

En France métropolitaine, les sérums se répartissaient de la façon suivante :

Pour 184 patients, 1 seul sérum a été analysé

pour 56 patients, 2 sérums ont été analysés à 15 jours d'intervalle

pour 9 patients, 3 sérums ont été envoyés

pour 1 patient, 4 sérums ont été envoyés.

En considérant un sérum par patient, soit **250 sérums**, le bilan des résultats obtenus est le suivant : (tableau 13).

Tableau 13: Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS

	< 1 an		1-5 ans			6-15 ans			16-64 ans		> 65 ans		NR		Total
	M	F	M	F	NR	M	F	NR	M	F	M	F	M	F	
O26															0
O55												1			1
O91															0
O103			1	1		1				3					6
O111						1						1			2
O128			1	1											2
O145				2					1	1					4
O157			18	11		4	6		6	10	2	1			58
Total Positifs	0	0	20	15	0	6	6	0	7	14	2	3	0	0	73
Négatif	0	3	30	19	1	9	8	1	39	34	14	17	0	2	177
Total	0	3	50	34	1	15	14	1	46	48	16	20	0	2	250

M= Masculin, F= Féminin, NR = non renseigné

29,2 % des 250 patients, pour lesquels au moins un sérum a été analysé, ont révélé la présence d'anticorps anti-LPS, avec pour 76,7% des positifs, des anticorps anti O157.

Pour les 66 patients pour lesquels au moins 2 sérums ont été prélevés :

- 39 ont présenté des résultats négatifs dans les 2 cas (59%) avec des délais entre les deux prélèvements de sérum de 1 à 86 jours (moyenne 20,5 jours)
- 21 ont présenté des résultats positifs dans les 2 cas (32 %) avec des délais entre les deux prélèvements de sérum de 2 à 60 jours (moyenne 16,6 jours)
- 3 ont présenté un premier sérum négatif et un deuxième positif (4,5%), avec des délais différents entre les deux prélèvements de sérum : 13 jours (O157), 18 jours (O111), et 57 jours (O55)
- 3 ont présenté un premier sérum positif et un deuxième négatif (4,5%) avec des délais entre les deux prélèvements de sérum de 15 à 30 jours (O157)

En analysant les sérums testés pour 37 patients ayant présenté au moins une sérologie positive et dont la date de début de SHU (J-0) était disponible, des sérologies positives de J-0 à J-62 et négatives de J-0 à J-31 ont été retrouvées. La réponse immunitaire était différente chez chaque patient.

Comparaison des résultats obtenus pour les sérums et selles ou souches chez un même patient :

Tableau 14 : comparaisons des résultats obtenus pour les souches et sérums de 20 patients (coli souche serum selle)

	PCR selle ou souche	Sérotype	Sérologie
AMO MAR	neg		neg
AUB MAR	stx2, hlyA	NT*	neg
BEL LOG	neg		neg
BOR BAR	PAP, SFA	NT	O157
COL MAR	neg		neg
DAN DYL	neg		neg
DEL PRE	neg		O157
DUB CAM	stx2, eae, hlyA	O26	neg
FRA SAM	eae, hlyA	O145	O103
GAL SAR	neg		O157
GON AGN	neg		neg
LAC GEO	neg	NT	neg
LAK HAB	stx1, stx2, eae, hlyA	O157:H7	O157
LOU TIM	neg	NT	neg
LUC SYL	AFA	NT	O157
MAN LUC	neg		O157
MAR MAR	neg		neg
MIG LEA	neg		O157
PEY MON	neg	NT**	neg
RAD AND	neg	NT	neg

NT= non sérotypable

neg = négatif

* : sérotypage moléculaire : R=NT (pas de profil correspondant), F=18

** : sérotypage moléculaire : R=NT (pas de profil correspondant), F=19

Pour 20 patients les analyses ont été effectuées à la fois sur la souche (ou les selles) et sur le sérum. La sérologie a permis d'obtenir un diagnostic dans 8 cas, alors que seulement 3 souches ont pu être sérotypées et 3 souches *stx*+ identifiées. Pour les 10 souches isolées, l'agglutination est moins sensible que la sérologie pour 2 souches, et inversement pour une souche O26. Les bandelettes de line blot semblaient mal répondre au sérotype O26 pourtant 2 LPS O26 sont déposés pour chaque analyse. On note une discordance de résultats dans un cas (O145/O103). Pour 2 souches non typables des anticorps anti O157 ont été détectés.

g- Souches de *E. coli* extra intestinaux

Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de méningites néonatales (ECM).

Le laboratoire associé a reçu **15** souches de *E.coli* isolées de LCR de nouveau-nés atteints de méningites néonatales. Les caractéristiques de ces souches sont représentées ci-dessous

(Tableau 14). La PCR spécifique O45 a été réalisée sur les souches appartenant au groupe B21 (n=9) ; deux souches étaient positives

Tableau 15 : résultats de l'étude des souches de méningites néonatales

souche	Origine	Date naissance	Date /PL	gpe	PCR O45	K1	ChuA	Hra	YjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	iroN
257	Aulnay	04/08/2006	13/08/2006	B21	neg	+	+	-		+	+	-	-	+	-	II	-	-
258	Arpajon	02/08/2006	06/10/2006	B21	neg	+	+	+		+	+	+	+	-	+	-	+	+
259	Nice	20/10/2006	21/10/2006	D		-	+	-		-	-	-	-	-	+	-	-	+
260	Limoges	04/10/2006	08/10/2006	B21	neg	+	+	-		+	+	-	-	+	+	II	-	+
261	St Michel	20/10/2006	24/10/2006	B2		-	+				+	-	-	-	+	-	-	-
262	Blanc Mesnil	29/01/2007	02/02/2007	B1		-	-	-		+	+	-	-	+	+	-	-	+
263	Evry	26/01/2007	08/02/2007	B21	neg	+	+	-		+	+	-	-	+	+	II	-	+
264	Louis Mourier	21/02/2007	06/03/2007	D		+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-
265	Tenon	22/02/2007	24/02/2007	D		+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-
266	Rennes	12/04/2006	24/04/2006	B21	neg	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	II	-	+
267	Eaubonne	20/05/2007	02/06/2007	B21	pos	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+
268	Longjumeau	02/04/2007	02/05/2007	B2		+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
269	Lyon	19/10/2006	13/03/2007	B21	neg	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	II	-	+
270	Libourne	01/04/2007	24/05/2007	B21	neg	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+
271	Nice	12/07/2007	26/07/2007	B21	neg	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+
272	Grenoble	01/08/2007	12/08/2007	B21	pos	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+
273	Gonesse	17/05/2007	20/05/2007	B21	neg	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+
274	Nantes	21/10/2007	29/10/2007	B2		+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+

* pour PAP G : les résultats positifs sont indiqués par II pour PAP GII positif et III pour PAP GIII positif.

Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de septicémies chez le nourrisson de moins de 3 mois

Le laboratoire associé a isolé 11 souches de *E. coli* isolées des hémocultures de nourrissons < 3 mois dont les caractéristiques sont représentées dans le tableau 16. Ces souches sont incluses dans l'étude multicentrique COLIBAFI effectuée en collaboration avec le Pr Denamur.

Tableau 16 : facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de septicémies

Souche	DN	Isolée le	Sexe	Ag K1	Gpe	sfa/foc	iroN	papC	papG II	fyuA	hly	cnf1	aer
24784	29/01/2007	02/02/2007	F	-	B1	-	+	+	-	+	-	-	+
24771	05/02/2007	07/02/2007	M	+	B2	-	+	-	-	+	-	-	-
24971	25/02/2007	24/02/2007	M	+	B21	-	-	+	+	+	-	-	-
25151	16/03/2007	25/04/2007	F	-	B2	+	+	+	+	+	+	+	+
25735	23/07/2007	26/08/2007	M	+	D	-	-	+	+	+	-	-	+
25791	13/07/2007	04/09/2007	M	+	B21	-	+	+	+	+	-	-	+
25888	22/09/2007	22/09/2007	M	+	B2	-	+	+	+	+	-	-	+
26602	24/10/2007	22/10/2007	F	+	B21	-	+	+	+	+	-	-	+
26121	27/10/2007	29/10/2007	M	+	B2	-	-	+	+	+	-	-	+
26210	15/08/2007	10/11/2007	M	-	B2	-	-	-	-	+	-	-	-
26366	24/09/2007	04/12/2007	F	-	D	-	-	+	+	+	-	-	+

B-Shigella

Durant l'année 2007, le CNR-ESC a reçu et étudié 865 souches envoyées comme *Shigella*. 853 souches ont été identifiées comme *Shigella*, 69 comme *E. coli* (9%) et 16 comme étant ni *E. coli*, ni *Shigella* ou n'ayant pas pu être cultivées. Parmi les 853 souches, 757 souches ont été identifiées chez 741 patients en France métropolitaine, 95 souches ont été identifiées chez 92 patients originaire de DOM-TOM (une de Guadeloupe, 3 de Martinique, 82 de Guyane française, 4 de la Réunion et 2 de Mayotte) et une souche a été identifiée chez 1 patient au Luxembourg (cf. tableau Annexe 2).

De plus, **197** fiches d'informations ont été envoyées au CNR pour signaler une infection à *Shigella*. En compilant informations plus souches et en éliminant les doublons entre les deux, un total de **1035** souches de *Shigella* a été répertorié au CNR en 2007 (dont 752 souches humaines et 190 informations de souches humaines isolées en France métropolitaine).

a- Analyses des 752 souches reçues de 740 patients en France métropolitaine en 2007

La répartition des différents sérotypes de *Shigella* est indiquée dans les tableaux 17 à 21.

- Tableau 17 : *Shigella boydii* (47 souches pour 47 patients)

Sérotipe	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
1	3	59, 69, 92	Familiale (? , 59, Maroc)	Maroc (2)
2	22	6, 10, 13, 26, 31, 43, 67 (2), 69 (2), 74, 75 (2), 76, 78 (2), 90, 92, 93 (2), 95 (2)	Familiale (2, 92, sœurs)	Egypte, Maroc, Soudan
3	1	94		Inde
4	7	11, 16, 28, 69, 75, 92, 93		Ethiopie, Maroc (2)
10	1	75		
13	1	9		
18	5	51, 60, 68, 91, 95		Maroc, Togo
19	2	68, 95		Haïti, Mali
20	5	1, 31, 61, 94, 95	Collective (5, 61, Kenya)	Chine, Kenya, Mauritanie

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

- Tableau 18 : *Shigella dysenteriae* (24 souches pour 24 patients)

Sérotipe	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
2	6	6, 38, 51, 69 (2), 81		Inde (2), Madagascar
3	8	34, 35, 66, 69, 71, 78, 92, 94		Maroc (2), Côte d'Ivoire
4	2	49, 63		Afrique du nord, Inde
5	1	72		
97-10607	7	28, 42, 64, 69, 72, 93, 94	Collective (40/100, 28, Egypte)	Cap Vert, Egypte, Sénégal

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

- Tableau 19 : *Shigella flexneri* (316 souches pour 310 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
1				
1a	8	31, 42, 44, 47, 69, 74 (2), 83		Cameroun, Inde, Madagascar
1b	47	2 (2), 14, 21, 27, 29, 31, 34, 44, 45, 51 (2), 53, 59 (3), 60, 66, 67 (2), 69 (7), 73 (3), 74, 75 (3), 76, 77 (2), 78 (2), 80, 85, 92, 93 (2), 94 (2), 95	Familiale (3, 2, Maroc) Familiale (2, 67, Egypte) Familiale (?, 59)	Burkina Faso, Centrafrique, Congo, Egypte (2), Italie, Madagascar, Maghreb, Mali (3), Maroc (7), Mauritanie, Pakistan, Rép. Dominicaine (2), Sénégal, Tchad
2a	95	3, 6, 9, 16, 21, 22 (2), 24, 29, 33, 38, 44, 45 (4), 51, 57, 59 (2), 60, 61, 67, 69 (11), 72 (3), 74 (2), 75 (14), 76, 77 (3), 78 (3), 81 (2), 85 (4), 86 (2), 87 (4), 92 (5), 93 (7), 94 (4), 95 (7)	Familiale (2, 87, mère-fils) Familiale (4, 93, frères-sœurs) Familiale (2, 95, sœurs)	Afrique (3), Bénin, Cameroun, Egypte (3), Grèce, Guadeloupe, Inde (5), Irlande, Madagascar (2), Maldives, Mali, Maroc (2), Mauritanie (2), Népal, Nigeria, Océan indien, Rajasthan, Rép. Dominicaine (2), Sénégal (5)
2b	8	13, 31, 67, 69, 75, 77, 80, 93		Ile Maurice, Madagascar, Mauritanie
3a	62	4, 6, 14, 26 (2), 29, 31, 35, 38, 42, 44 (2), 45, 47, 60, 61, 66, 69 (4), 71 (2), 75 (13), 77, 78 (3), 83 (2), 85, 91 (4), 92 (2), 93 (7), 94 (3), 95 (2), ?	Familiale (2, 26, frère-sœur)	Afrique, Algérie, Italie, Madagascar (3), Mali (3), Maroc (2), Mauritanie (2), Pérou-Amazone, Rép. Dominicaine, Sénégal, Togo
3b	3	38, 78, 88	Collective (2, 78, restaurant chinois)	Algérie
4	18	15, 31, 44, 49, 52, 69 (3), 72, 73, 74, 75 (2), 76, 78, 92, 93, 95	Collective (8, 52, Sahara)	Egypte, Madagascar, Maroc (2), Mauritanie, Niger, Sahara, Thaïlande
4a	1	75		Mali
4c	2	33, 85		Côte d'Ivoire
4 variété Saigonensis	2	13, 45		Inde, Cameroun
6 Boyd 88	41	3 (3), 11, 13, 14, 25, 29, 31, 35, 40, 41, 42, 44 (3), 45, 50, 52*, 56, 67, 69 (5), 71, 75 (3), 78, 86, 91 (2), 92, 93 (4), 94, 95	Familiale (2, 93, frère-sœur) Familiale (2, 93)	Afrique, Egypte (2), Inde, Madagascar, Maroc (7), Tunisie
6 Herfordshire	5	67, 75, 79, 91, 92		Afrique, Maroc
6 Manchester	1	44		
X	1	44		Mayotte
Y	1	51		
Non sous typable (nst)	15	31, 35, 51, 59, 69, 75 (2), 78, 86, 92 (3), 93, 95 (2)		Cameroun, Egypte, Guinée, Inde, Madagascar (2), Mali (2), Togo

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

*Contamination d'une technicienne par un réactif contrôle de laboratoire.

- Tableau 20 : *Shigella sonnei* (357 souches pour 351 patients*)

biotypes	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
<i>a</i>	16	21, 26, 28, 33, 36, 44, 51, 74, 75 (3), 76, 82, 89, 92, 95	- Collective (?, 89, gens du voyage)	Guatemala, Monténégro, rép. Dominicaine, Tahiti, Venezuela, Yémen
<i>e</i>	1	93		
<i>g</i>	241	2, 3, 6, 7, 13 (3*), 14, 20, 21 (2), 22, 25, 26, 28 (5), 29 (2), 30 (2), 31 (4), 33, 34 (2), 42 (2), 44 (7), 45, 46, 47 (2), 49 (2), 50 (2), 51 (3), 56 (2), 57 (2), 59 (8), 60 (5), 61, 62, 66, 67 (4), 69, 71 (2), 72 (2), 73 (2), 74 (2), 75 (50), 77, 78 (10), 80, 82, 85, 88 (2), 89 (6), 91 (7), 92 (8), 93 (20), 94 (33), 95 (16), ?	- Collective (2, 34, viande ?) - Collective (?, 56, communauté homosexuelle) - Collective (5 ou +, 89, gens du voyage) - Collective (33, 75) + (2, 78) + (3, 92) + (12, 93), + (25, 94), + (10, 95) communauté juive d'Ile de France**)	Afrique (2), Birmanie, Cameroun, Centrafrique, Congo (3), Egypte (15), Espagne, Grèce, Inde (10), Israël (2), Italie, Jordanie, Kenya, Laos, Mali, Maroc (5), Mexique (4), Moyen Orient, Népal (3), Pays bas, Turquie, Vietnam (2)
<i>g (Man-)</i>	47	1 (2), 4, 6 (2), 13, 17, 21, 28, 31, 33 (3), 34, 37, 44, 50(2), 58 (2), 60 (2), 64, 72, 74, 75 (4), 77 (2), 78, 82, 89, 91, 92, 93 (6), 94 (2), 95 (2), ?	- Familiale (?, 17, fruits de mer) - Familiale (?, 44, Maroc) - Familiale (2, 50, steak haché) - Familiale (5,91, Maroc) - Familiale (2,94, Maroc)	Espagne, Madagascar, Maroc (17)
<i>g (Man-, ODC-)</i>	1	31		
<i>g (ONPG-)</i>	43	3, 4, 6 (2), 14, 19, 22, 25, 33, 37, 42, 44 (2), 58, 62, 67 (3), 69, 73, 75 (3), 77 (2), 78, 79, 92 (6), 93, 94 (3), 95 (6)	- Collective (?, 44, Sénégal) - Familiale (?, 37, Ouzbékistan)	Afrique, Algérie, Burkina Faso, Cap Vert (2), Nigeria, Ouzbékistan, Pakistan, Sénégal (2), Tunisie (5)
<i>g (ONPG-, Man-, ODC-)</i>	2	34, 78		Tchad
<i>Lac +</i>	1	13*		Népal

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

* 2 souches différentes isolées d'une même patiente.

** Épidémie dans la communauté juive d'Ile de France, détaillée dans la partie 3-3

- Tableau 21 : *Shigella* non sérogroupable (8 souches pour 8 patients):

Sérogroupe	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
<i>Non sérogroupable</i>	8	11, 33, 39, 45, 73, 75 (3)	Familiale (2, 33, mari-femme, Inde)	Angola, Cameroun, Inde, Mali, Maroc, Tchad

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

b- Bilan des feuilles d'informations reçues au CNR (197 fiches pour 195 patients)

Ces feuilles d'informations ont été établies pour répertorier les cas de *Shigella sonnei* au niveau de la France métropolitaine. Sur ces feuilles d'informations deux cases permettent de noter le caractère ONPG et Rhamnose de la souche, ce qui permet, de définir le biotype. Le tableau 22 présente les résultats obtenus à partir de ces comptes-rendus pour 190 patients sur les 195 (pour 5 patients les souches ont été envoyées en parallèle par un autre laboratoire et ont été comptabilisées dans le tableau 20).

- **Tableau 22 : résultats des feuilles d'information *Shigella* (190 souches /190 patients)**

Sérotype	Sérovar	Nombre de cas	Départements d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
flexneri	non précisé	2	91, ?		Mali
sonnei	a	3	59, 69, 75		Belgique, Madagascar
sonnei	g	30	38 (2), 50, 51, 59 (6), 63, 67 (2), 74, 75 (9), 80 (2), 87, 92, 95 (3)	Familiale (2, 80) Collective (33, 75) + (2, 78) + (3, 92) + (12, 93), + (25, 94), + (10, 95) communauté juive d'Ile de France**)	Algérie, Gabon, Egypte, Inde, Madagascar, Turquie
sonnei	g (ONPG -)	11	6, 31, 38, 44, 67 (3), 91 (2), 93, 95		Sénégal
sonnei	non précisé	144	1 (2), 9, 13, 14, 25, 26 (4), 27 (2), 28 (2), 31 (2), 32 (2), 33, 36 (2), 38 (3), 40, 43, 44 (2), 45, 47, 49 (2), 50 (2), 51 (2), 53 (2), 54, 57, 58 (2), 59 (6), 60(2), 69 (37)*, 74, 75 (8), 76 (3), 77 (5), 78 (11), 84, 85, 86, 87, 90 (2), 91, 92 (9), 93 (7), 94 (2), 95 (4)	Familiale (2, 53) Familiale (?, 13) Familiale (2, 57) Familiale (5,93) Familiale (2, 32) Familiale (2, 93) Collective (33, 75) + (2, 78) + (3, 92) + (12, 93), + (25, 94), + (10, 95) communauté juive d'Ile de France**)	Afrique (2), Algérie (3), Cap vert, Congo, Côte d'Ivoire, Egypte (2), Espagne, Inde (2), Madagascar (2), Maroc (6), Tchad, Tunisie (3), Turquie, Vietnam (3)

a - nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b - si épidémie : type (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination si précisé)

* la plus part sont des nformations envoyées par le laboratoire Marcel Merieux provenant de différents départements non précisés.

** Épidémie dans la communauté juive d'Ile de France, détaillée dans la partie 3-3

c- Souches reçues d'outre-mer (95 souches pour 92 patients)

- Tableau 23: répartition des souches reçues d'outre mer

Sérotype	Sérovar	Nombre de patients				
		Guadeloupe	Martinique	Guyane	Réunion	Mayotte
<i>Shigella dysenteriae</i>	2					1
<i>Shigella dysenteriae</i>	3				1	
<i>Shigella dysenteriae</i>	97-10607					1
<i>Shigella flexneri</i>	1a			1		
<i>Shigella flexneri</i>	1b			4		
<i>Shigella flexneri</i>	2a			35		
<i>Shigella flexneri</i>	3a			23		
<i>Shigella flexneri</i>	3b	1		1		
<i>Shigella flexneri</i>	6 boyd 88			5		
<i>Shigella sonnei</i>	a		3	1	2	
<i>Shigella sonnei</i>	g			12		
<i>Shigella sonnei</i>	g (ONPG -, ODC -, man -)				1	

d- Shigella d'origine non humaine (5 souches)

Cinq souches d'origine non humaine ont été analysées par le CNR en 2007. Une des souches provenait d'un contrôle de laboratoire à l'origine de la contamination d'une technicienne. Les 4 autres souches provenaient de fèces de singe.

- Tableau 24 : analyse des souches d'origine non humaine

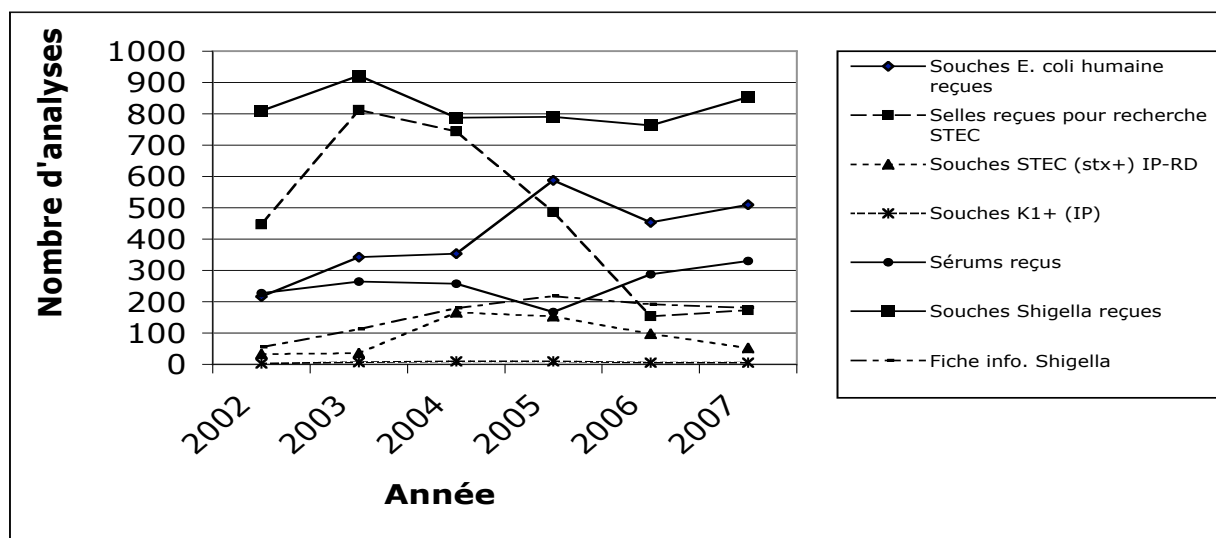
Sérotype	Sérovar	aliment ou réactif	Nombre de souche	Département d'isolement	origine
<i>Shigella flexneri</i>	6 boyd 88	réactif contrôle du « Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique » (CTCB), bac 0741 *	1	52	
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	Fèces de macaque	1	1	Asie
<i>Shigella flexneri</i>	2a	Fèces de macaque	1	1	Asie
<i>Shigella flexneri</i>	6 boyd 88	Fèces de macaque	1	1	Asie
<i>Shigella flexneri</i>	y	Fèces de macaque	1	1	Non précisé

*Contamination d'une technicienne par un réactif contrôle de laboratoire.

C- Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR

Une analyse de l'activité du CNR depuis 2002 dans les différents domaines d'expertise est représentée ci-dessous.

Figure 1 : Courbe d'analyse de tendance de l'activité du CNR depuis 2002 :



On note une augmentation de l'activité du CNR pour les *E. coli* et *Shigella*, L'augmentation chez *Shigella* est due aux 2 pics épidémiques survenus cette année dans la communauté juive d'Ile de France. Par contre le nombre de souches stx+ est en baisse.

3. Activités de Surveillance

3.1- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

A- Réseau partenaire

Le CNR et le laboratoire associé collaborent bien sûr entre eux, afin de s'échanger les données et/ou les souches, permettant la validation des résultats des analyses faites pour un même patient (exemple : sérologie et typage de souche). Mais avant tout, le CNR et le laboratoire associé collaborent avec tout un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (Laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

La liste des laboratoires expéditeurs est présentée en annexe 2

B- Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

- Distribution des souches d'*E. coli* :

Tableau 25: Répartition par âge, sexe et sérotype des 131 patients chez lesquels a été isolée une souche sérotypable par agglutination :

	< 1 an			1-5 ans			6-14 ans		15-64 ans		> 65 ans		NR		Total
	M	F	NR	M	F	NR	M	F	M	F	M	F	M	F	
O25	1			2							1				4
O26	2	2		13	11				1	1	2	1			33
O44				2					1			1			4
O55	1	3		3	2										9
O78				1	1				1						3
O86		1		4	2							1			8
O91	1											1			2
O103							1		1						2
O111	1			4	2	1						1			9
O114			1												1
O118				1					1						2
O119	1	1		2	2					1					7
O125					1										1
O126	1			7			1								9
O127				4	2					1					7
O128		2		2	5										9
O142		2													2
O145													1		1
O157	1	1		5	5		1	2	2						17
O158							1								1
Total	9	12	1	50	33	1	4	2	7	3	2	6	1	0	131

Tableau 26 : Répartition par âge et sexe des 613 patients (443 IP, 171 RD dont un patient en commun) chez lesquels a été effectuée une recherche d'*E. coli* (selle ou souche):

Patients	F	M	NR	Total
15 - 65 ans	99	73		172
>65 ans	46	22	1	69
< 1 an	46	39	4	89
1- 3 ans	78	116	3	197
4- 6 ans	17	21		38
7 - 10 ans	5	15	1	21
11 - 15 ans	11	9		20
NR	2	5		7
Total	304	300	9	613

M= Masculin, F= Féminin, NR = non renseigné

Figure 2 : Répartition par département (en fonction des laboratoires demandeurs) du nombre de souches et prélèvements reçus pour sérotypage et/ou caractérisation des gènes de virulence d'*E. coli*, en 2007

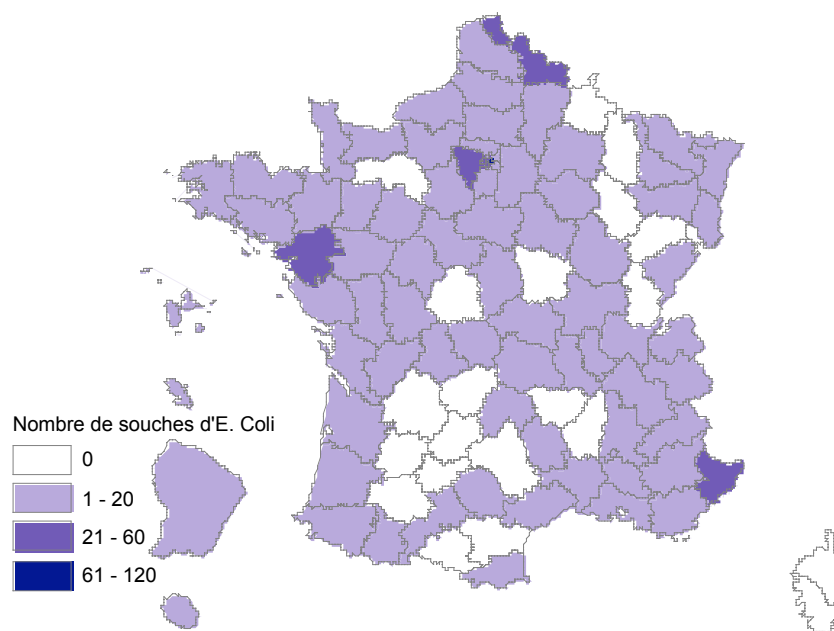
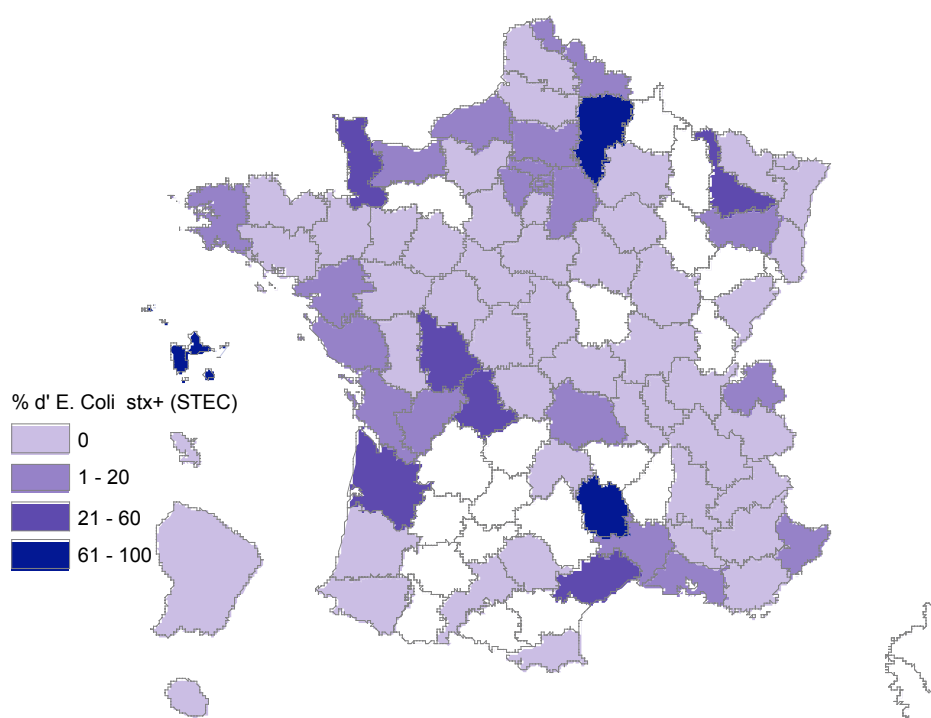


Figure 3 : Pourcentage des patients ayant une souche et/ou un prélèvement contenant un STEC (*stx+*) par département d'origine des patients, en 2007



- **Répartition des analyses sérologiques :**

Figure 4 : Répartition par département (en fonction des laboratoires demandeurs) du nombre de sérologie *E. coli* reçues en 2007

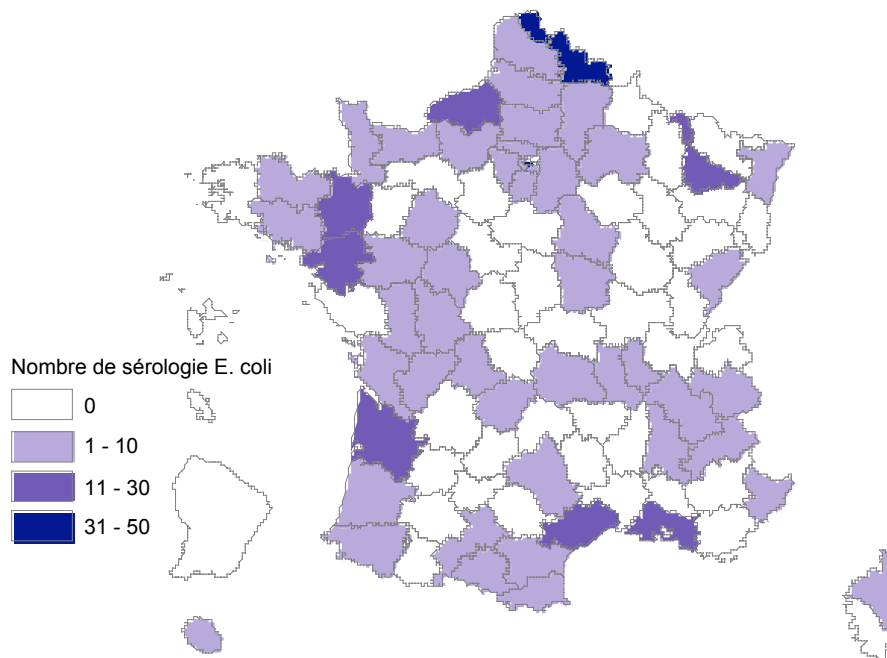
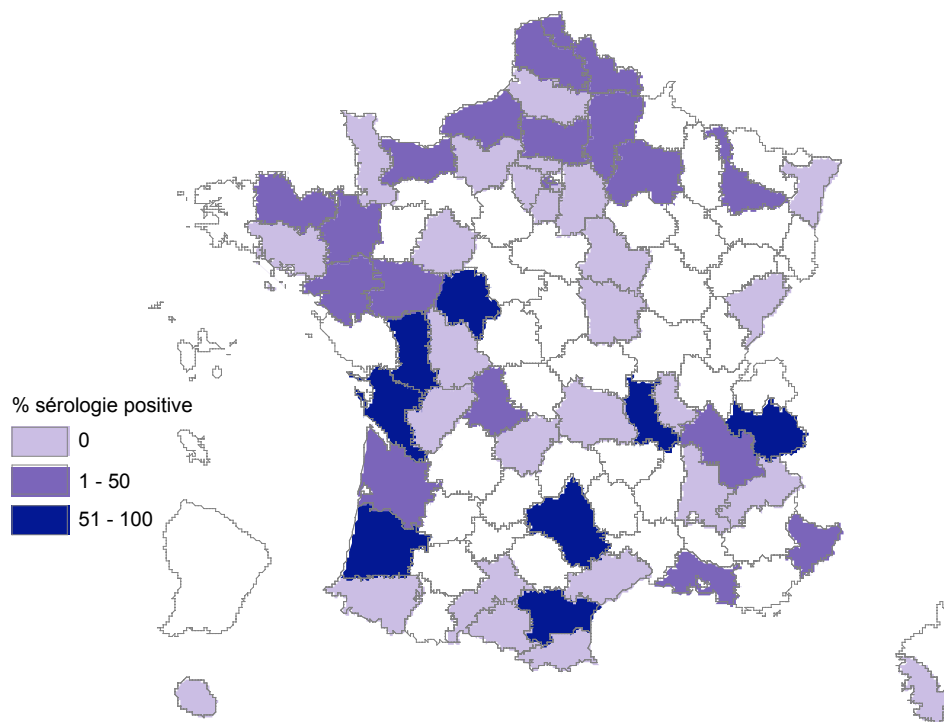
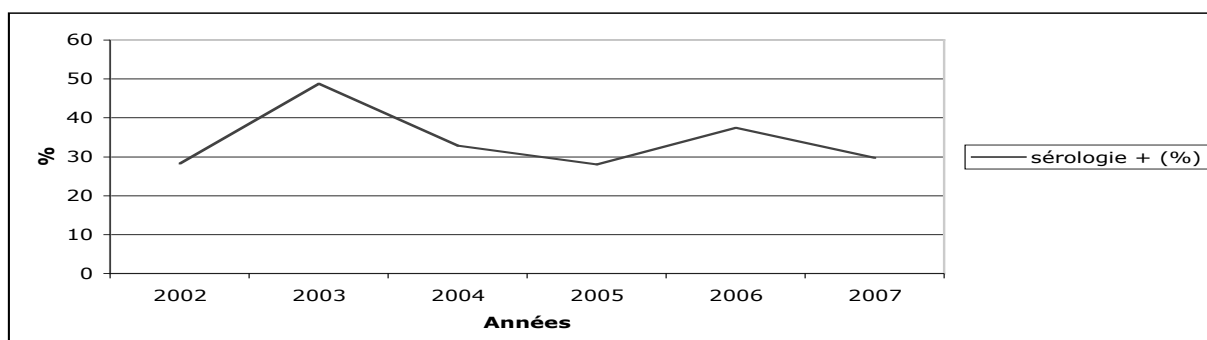


Figure 5 : Pourcentage des patients ayant une sérologie positive par département d'origine, en 2007



Répartition des résultats de sérologie par âge et sexe pour les 250 patients (cf. tableau 13 paragraphe 2-2-A-f)

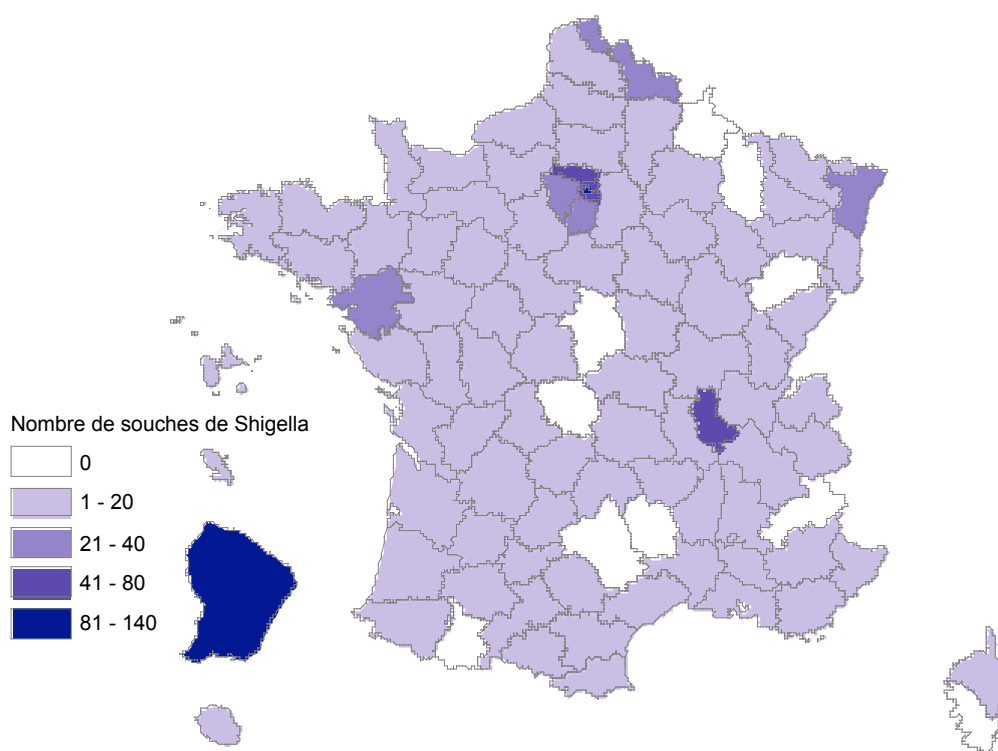
Figure 6 : Évolution des résultats de sérologies depuis 2002



- Distribution des souches de *Shigella* :

Des souches de *Shigella* ou des fiches d'information ont été adressées par 83 départements de France métropolitaine et 2 DOM. Le détail des laboratoires est disponible en annexe et le détail de la répartition par département selon les sérotypes est disponible dans les tableaux de résultats 17 à 24. Seuls 9 départements (05, 08, 12, 18, 23, 48, 55, 65 et 70), n'ont pas envoyé de souches ou de feuilles d'information.

Figure 7 : Répartition par département (en fonction des laboratoires demandeurs) du nombre de souches de *Shigella* et d'information sur les *Shigella* reçues en 2007



Pour le département 69 de nombreuses souches sont envoyées par le laboratoire Marcel Mérieux et proviennent en fait de divers départements.

Tableau 27 : Distribution des différents sérotypes de *Shigella* par âge et par sexe (souches reçues + fiches d'info)

	< 1 an		1-5 ans			6-15 ans			16-64 ans			> 65 ans		NR			Total
	M	F	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	M	F	NR	
<i>S. boydii</i> 1						1			2								3
<i>S. boydii</i> 2			1	2		1	1	1	7	7	1				1		22
<i>S. boydii</i> 3										1							1
<i>S. boydii</i> 4			1						3	3							7
<i>S. boydii</i> 5																	0
<i>S. boydii</i> 8																	0
<i>S. boydii</i> 10										1							1
<i>S. boydii</i> 11																	0
<i>S. boydii</i> 12																	0
<i>S. boydii</i> 13			1														1
<i>S. boydii</i> 14																	0
<i>S. boydii</i> 18									2	2			1				5
<i>S. boydii</i> 19									1	1							2
<i>S. boydii</i> 20									2	3							5
<i>S. boydii</i> info																	0
Total <i>S. boydii</i>	0	0	3	2	0	2	1	1	17	18	1	0	1	0	1	0	47
<i>S. dysenteriae</i> 1																	0
<i>S. dysenteriae</i> 2			1	1					1	3							6
<i>S. dysenteriae</i> 3									4	3		1					8
<i>S. dysenteriae</i> 4										2							2
<i>S. dysenteriae</i> 5									1								1
<i>S. dysenteriae</i> 12																	0
<i>S. dysenteriae</i> 97-10607			1						5	1							7
Total <i>S. dysenteriae</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	11	9	0	1	0	0	0	0	24
<i>S. sonnei</i> a			2	2		1			4	6				1			16
<i>S. sonnei</i> e				1													1
<i>S. sonnei</i> g	1		34	31	3	17	22	1	45	79		2	1	2	3		241
<i>S. sonnei</i> g (Man-)			3	5		2	2		19	15		1					47
<i>S. sonnei</i> g (Man-, ODC-)									1								1
<i>S. sonnei</i> g (ONPG-)			3	1		5	4		10	19			1				43
<i>S. sonnei</i> g (ONPG-, Man-, ODC-)									2								2
<i>S. sonnei</i> (Lac +)										1							1
<i>S. sonnei</i> info	1	1	20	25	5	17	13	1	43	51	7		4		2		190
Total <i>S. sonnei</i>	2	1	62	65	8	42	41	2	124	171	7	3	6	3	5	0	542
<i>S. flexneri</i> 1			7	4		5	1		13	20		1	3	1			55
<i>S. flexneri</i> 2		1	9	10		6	5	1	43	23		1	2		2		103
<i>S. flexneri</i> 3			7	3		3	4		32	11		4				1	65
<i>S. flexneri</i> 4		2	1	1		1	1		6	5		2	2	1		1	23
<i>S. flexneri</i> 6			4	6	1	2	2		10	17		2	1		2		47
<i>S. flexneri</i> nst							1		7	7							15
<i>S. flexneri</i> X									1								1
<i>S. flexneri</i> Y				1													1
<i>S. flexneri</i> info						1				1							2
Total <i>S. flexneri</i>	0	3	28	25	1	18	14	1	112	84	0	10	8	2	4	2	312
<i>S non sérogroupable</i>									4	3	1						8
Total <i>Shigella</i>	2	4	95	93	9	62	56	4	268	285	9	14	15	5	10	2	933

Tableau 28: Distribution des 294 souches de *Shigella* signalées comme importées en France au retour d'un séjour à l'étranger

	AFRIQUE		AMERIQUE		OCEANIE	ASIE	EUROPE	Total
	noire	du Nord	centrale	du sud				
<i>S. boydii</i> 1		2						2
<i>S. boydii</i> 2	1	2						3
<i>S. boydii</i> 3						1		1
<i>S. boydii</i> 4	1	2						3
<i>S. boydii</i> 18	1	1						2
<i>S. boydii</i> 19	1		1					2
<i>S. boydii</i> 20	2					1		3
Total <i>S. boydii</i>	6	7	1	0	0	2	0	16
<i>S. dysenteriae</i> 2	1					2		3
<i>S. dysenteriae</i> 3	1	2						3
<i>S. dysenteriae</i> 4		1				1		2
<i>S. dysenteriae</i> 97-10607	2	1						3
Total <i>S. dysenteriae</i>	4	4	0	0	0	3	0	11
<i>S. sonnei</i> a			1	2	1		2	6
<i>S. sonnei</i> g	9	20	4			22	4	59
<i>S. sonnei</i> g (Man-)	1	17					1	19
<i>S. sonnei</i> g (ONPG-)	7	6				2		15
<i>S. sonnei</i> g (ONPG-, Man-, ODC-)	1							1
<i>S. sonnei</i> (Lac +)						1		1
<i>S. sonnei</i> info	14	16				7	2	39
Total <i>S. sonnei</i>	32	59	5	2	1	32	9	140
<i>S. flexneri</i> 1	12	10	2			2	1	27
<i>S. flexneri</i> 2	20	5	3			8	2	38
<i>S. flexneri</i> 3	11	4	1	1			1	18
<i>S. flexneri</i> 4	7	3				2		12
<i>S. flexneri</i> 6	3	11				1		15
<i>S. flexneri</i> nst	7	1				1		9
<i>S. flexneri</i> X	1							1
<i>S. flexneri</i> info	1							1
Total <i>S. flexneri</i>	62	34	6	1	0	14	4	121
<i>S. nst</i>	4	1				1		6
Total <i>Shigella</i>	108	105	12	3	1	52	13	294

Figure 8 : Distribution des sérotypes de *Shigella* reçues au CNR depuis 2002

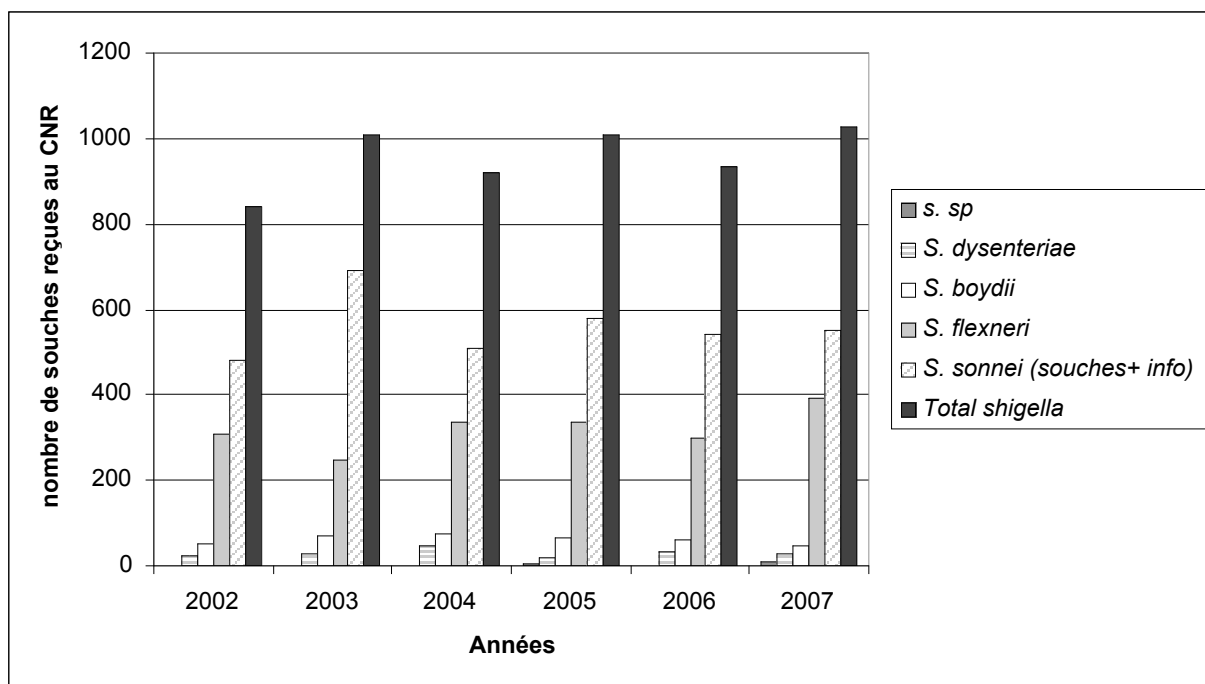
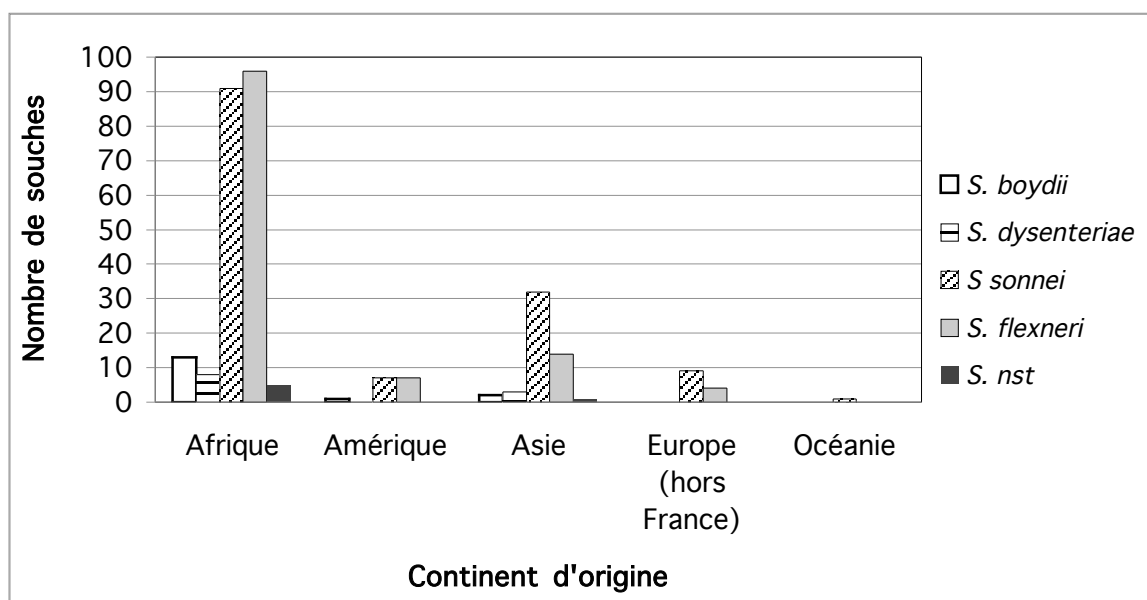


Figure 9 : Distribution des 287 souches de *Shigella* contractées à l'étranger en 2007 (selon le continent d'origine)



C- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ESC doit accompagner chaque souche ou prélèvement reçu au CNR (cf . annexe 1). Dans cette fiche, il doit être indiqué: le nom et l'adresse du laboratoire expéditeur, la demande d'examen, les renseignements sur le patient, les symptômes cliniques, le prélèvement et des renseignements épidémiologiques permettant de mettre en évidence les épidémies potentielles et leurs origines. Ces fiches et les résultats obtenus permettent l'interface avec l'InVS à différents niveaux :

- Signalements systématiques de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.
- En ce qui concerne la surveillance des *E. coli* STEC, toutes souches ou selles porteuses de gènes *stx* sont immédiatement signalées à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par FAX.
- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à l'InVS dès leurs éditions.
- Concernant les *Shigella*, la surveillance se fait à la signature des résultats avec une signalisation par téléphone ou courrier électronique de toute épidémie signalée ou remarquée au laboratoire par les responsables. De plus, dans le cadre d'une épidémie, la surveillance de l'antibiogramme est accrue de façon à signaler de suite l'apparition d'une résistance. Dans ce cadre, le CNR et le laboratoire associé ont signalé, le 24 janvier 2007, les premières souches de l'épidémie de *Shigella sonnei* en Ile de France et l'apparition de souches résistantes à l'azithromycine . Un programme de surveillance mensuelle des *Shigella* par sérotypes et par départements est à l'étude par l'InVS.
- La surveillance des *Shigella* se fait aussi par la compilation des fiches de renseignement reçues pour *Shigella sonnei* et le signalement de la même façon des épidémies potentielles.
- Réponses à des demandes d'informations émanant du Réseau européen de surveillance des *E. coli* entérohémorragiques, Enter-Net.

D- Collaboration avec des partenaires nationaux : animal, alimentaire , environnement

-Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme les Ecoles Vétérinaires de Lyon et de Maisons-Alfort, ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

- Collaboration avec d'autres équipes de l'Institut Pasteur de Paris pour un projet avec des Instituts du réseau de l'IP portant sur le « diagnostic d'urgence des diarrhées sanglantes ». Ce projet est un Programme Transversal de Recherche (PTR179) coordonné par Yves Germani de l'Unité de Pathogénie Moléculaire Microbienne (Pr P. Sansonetti) et regroupe différentes unités de l'IP (PF5, l'Unité Biologie Cellulaire des Parasites, l'Unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes (à laquelle appartient le CNR), l'Unité Epidémiologie des Maladies Emergentes, l'Unité Pathogénie Microbienne Moléculaire) et Instituts du réseau (Dakar, Bangui, Cantacuzène, Madagascar). Ce projet a donné lieu à un projet ACIP de « diagnostic d'urgence de la dysenterie et des diarrhées hémorragiques »

- Collaboration avec le Pr Roland Leclercq, service de Microbiologie CHU Côte de Nacre, Caen. Pour la mise en évidence du gène responsable de la résistance à l'azithromycine dans le cadre de l'épidémie à *S. sonnei* en Ile de France.

E- Collaboration avec des partenaires internationaux

- **Réseau des Instituts Pasteur : un projet ACIP *Shigella*** «Epidémiologie moléculaire de la multirésistance aux antibiotiques chez *Shigella flexneri* en Afrique et en Asie» a débuté cette année sous la direction du Dr Antoinette Ngandjio du Centre Pasteur du Cameroun. L'objectif de ce projet est d'étudier les caractéristiques génétiques des souches de *S. flexneri* penta résistantes isolées en 2004-2005 dans trois pays africains (Cameroun, République centrafricaine, Sénégal) et un pays asiatique (Vietnam). Après confirmation du phénotype ACSSuTe, les gènes de résistance correspondants seront recherchés et leur localisation déterminée (plasmidique ou chromosomique). La diversité génétique des souches sera déterminée par électrophorèse en champ pulsé.

Ce projet permettra de connaître les gènes impliqués dans la résistance de type ACSSuTe chez *S. flexneri*, de même que la diversité clonale des souches. Il permettra aussi d'améliorer les compétences des sites collaborateurs en matière d'étude des mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques.

- **Projet PRAD franco-marocain (2005-2007)**, « l'étude épidémiologique des *Escherichia coli* entérohémorragiques en vue de leur maîtrise dans les denrées alimentaires d'origine animale et les produits halieutiques au Maroc », dirigé par Francine Grimont en collaboration avec l'Institut National de Recherche Halieutique de Casablanca et le Laboratoire Régional d'Analyses et Recherches Vétérinaire d'Agadir. Dans ce cadre 2 stagiaires (Mme Leila Bensmail et M. Nour Eddine Chaouqy) sont venus du Maroc pour un stage de 3 semaines en juillet visant à sérotyper et rechercher des gènes de virulence dans des souches isolées de fruits de mer et de viandes.

- **Projet INSERM-CONICYT collaboration du Dr Valeria Prado (Université de Santiago, Chili) et du Dr Armelle Phalipon (Institut Pasteur, Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, INSERM U786)**

“ Amélioration de la surveillance des infections à *Shigella* dans la communauté semi-rurale nord de Santiago, Chili. Evaluation de terrain de nouveaux outils diagnostiques en vue de futurs essais vaccinaux”.

Dans ce cadre le CNR a collaboré lors du stage de 2 semaines en juillet du Dr Cécilia Toro en fournissant des souches de différents sérotypes et différentes origines pour tester une PCR multiplexe *set*, *sen* et *virF*, afin de vérifier la spécificité ou non des résultats pour distinguer *S. flexneri*. (article en cours de rédaction).

- **Collaboration avec le Pr Gordon Dougan du Wellcome Trust Sanger Institute à Cambridge (RU) et le Dr Jun Yu de l'Université de Strathclyde à Glasgow (RU)**. Ce projet vise à étudier la structure de la population des *S. sonnei* en utilisant des techniques de “Multi Locus Sequence Typing” (MLST) et des PCR ciblant des régions d'évolution rapides (surtout phagiques). Dans ce cadre le CNR est chargé de constituer une collection de souches bien caractérisées et avec la plus grandes biodiversité.

- **Collaboration avec le Dr Chien-Shun Chiou du CDC de Taichung, Taiwan**. L'article publié par le Dr Chien-Shun Chiou (Liang SY et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Shigella sonnei*. J Clin Microbiol. 2007), présentait une nouvelle technique, le multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) qui serait susceptible d'être plus sensible et surtout plus simple à utiliser que le PFGE pour *S. sonnei*. Notre collaboration se fait sur la validation de la méthode par le CDC sur des souches de notre collection et sur sa mise en oeuvre au CNR.

- **Collaboration avec le Dr Kaiser Ali Talukder, de l'ICDDR, Dhaka, Bangladesh.**
 Pour l'étude de souches présentant des sérotypes non reconnus par les sérums utilisés en agglutination classique. Dans ce cadre M. Mohamed Aminul Islam étudiant en thèse, est venu un mois au CNR pour analyser des souches non agglutinables isolées au Bangladesh à la fois par agglutination avec les sérums préparés au CNR mais aussi par des méthodes moléculaires telles que le sérotypage moléculaire par *rfb*-PCR RFLP, le séquençage du gène *fliC*, le typage par MLST en utilisant les 7 gènes décrits par le Dr Mark Achtman, Berlin (Allemagne).

3-2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

A- Étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches STEC (HRD)

Bien que l'utilisation des antibiotiques soit controversée dans les infections à STEC, l'étude de la sensibilité des souches présente un intérêt épidémiologique. Le laboratoire associé a étudié la sensibilité des souches isolées en 2007, vis-à-vis des antibiotiques suivants :

- β lactamines : amoxicilline (AMX), cefixime (CFM), ceftriaxone (ROC)
- triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT)
- fluoroquinolones : ofloxacine (OFL), ciprofloxacine (CIP)

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résistance (tableau 29)

Tableau 29: Résistance des souches aux antibiotiques (%)

	AMX	CFM	ROC	SXT	CIP
Sérotype O157 H7 (n=7)	0	0	0	0	0
Sérotypes non-O157 (n=36)	29	0	0	16	0

En raison des fortes concentrations intraluminales de l'azithromycine, les CMI de l'azithromycine ont été déterminées vis à vis des souches isolées en 2007 par la méthode du E-test (tableau 30).

Tableau 30 : CMI des souches STEC à l'azithromycine

Azithromycine	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)
Sérotype O157 H7 (n=7)	6	8	3 - 16
Sérotypes non-O157 (n=36)	8	24	6 - >256

B- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *E. coli* responsables de méningites

La sensibilité des 15 souches aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline (AMX), céfotaxime (CTX), gentamicine (GEN) et ciprofloxacine (CIP) a été étudiée par la méthode de l'antibiogramme et la détermination des CMI sur les 16 souches de ECM (tableau 31).

Tableau 31 : résultats de l'étude de sensibilité à 4 antibiotiques

Antibiotique	CMI (µg/ml)			% Résistance
	Range	50%	90%	
Amoxicilline	0,5->32	4	>32	43
Cefotaxime	≤0,008-2	0,032	0,064	0
Ciprofloxacine	≤0,008-0,5	0,032	0,032	0
Gentamicine	0,5-4	1	2	0

C- Étude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Shigella*

a- Surveillance globale

De 2002 à 2005, la surveillance de la résistance était basée sur la surveillance des *Shigella sonnei* à 2 antibiotiques : l'amoxicilline et le cotrimoxazole. Depuis 2006 un antibiogramme est réalisé sur toutes les souches de *Shigella* identifiées au CNR, à l'aide de 16 disques d'antibiotiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Dans certains cas, la méthode du E-test est utilisée pour déterminer les CMI.

Cet antibiogramme a été réalisé en 2007 sur toutes les souches de *Shigella*. Les résultats de résistance aux principaux antibiotiques des souches isolées en France métropolitaine sont présentés dans le tableau 32.

Tableau 32 : Pourcentage de souches de *Shigella* résistantes aux antibiotiques.

	nombre de souches:	AMX	CRO	CAZ	K	GM	NA	CIP	C	TE	SSS	TMP	SXT	AMX + SXT
<i>S. boydii</i>	47	23,4	0,0	0,0	8,5	0,0	8,5	0,0	4,3	70,2	66,0	59,6	55,3	23,4
<i>S. dysenteriae</i>	24	75,0	0,0	0,0	4,2	0,0	4,2	0,0	66,7	91,7	66,7	70,8	66,7	54,2
<i>S. flexneri</i>	310	65,5	0,6	0,3	4,5	0,3	8,7	5,5	60,6	76,5	54,2	54,5	47,4	36,5
<i>S. sonnei</i>	351	27,0	0,9	0,6	1,4	0,3	8,2	0,9	0,9	58,8	82,1	97,2	91,8	26,1
<i>S. nst</i>	8	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	12,5	0,0	12,5	62,5	62,5	100,0	62,5	0,0
S. Total	740	44,1	0,7	0,4	3,4	0,3	8,4	2,7	28,3	68,0	68,7	76,1	69,8	30,9

AMX=Amoxicilline, CRO=Ceftriaxone, CAZ=Ceftazidime, K=Kanamycine, GM=Gentamicine, NA=Acide nalidixique, CIP=Ciprofloxacine, C=Chloramphénicol, TE=Tétracycline, SSS=Sulfamides, TMP=Triméthoprim, SXT=Cotrimoxazole.

Pour ce calcul ont été considérés comme résistantes, les souches résistantes et intermédiaires. Sont présenté en gras les résultats avec plus de 50% des souches résistantes.

Pour les souches résistantes aux céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G), un autre antibiogramme complémentaire a été effectué ainsi que la recherche par PCR des gènes codant pour des bêta lactamases. Les résultats sont présentés dans le tableau 33.

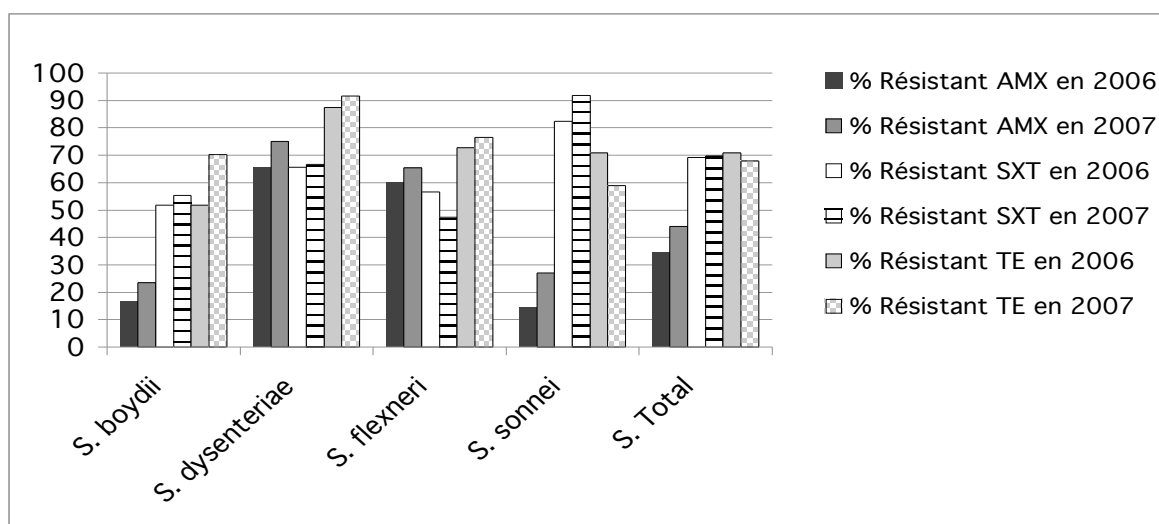
Tableau 33 : Antibiotogramme des 5 souches résistante au C3G :

Numéro	#07 5956	#07 5535	#07 1244	#07 6528	#07 3084
Espèce	<i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. flexneri</i>
Bio/Séro	g	g	g	6 boyd 88	1b
Sexe	F	F	F	F	F
Age	16 à 64 ans	16 à 64 ans	16 à 64 ans	1 à 5 ans	1 à 5 ans
Département	33	13	29	95	67
Voyage	non	Népal	Egypte	non*	Egypte
Résistances associées	ASGSulTmpSxt	ASNaISulTmpSxt	ASSulTmpSxt	ASCSulTmpSxt	ASCTmp
CMI (µg/ml)	CAZ	4	256	32	2
	CRO	64	256	128	8
	CIP	-	0,25	-	-
	AZM	16	16	24	6
β-lactamases mises en évidence par PCR		SHV, CTX-M	SHV, CTX-M	SHV, CTX-M, TEM	CTX-M, TEM, OXA

*= nombreux cas de GAI dans la même école, F= Féminin

Les 5 souches résistantes au C3G étaient sensible à l'imipénème. Le séquençage des gènes de β-lactamases est en cours.

Figure 10 : Evolution de la résistance à l'amoxicilline, au cotrimoxazole et aux tétracyclines chez les différents sérotypes de *Shigella* entre 2006 et 2007.



b- Surveillance de *S. sonnei*

La surveillance particulière de la résistance des *S. sonnei* à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT), à partir des résultats d'antibiogramme obtenus au CNR et signalé dans les feuilles d'information, est toujours d'actualité.

Figure 11 : répartition des souches de *S. sonnei* en France avec mise en évidence des souches résistantes à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) .

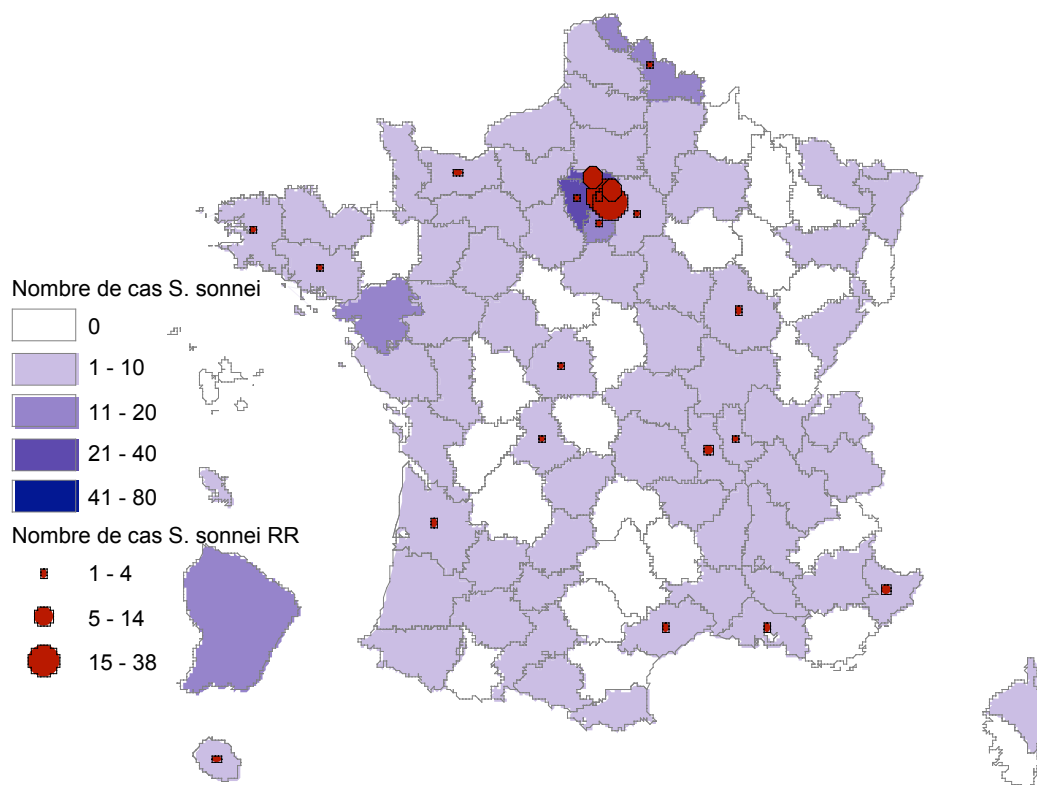


Figure 12 : répartition des souches de *S. sonnei* dans les arrondissements parisiens (75) avec mise en évidence des souches résistantes à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT).

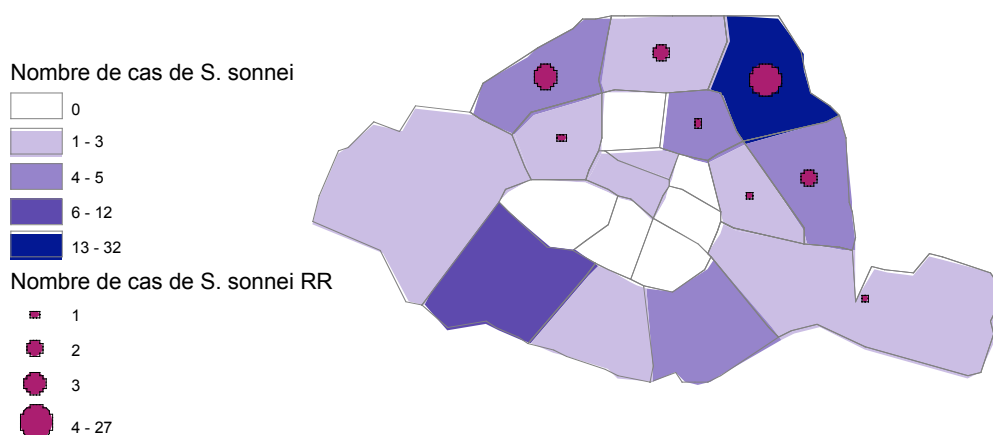
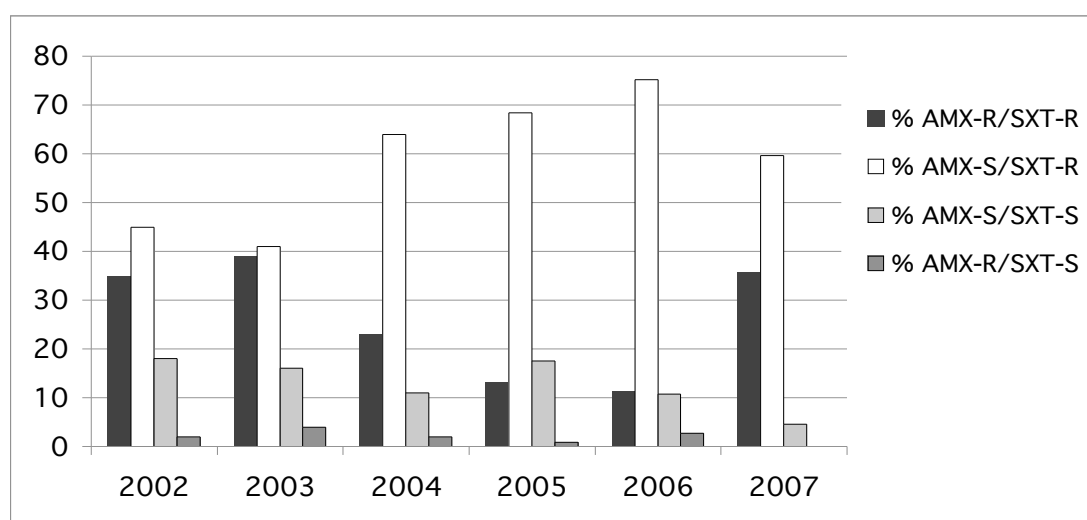


Tableau 34 : Bilan des tendances de résistance à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez *S. sonnei* biotype g

	2002	2003	2004	2005	2006	2007
nombre de souches testées	100	100	100	228	298	265
% AMX-R/SXT-R	35	39	23	13,2	11,4	31,7
% AMX-S/SXT-R	45	41	64	68,4	75,2	54,0
% AMX-S/SXT-S	18	16	11	17,5	10,7	4,5
% AMX-R/SXT-S	2	4	2	0,9	2,7	0,0

R= résistant, S= sensible

Figure 13 : Histogramme des tendances de résistance à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez *S. sonnei* biotype g



R= résistant, S= sensible

On note une augmentation du nombre des souches résistantes à la fois à l'amoxicilline et au cotrimoxazole (en noir), avec des pourcentages comparables à ceux obtenus en 2002 et 2003, période au cours de laquelle des épidémies dans la même communauté juive d'Ile de France avaient déjà eu lieu.

Cette surveillance a été primordiale en 2007 car elle a permis la détection et le suivi des deux pics épidémiques survenus dans la communauté juive de la région Ile de France. En effet les souches responsables de ces pics épidémiques étaient caractérisées par le profil de résistance suivant :

- Résistance à : l'amoxicilline, à la streptomycine, aux sulfamides, au triméthoprime, et au cotrimoxazole (A S Sul Tmp Sxt).

- De plus lors du premier pic épidémique une résistance à l'azithromycine (AZM) a été mise en évidence sur la première souche isolée par le laboratoire associé avec une CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$. La résistance à l'AZM des bactéries gram-, dont les *Shigella*, est mal connue et seules des normes pour la définition de la sensibilité ou de la résistance à l'AZM des bactéries gram + existent et sont décrites par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (<http://www.sfm.asso.fr>, CASFM 2007) : Disque 15 μg : S si ≥ 22 mm, R si < 17 mm, CMI en milieu liquide: S $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, R > 4 $\mu\text{g/ml}$. En 1999, la sensibilité naturelle des *Shigella* est observée avec des CMI de 1 à 32 $\mu\text{g/ml}$ (Stock I et al. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1999)

L'interprétation de la sensibilité à AZM est délicate ; en effet, avec *S. sonnei* on observe un phénomène de zone avec 2 zones visibles de sensibilité différente (Sanjey K et al. Pediatric Infectious Diseases Journal, 2005). La zone configurant la plus grande résistance a été retenue.

Suite à l'apparition de cette résistance, un antibiogramme complémentaire à l'AZM a été mis en place pour toutes les souches de *S. sonnei* g résistantes à la fois à AMX et SXT, en utilisant à la fois la méthode de diffusion (détermination du diamètre de la zone d'inhibition) et la méthode du E-test (détermination des CMI). Pour notre étude nous considérons les souches résistantes à l'AZM quand la CMI est $\geq 256\mu\text{g/ml}$.

Tableau 35 : études de la résistance AMX, SXT et AZM chez *S. sonnei* g dans les départements d'Ile de France en 2007

Départements	Nombre de souches de <i>S. sonnei</i> g	% de souches AMX-R / SXT-R	% de souches AMX-S / SXT-R	% de souches AMX-S / SXT-S	Nombre de souches AMX-R / SXT-R	Nombre de souches AZM R	% de souches AZM R
75	57	57,9	40,4	1,8	33	18	54,6
77	1	100,0	0,0	0,0	1	1	100
78	10	20,0	60,0	20,0	2	2	100
91	7	0,0	100,0	0,0	0	0	NA
92	8	25,0	75,0	0,0	2	0	0
93	20	60,0	35,0	5,0	12	11	91,7
94	33	75,8	24,2	0,0	25	8	32
95	19	63,2	31,6	5,3	12*	6*	60

*pour 2 souches du 95, seule la feuille d'information a été reçue signalant des souches résistantes à AMX et SXT, et l'AZM n'avait pas été testé ou le résultat n'avait pas été mentionné.

Afin de tester les deux méthodes disponibles au laboratoire pour mesurer la sensibilité à l'AZM, 121 souches ont été testées. Le tableau 36 présente les résultats obtenus. Le phénomène de zone compliquant la lecture, pour chaque méthode nous avons considéré le diamètre d'inhibition le plus petit (conférant la plus grande résistance).

Tableau 36: comparaison des résultats de la sensibilité à l'AZM obtenus par la méthode de diffusion (disque Biorad, détermination du diamètre en mm) et la méthode du Etest (AB biodisk, détermination des CMI en µg/ml)

Bio/Séro	Numéro souche	AMX/SXT	AZM (mm)	AZM (µg/ml)	Bio/Séro	Numéro souche	AMX/SXT	AZM (mm)	AZM (µg/ml)	Bio/Séro	Numéro souche	AMX/SXT	AZM (mm)	AZM (µg/ml)
g	#07 1207	RR	8	>256	g	#07 5976	RR	13	32	g	#05 0553	RR	20	16
g	#07 0759	RR	9	>256	g	#07 0760	RR	13	>256	g	#06 1683	RR	20	16
g	#07 1179	RR	9	>256	g	#07 5956	RR	14	8	g	#06 3771	RR	20	16
g	#07 0829	RR	10	256	g	#07 1021	RR	14	>256	g	#06 7608	RR	20	18
g	#07 0426	RR	10	>256	g	#07 5372	RR	15	8	g	#07 6587	RR	20	24
g	#07 0597	RR	10	>256	g ONPG -, ODC -, man -	#07 5307	RR	15	12	g	#07 7440	RR	20	24
g	#07 0827	RR	10	>256	g	#07 4789	RR	15	16	g	#07 7448	RR	20	24
g	#07 0863	RR	10	>256	g	#07 5454	RR	15	16	a	#07 7119	RR	20	32
g	#07 1085	RR	10	>256	g	#07 8178	RR	15	16	g	#07 1244	RR	20	32
g	#07 0464	RR	10	>256	g	#07 8179	RR	15	24	g	#07 0860	RR	20	32
g	#07 0458	RR	10	>256	g	#07 5665	RR	15	32	g	#07 7449	RR	20	32
g	#07 0450	RR	10	>256	g	#07 1018	RR	15	256	g	#07 7484	RR	20	32
g	#07 0562	RR	10	>256	g	#07 1019	RR	15	256	g	#07 7616	RR	20	32
g	#07 0927	RR	10	>256	g	#07 3174	RR	16	32	g	#07 7624	RR	20	32
g	#07 0895	RR	10	>256	g	#05 2305	RR	17	32	g	#07 1609	RR	20	48
g	#07 1114	RR	10	>256	g	#06 2081	RR	18	12	e	#06 2334	RR	21	6
g	#07 8267	RR	10	>256	g	#06 7981	RR	18	12	g	#07 7854	RR	21	16
g	#07 0689	RR	11	>256	g	#06 1932	RR	18	16	g	#07 7972	RR	21	16
g	#07 0830	RR	11	>256	g	#06 8677	RR	18	24	g	#07 0794	RR	21	24
g	#07 1029	RR	11	>256	g	#07 1910	RR	18	24	g	#07 1608	RR	21	24
g	#07 1033	RR	11	>256	g	#07 6311	RR	18	24	g	#07 8078	RR	21	24
g	#07 0449	RR	11	>256	g	#07 1073	RR	18	32	g	#05 7958	RR	21	24
g	#07 0643	RR	11	>256	a	#06 6470	RR	19	12	g ONPG-	#07 2390	RR	21	32
g	#07 0716	RR	11	>256	g ONPG -, ODC -, man -	#07 5204	RR	19	14	g	#05 4749	RR	21	32
g	#07 1084	RR	11	>256	g	#07 5535	RR	19	24	g	#06 1063	RR	22	8
g	#07 1307	RR	11	>256	g	#07 8107	RR	19	24	g ONPG -, ODC -, man -	#07 2722	RR	22	12
g	#07 1038	RR	11	>256	g	#05 8063	RR	19	24	g	#07 7742	RR	22	12
g	#07 1315	RR	11	>256	g	#05 8303	RR	19	24	g	#07 7357	RR	22	24
g	#07 2004	RR	11	>256	g	#06 2971	RR	19	24	g	#07 2224	RR	22	32
g	#07 2019	RR	11	>256	g	#07 6794	RR	19	32	g	#07 7896	RR	24	12
g	#07 0926	RR	12	256	g	#06 4042	RR	20	6	g	#07 7946	RR	24	16
g	#07 0828	RR	12	>256	g	#06 1522	RR	20	8	g	#07 6913	RR	24	24
g	#07 1247	RR	12	>256	g	#05 6586	RR	20	12	g	#07 7775	RR	25	16
g	#07 0344	RR	12	>256	g	#06 1033	RR	20	12	g	#07 1174	SR	19	32
g	#07 0343	RR	12	>256	g	#06 4045	RR	20	12	g ONPG-	#07 7556	SR	20	24
g	#07 0401	RR	12	>256	g	#06 7736	RR	20	12	g	#07 1964	SR		32
g	#07 1240	RR	12	>256	e	#07 4369	RR	20	16	g	#07 2292	SR		64
g	#07 1306	RR	12	>256	g	#07 4816	RR	20	16	g	#07 2011	SS		32
g	#07 1312	RR	12	>256	g	#07 6375	RR	20	16	g	#07 2076	SS		32
g	#07 1444	RR	12	>256	g	#07 7439	RR	20	16					
g	#07 1486	RR	12	>256	g	#07 7700	RR	20	16					

Les résultats de la méthode de diffusion sont présentés selon le CASFM 2007 : Sensible si ≥ 22 mm (incolore), $17 \leq$ Intermédiaire < 22 (en gris clair), R si < 17 mm (en gris foncé). Pour la CMI, ont été considérées comme résistantes les souches ayant une CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ (en gris foncé).

La comparaison des résultats permet de voir que la méthode de diffusion n'est pas la plus optimale car de nombreuses souches sont classées comme intermédiaires. Les souches résistantes présentaient parfois des CMI faibles, jusqu'à 8 $\mu\text{g/ml}$ alors que le diamètre était de 14 mm). De plus, les CMI réalisées en milieu liquide, par le Pr Roland Leclercq (service de Microbiologie, CHU de Caen), ont montré des résultats discordants avec la méthode E-test. Les souches avec une CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ en E-test présentaient une CMI à 64 $\mu\text{g/ml}$ par la méthode en milieu liquide et les souches avec une CMI à 32 $\mu\text{g/ml}$ en E-test présentaient une CMI à 2 $\mu\text{g/ml}$ en milieu liquide.

3-3 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

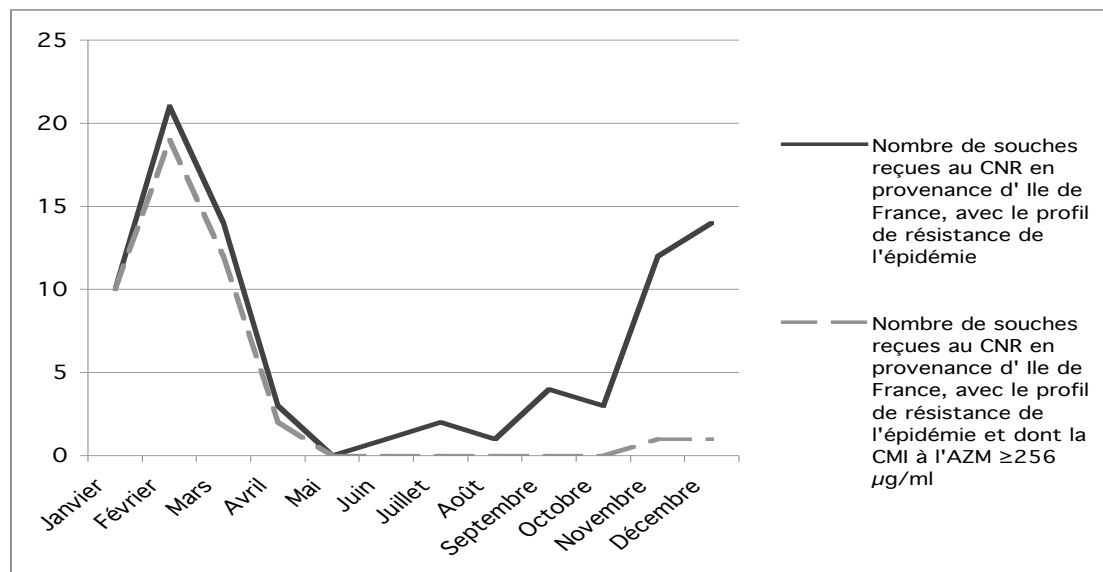
a-Épidémie dans la communauté juive d'Ile de France

Le 24 janvier 2007, le laboratoire associé au CNR (RD) signalait à la DASS 75 l'isolement d'une souche de *Shigella sonnei* résistante à l'**azithromycine** en plus de la résistance à l'amoxicilline et au cotrimoxazole, chez une enfant hospitalisée pour gastro entérite aiguë (GEA) et scolarisée dans une école confessionnelle juive située dans le 19^{ème} arrondissement de Paris. En même temps le CNR (IP) informait l'InVS de la réception de 2 souches du 78, signalées en épidémie familiale, et une du 93, résistantes à l'amoxicilline et au cotrimoxazole et provenant d'enfants de la même communauté.

Suite aux épisodes épidémiques dans la même communauté en 1996, 2002 et 2003, un système de surveillance régional des GEA à *Shigella sonnei* résistante à l'AMX et au SXT (InVS/Cire IDF/CNR) avait été mis en place en 2005. L'utilisation de l'azithromycine avait été préconisée comme traitement de première intention par l'Afssaps en 2004, pour le traitement des souches RR.

La CIRE Ile de France a aussitôt mené une enquête dans les écoles confessionnelles correspondantes et plus de 103 cas dont 81 cas certains ont pu être mis en évidence par la Cire IDF entre janvier et avril. Le CNR a reçu des souches pour 50 patients entre janvier et avril.

Figure 14 : répartition dans le temps des souches de *S. sonnei* g reçues au CNR et laboratoire associé, ayant le profil de résistance spécifique de l'épidémie et mise en évidence des souches résistantes à l'AZM :



Deux pics épidémiques ont été individualisés :

Le pic de janvier à avril est survenu majoritairement dans le département 75 et s'est caractérisé par une CMI à l'azithromycine (AZM) $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ (90% des souches testées au CNR ou au laboratoire associé) avec un âge médian = 5 ans [2 – 39 ans] et sex ratio = 1. Pour un des cas en janvier, un voyage en Israël était précisé.

L'investigation de la Cire IDF a retrouvé les mêmes résultats grâce à leur enquête de terrain avec des précisions sur :

* La scolarisation:

- 85% enfants scolarisés (n=83)
- 3% non scolarisés (n=3) : moins de 3 ans
- 12% adultes (n=12)

* es écoles concernées

- 2 écoles avec plus de 2 cas: 60 cas (75) et 7 cas (94)
- 13 écoles avec 1 ou 2 cas* Liens fréquents entre les cas : écoles, colonie, familles

* Facteur de risque : 6 familles ont signalé un voyage dont 4 en pays d'endémie

Le deuxième pic de septembre à début 2008 est survenu majoritairement dans les départements 94 et 75. Seules 2 souches, sur les 33 reçues au CNR et au laboratoire associé de septembre à décembre, présentaient des CMI à l'AZM $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ (6%). L'âge médian et le sex ratio étaient les mêmes que dans le premier pic.

En faisant abstraction de l'AZM, les souches responsables de ces pics épidémiques étaient caractérisées par le profil de résistance suivant : A S Sul Tmp Sxt.

Figure 15 : répartition des souches épidémiques dans le temps et dans les départements d'Ile de France

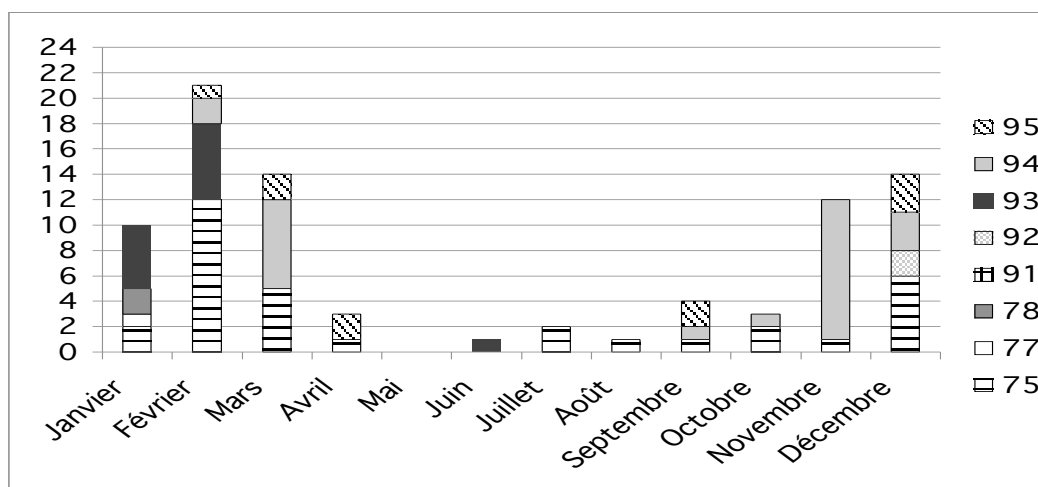
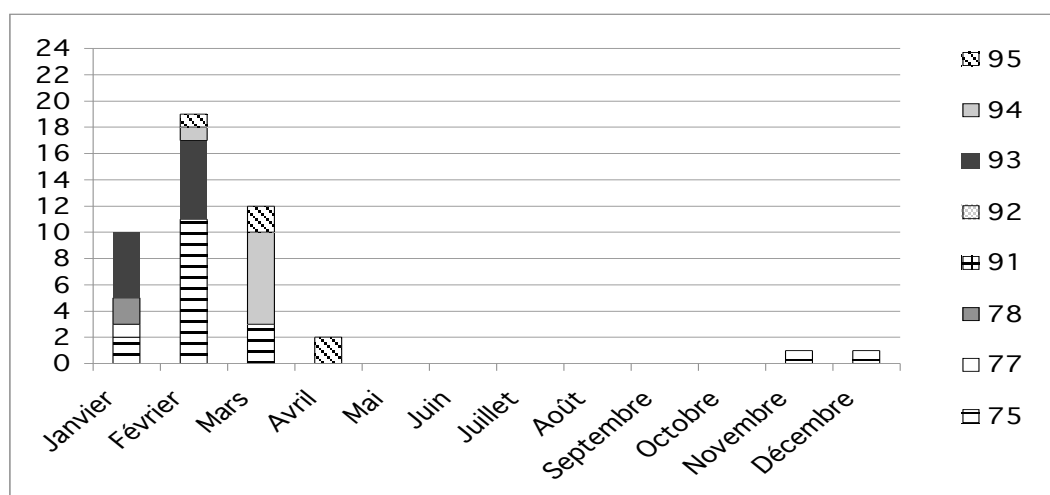


Figure 16 : répartition des souches épidémiques avec une CMI à l'AZM ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ dans le temps et dans les départements d'Ile de France



Suite à cette épidémie de nombreuses études ont été entreprises par le CNR et le laboratoire associé :

- **Etude de la sensibilité à l'AZM** des souches de *S. sonnei* RR depuis 2005 et sur quelques souches des épidémies précédentes :

La plupart des souches de *S. sonnei* RR isolées en d'Ile de France en 2005 et 2006 ont été testées pour l'AZM: soit 7 souches sur les 9 isolées en 2005 (2 souches n'ayant pu être subcultivées), et 16 souches sur 16 isolées en 2006. Un échantillon de souches des épidémies précédentes dans la communauté juive a aussi été testé : 4 souches de l'épidémie française de 1996, 4 souches provenant d'une épidémie aux USA et au Canada en 1998, 3 souches de l'épidémie française de 2002 et 4 souches de l'épidémie française de 2003.

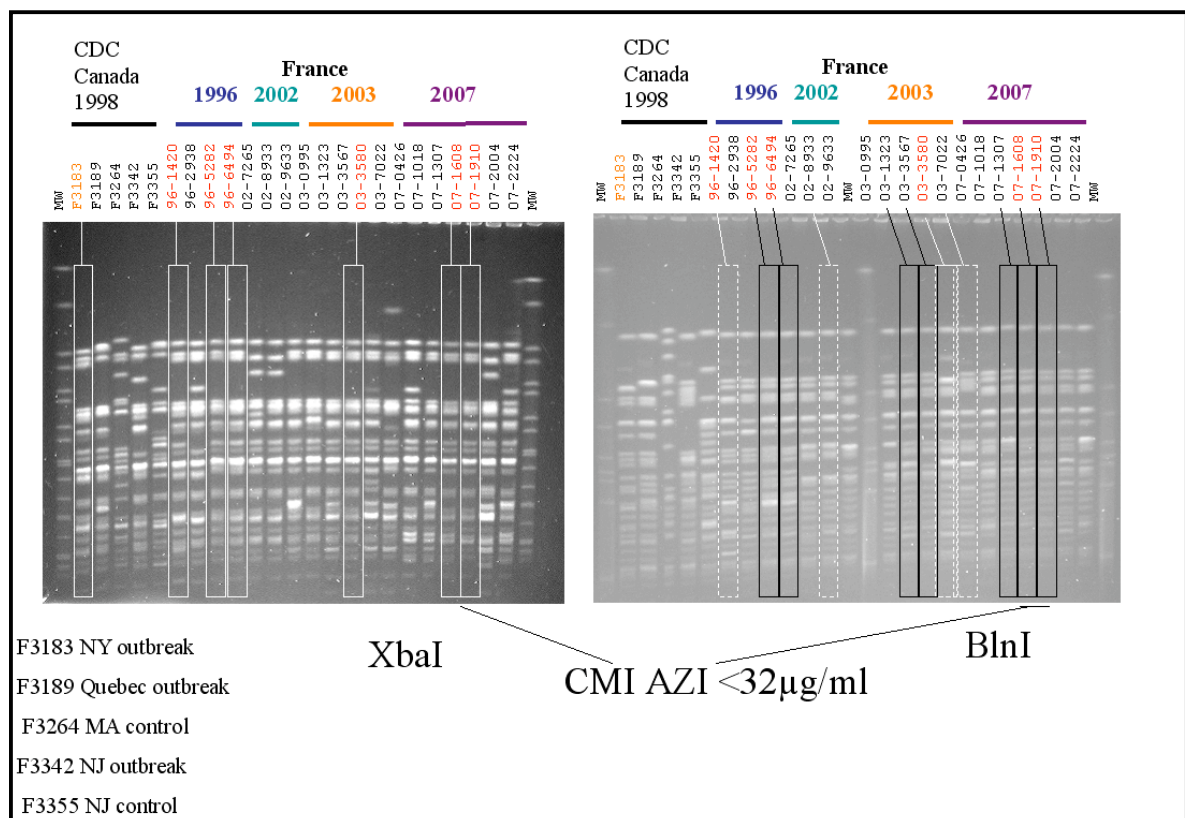
La sensibilité à l'AZM a été testée à la fois par la méthode de diffusion (disque, détermination du diamètre) et la méthode du E-test (détermination des CMI). Les résultats obtenus ont montré des diamètres de 17 à 21 mm et des CMI de 6 à 32 $\mu\text{g/ml}$. Aucune souche ne présentait de CMI comparable à celle observée lors du premier pic épidémique de 2007.

- **Analyse moléculaire des souches** : la comparaison des souches par PFGE (*XbaI* et *BlnI*) et « repetitive element PCR fingerprinting » (REP-PCR) a été effectuée par le CNR (IP) et le laboratoire associé (RD).

* sur les souches du premier pic de l'épidémie 2007 par PFGE (RD)

* sur des souches de l'épidémie en comparaison des souches des épidémies précédentes (1996, 2002, 2003) par PFGE avec deux enzymes (IP) et REP-PCR (RD)

Figure 17 : résultats de PFGE d'un échantillon de souches des différentes épidémies :



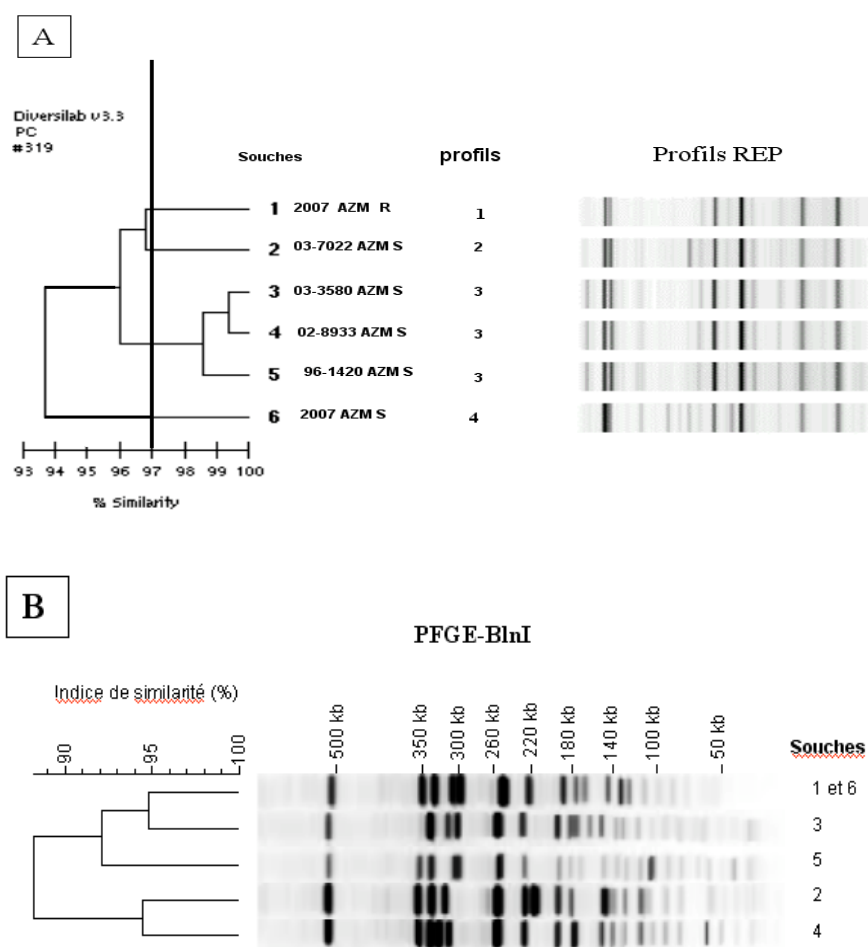
Les souches présentant des profils identiques en PFGE *XbaI* (profils encadrés en blanc) sont indiquées en rouge. Les profils identiques en PFGE *BlnI* sont encadrés en noir

On note une grande similitude entre les profils observés lors des différentes épidémies avec au maximum 3 bandes de différences. Les souches témoins F3264 et F3355 non épidémiques ont des profils très différents.

L'ensemble des PFGE des souches de 2007 a montré que le profil commun à toutes les épidémies se retrouvait à la fois chez les souches sensibles et les souches résistantes à l'AZM.

Une analyse par REP-PCR des souches présentant des profils différents par PFGE *BlnI* (profils encadrés en blanc pointillés dans la figure 17) a montré une grande similitude des profils pour les souches épidémiques avec l'obtention de 4 profils présentant 97% de similarité. Les profils représentatifs observés en REP-PCR sont présentés dans la figure 18.

Figure 18 : Résultats de REP PCR (A) et de PFGE *BlnI* (B) sur des souches des différentes épidémies.



La partie A a été réalisée grâce au logiciel Diversilab, la partie B grâce au logiciel Bionumerics avec une méthode UPGMA, avec un coefficient de Dice et une tolérance à 1%.

- Etude du mécanisme de la résistance à l’AZM

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Pr Roland Leclercq (Service de Microbiologie, CHU de Caen).

L’étude de la résistance a été effectuée en milieu liquide : les souches résistantes, avaient une CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ en E-test, et une CMI à 64 $\mu\text{g/ml}$ en milieu liquide. Les souches sensibles, avaient une CMI à 32 $\mu\text{g/ml}$ en E-test, et une CMI à 2 $\mu\text{g/ml}$ en milieu liquide.

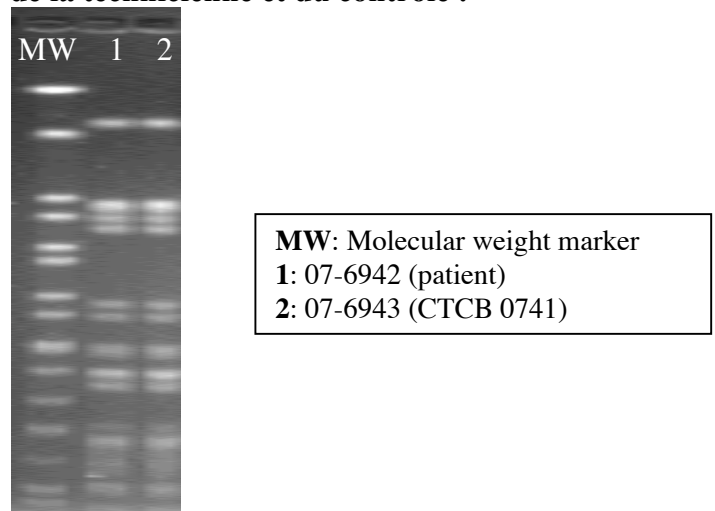
L’analyse des différents gènes potentiellement responsables de la résistance aux macrolides a été réalisée par PCR. Un gène plasmidique, *mph(A)*, a pu être mis en évidence chez les souches résistantes. L’absence de ce gène a été vérifiée chez les souches sensibles. Ce gène était porté par un plasmide conjugatif. Ce travail est soumis pour publication.

b- Cas de contamination d'une technicienne par un contrôle de laboratoire

Le CNR a reçu, le 19/10/2007, 2 souches du centre hospitalier de Langres (52). Une souche avait été isolée des selles d'une technicienne du laboratoire (#07 6942) et l'autre d'un échantillon contrôle du « Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique » ou CTCB (bac 0741 ou #07 6943). L'hôpital suspectait la contamination de la technicienne par le contrôle.

Les premiers résultats ont démontré que les souches étaient toutes les deux des *S. flexneri* 6 boyd 88 résistantes uniquement à la streptomycine. Une analyse par PFGE en utilisant l'enzyme *XbaI* a permis de confirmer l'identité des souches et de confirmer la contamination (figure 19)

Figure 19 : PFGE *XbaI* des souches de la technicienne et du contrôle :



c-Épidémie chez les gens du voyage de la région d'Auxerre

En 2006, une épidémie avait touché plusieurs foyers au sein d'une communauté de gens du voyage dans la région d'Auxerre (89) avec 12 souches. Une contamination secondaire avait été mise en évidence à Bar-le-Duc (55) avec 6 souches. La première souche avait été reçue au CNR le 3/11/06 et identifiée comme *Shigella sonnei* g. L'antibiogramme avait permis de voir apparaître une résistance à l'AMX chez 4 cas d'une même famille dans la région d'Auxerre.

Une autre souche a été reçue par le CNR en provenance du CH d'Auxerre le 17/01/07 cette fois la souche était sensible à l'AMX.

Le 14/05/07 le CNR a reçu 3 souches du CH d'Auxerre signalé comme provenant d'enfant de 1 à 5 ans de la communauté des gens du voyage. Ces souches ont été identifiées par le CNR comme *S. sonnei* g sensible à l'AMX et au SXT. En juin, deux autres souches de la même communauté ont été envoyées par le CH d'Auxerre, l'une d'entre elle était résistante au SXT.

3-4- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier Européens

Participation au réseau « Enter-Net » pour la surveillance européenne des infections à *E. coli* producteur de Shigatoxines

4-Alerte

L'alerte s'effectue auprès de l'InVS par différentes interventions :

- Signalement systématique de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.

- En ce qui concerne la surveillance des *E. coli* STEC, toute souche ou sève porteuse de gènes *stx* est immédiatement signalée à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par FAX.

- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à l'InVS dès leurs éditions.

- Concernant les *Shigella*, la surveillance se fait à la signature des résultats avec une signalisation par téléphone ou courrier électronique de toute épidémie signalée ou remarquée au laboratoire par les responsables.

- La surveillance des *Shigella* se fait aussi par la compilation des fiches de renseignements reçues pour *Shigella sonnei* et le signalement de la même façon des épidémies potentielles.

- Signalement au Réseau Européen de surveillance des *E. coli* entérohémorragiques « Enter-Net » de souches ayant le même sérotype que certaines souches épidémiques signalées en Europe.

5- Activités d'information, de formation et de conseil **a-Enseignements**

- Participation au cours de Bactériologie médicale de l'Institut Pasteur de Paris (2 heures, le 22 février 2007) : le genre *Shigella*. (I. Filliol)

- Participation au *Shigella* Workshop à ICDDR, Dhaka, Bangladesh les 12 et 13 novembre 2007 : The application of molecular biology techniques for the identification of *Shigella* antigens. (I. Filliol)

- Participation au cours : Le point sur les principaux micro-organismes pathogènes. *Campylobacter*, *Vibrio* et *Shigella*, Institut Pasteur de Lille (2 heures, le 4 décembre 2007) : Bactériologie et épidémiologie des *Shigella*. (I. Filliol)

- Participation à l'enseignement universitaire sur les *E. coli* intestinaux et extraintestinaux (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian): DCEM1, DES de Biologie, DIU de Pathologie infectieuse pédiatrique (organisé par le Groupe De Pathologie Infectieuse Pédiatrique) Hôpital Saint Vincent de Paul Paris (3 heures par an), DIU de Pathologie infectieuse pédiatrique de l'Université de Poitiers (Pr Oriot) (3 heures par an), Internes de Pédiatrie et de Biologie au sein de l'hôpital Robert Debré

- Formation continue en médecine ambulatoire (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian) (participation aux journées de pathologie infectieuse pédiatrique ambulatoire organisées par le Dr Cohen)

- Formation continue aux techniciens de laboratoire (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian)

- Enseignement post universitaire des biologistes réalisés à la faculté de Paris V en octobre 2007 (Bioforma)

Participation *à l'enseignement de la Recherche* pour la formation de stagiaires et la préparation de DEA et de thèses d'université.

Stagiaires : le CNR de l'Institut Pasteur reçoit de nombreux stagiaires étrangers du réseau IP ou non qui viennent acquérir des techniques de sérotypage et de caractérisation des gènes de virulence afin de travailler sur des souches prévalentes dans leur pays aussi bien humaines qu'alimentaires (plus de 300 souches caractérisées)

Liste des stagiaires du CNR-IP en 2007 :

- M. Sébastien GARDES, 12 février au 23 mars 2007, stage de BEPA technicien de labo, typage des *E. coli*.
- M. Mohammed Ziaur RAHMAN (Bangladesh), 7 mars au 20 mars 2007, étudiant en thèse, typage de *Shigella*.
- M. Fabio FILARDI (Italie), 12 avril au 31 mai 2007, stage collaboratif lors de la préparation de sa thèse, détection des *E. coli* O157.
- Mme Leila BENSMAIL (Maroc), 3 au 18 juillet 2007, chercheur, projet PRAD, caractérisation de souches de *E. coli* isolées de fruits de mer.
- M. Nour Eddine CHAOUQY (Maroc), 3 au 23 juillet 2007, chercheur, projet PRAD, caractérisation de souches de *E. coli* isolées de viandes.
- M. Mohammad Aminul ISLAM (Bangladesh), 1er au 26 octobre 2007, étudiant en thèse, sérotypage moléculaire et comparaisons de souches de *shigella* de sérotypes nouveaux.
- M. Gwendal CARLE, 17 au 21 décembre 2007, stage de 3^{ème}.
- M. Adjehi DADIE (Côte d'Ivoire), 12 novembre 2007 au 7 février 2008, caractérisation de 200 souches de *E. coli* d'origine humaine, alimentaire et environnementale.

Liste des stagiaires du laboratoire associé RD en 2007

- Master M2 – Paris XI :

* Pauline Lechevalier : Analyses fonctionnelles simultanées *in vivo* de 6 régions génomiques spécifiques du clone *Escherichia coli* O45:K1:H7 par mutagenèse ciblée et PCR quantitative. Juin 2007

* Hélène Sées : Physiopathologie de la leucomalacie périventriculaire secondaire à l'infection systémique par *Escherichia coli*: mise au point d'un modèle chez le rat nouveau né et évaluation de molécules neuroprotectrices. Juin 2007

- Doctorat de sciences

* Véronique Houdouin : « Caractérisation des souches de *E.coli* responsables de pathologies extra-intestinales : approche moléculaire et approche clinique »
Thèse soutenue le 21 Décembre 2007.

* Philippe Bidet : « Caractérisation génétique d'un sous groupe hautement virulent de *E.coli* responsable de pathologies extra-intestinales »
Thèse soutenue le 14 Novembre 2007.

b-Information et conseil aux biologistes et praticiens

La plupart des informations concernant le CNR (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais d'une page Internet sur le site de l'Institut Pasteur <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre/cnr/ecolishig-index.html>

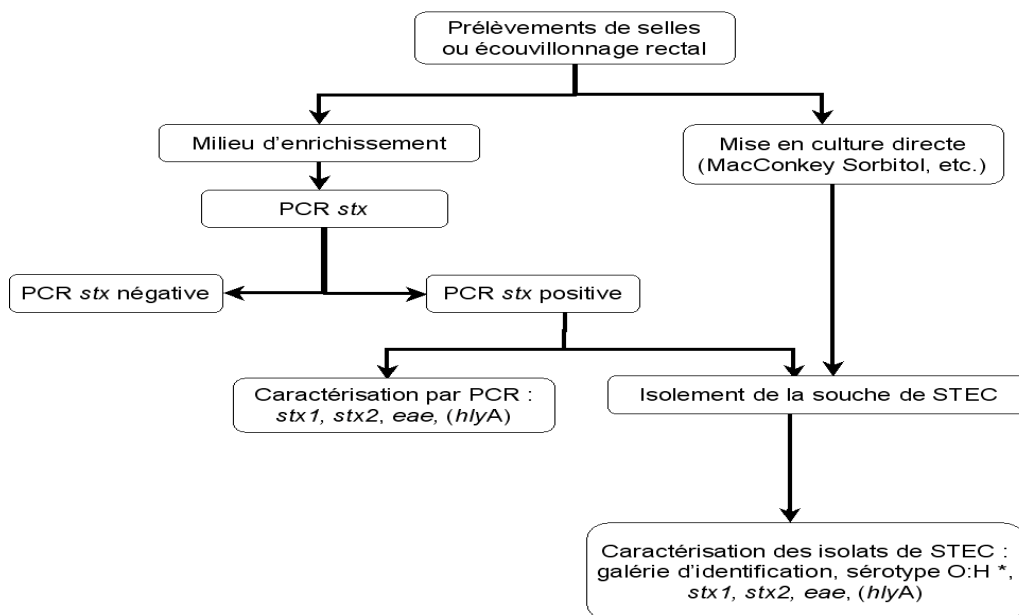
Les résultats sont envoyés au laboratoire par courrier, une copie peut être envoyée par FAX sur demande du laboratoire par téléphone, Fax ou courrier électronique.

Des conseils à la fois pratiques (milieu de transport, feuille d'information...), diagnostic (importance des gènes de pathogénicité ou du sérotype détecté...), thérapeutiques et/ou épidémiologiques sont donnés de façon presque quotidienne par téléphone ou courrier électronique. Les appels reçus sont notés dans un cahier avec la date, l'heure, le laboratoire et le type d'information demandée. Le volume des demandes est très variable et peut aller de 1 à 20 appels par jour.

Des échanges et réponses aux questions se font aussi par Internet par l'intermédiaire du forum du réseau de microbiologie médicale (Reseau-microbiologie-medicale@yahoogroupes.fr) ou de l'adresse colishig@pasteur.fr.

Dans le cadre de l'information au praticien un article a été rédigé par l'InVS, le CNR et le laboratoire associé : **E. Espié, P. Mariani-Kurkdjian, I. Filliol, V. Vaillant et H de Valk. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : Aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue Francophone des Laboratoires. Mars 2008, n°400, p59-65.** Cet article permettra aux laboratoires d'avoir toutes les informations concernant la détection des souches STEC et particulièrement le schéma d'isolement suivant :

Figure 20 : Schémas d'isolement des souches STEC :



c- Diffusion des données de surveillance à l'InVS

Les résultats de sérologie SHU des enfants de moins de 15 ans et des souches *stx*⁺ sont envoyés par Fax à l'InVS dès signature.

Les épidémies potentielles détectées sont signalées par téléphone à l'InVS afin de vérifier si l'épidémie est connue et de s'informer de ce qui peut être en cours d'étude à leur niveau.

La diffusion de données de surveillance aux professionnels se fait lors de cours ou communication spécifique tel que le cours de bactériologie médicale ou encore les journées de veille sanitaire. En cas d'épidémie, la diffusion des données se fait par l'intermédiaire de l'InVS, à la DGS, et aux DDASS.

d- Activités d'expertises après du ministère chargé de la santé, de l'InVS, la DGS, l'AFSSA, l'OMS... :

- Expertise dans le sérotypage et la comparaison au niveau moléculaire des souches par ribotypie ou PFGE qui permet de vérifier l'appartenance des souches à une même épidémie.

- Participation à des conférences téléphoniques ponctuelles en cas d'épidémie pour valider les méthodes de diagnostics de prévention et de traitement.

- Participation au *Shigella* Workshop à ICDDR, Dhaka, Bangladesh les 12 et 13 novembre 2007 : The application of molecular biology techniques for the identification of *Shigella* antigens. (I. Filliol)

- Le laboratoire associé participe au groupe de travail de l'AFSSA, créé en 2004, sur l'appréciation quantitative des risques liés à *E. coli* O157:H7 dans les steaks hachés surgelés consommés en restauration familiale en France par les enfants de moins de 16 ans. Les

différentes étapes de la démarche d'AQR travaux ont été l'évaluation de la contamination des viandes, les données relatives à la consommation, l'évaluation de la destruction thermique et l'établissement d'une loi dose-réponse. Le groupe propose deux lois dose-SHU spécifiques pour les classes d'âge 0-5 ans et 5-10 ans.

Le rapport a été présenté le 25 Janvier 2008 à la Direction générale de l'alimentation le 25 janvier 2008 de façon à réaliser un bilan de la mise en œuvre sur le terrain du plan d'actions global pour la prévention et la maîtrise du danger STEC par l'ensemble des acteurs de la filière steaks hachés. Les travaux se poursuivront au cours de l'année 2008 pour décliner les aspects opérationnels avec chacun des maillons de la chaîne de production et les services de contrôles.

6- Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

A- E. coli : (IP)

a. *Escherichia coli* extra intestinaux

- Etude clinico-biologique des méningites néonatales à *E.coli* en France

Nous avons reçu l'accord du GPIP pour effectuer le recueil exhaustif des données cliniques auprès de chaque service clinique. Cette étude a porté sur les antécédents familiaux, le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et des suites de couches, l'examen clinique à la naissance et le terme de l'enfant, les antécédents personnels, le tableau clinique au moment de la prise en charge de la méningite, l'évolution avec en particulier le décès ou l'apparition de complications et localisations parenchymateuses. Le bilan infectieux réalisé a été détaillé ainsi que l'antibiogramme de chaque souche. Enfin la prise en charge thérapeutique a été étudiée en particulier avec le type, la dose, et la durée des antibiotiques.

Cette étude clinique a été réalisée par le Dr V. Houdouin, (Pédiatre) qui est en Doctorat dans l'EA 3105 en collaboration avec le Pr AUJARD (Service de Néonatalogie). Parallèlement à la caractérisation clinique, la caractérisation génétique des souches d'ECMN a été réalisée au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Robert Debré, comprenant, l'analyse phylogénétique et la recherche de l'ensemble des facteurs de virulence (empreinte de virulence) impliqué à ce jour dans la pathogénicité des ECMN.

Les résultats de ce travail ont permis d'établir pour la première fois une épidémiologie bactérienne et clinique des méningites néonatales à *E. coli* en France avec un taux de mortalité de 14 % et un taux de séquelles neurologiques de 21 %. Les souches ont été caractérisées par la détermination du groupe phylogénétique, du Sequence Type complexe (STc), et du sérotype. Les clones ont été caractérisés par la combinaison du STc et de l'antigène O définissant le « séquence O type ». La caractérisation des souches comparativement aux tableaux cliniques a permis d'associer les souches appartenant à des séquence O types peu fréquents avec la prématurité d'une part et la mortalité d'autre part. Ce travail a fait partie intégrante de la thèse de doctorat de V. Houdouin et a fait l'objet d'un article accepté pour publication.

Véronique Houdouin, Stéphane Bonacorsi, Philippe Bidet, Jorge Blanco, France De La Rocque, Robert Cohen, Yannick Aujard, Edouard Bingen. Association between mortality of *Escherichia coli* meningitis in young infants is associated with non virulent clonal groups of strains. Clin Microb Infect.

- Participation au séquençage et à l'annotation de souches *E.coli* dans le cadre du consortium Coliscope créée en 2003, dirigée par le Pr Denamur de l'unité INSERM U722 en partenariat avec le Génomoscope et qui séquence actuellement 6 souches de *E. coli* représentatives des différents groupes phylogénétiques ainsi que des différentes pathogénies extra-intestinales (www.genoscope.cns.fr). A ce titre la souche S88 (O45:K1:H7) de notre équipe a été choisie comme représentant du clone émergent français responsable de méningites mais aussi (cf infra) de pyélonéphrites avec bactériémies. Au sein de ce consortium deux membres de l'équipe, le Dr S. Bonacorsi et le Dr P. Bidet ont participé à l'annotation de S88 en collaboration avec l'unité INSERM du Pr X. Nassif U570 et également à l'annotation des autres souches. L'annotation de S88 a récemment été finalisée. S88 est caractérisée par un chromosome de 5032 kb et la présence d'un plasmide de 133 kb. Au sein du chromosome 2 îlots de pathogénicité déjà décrits dans d'autres souches de *E. coli* responsables d'infection extra-intestinales ont été identifiés. De plus 7 régions génomiques spécifiques de S88 ont été détectées et sont susceptibles d'héberger de nouveaux facteurs de virulence.

- Relation entre facteur de risque de bactériémie et virulence : notre équipe est directement impliquée dans l'analyse des cas de bactériémies pédiatriques à *E. coli* survenant en France dans le cadre de l'étude Colibafi coordonnée par le Pr E. Denamur (U722). Cette étude multicentrique a pour objectif de déterminer les facteurs de risque des bactériémies à *E. coli* chez l'adulte et chez l'enfant. Les souches de bactériémies isolées chez l'enfant au cours de cette étude (200 souches attendues fin 2008) seront caractérisées sur le plan moléculaire par notre laboratoire. Grâce au recueil exhaustif des données cliniques, il nous sera possible d'établir une collection nationale de souches invasives parfaitement caractérisées sur le plan clinique. Ainsi, une collection de souches isolées de bactériémie d'origine urinaire (représentant la majorité des souches) survenant chez des sujets sans facteurs de risques (immunodépression, anomalies des voies urinaires) pourra être comparée aux souches d'infections urinaires sans bactériémie recueillies précédemment dans le cadre du CIRC. Les attributs qui permettent aux souches hautement virulentes de provoquer une bactériémie que nous avons identifiés lors de l'étude locale pourront ainsi être validés par une étude multicentrique en bénéficiant d'un plus grand nombre de souches. Les facteurs de risque de bactériémies en l'absence d'infection urinaire seront également analysés spécifiquement. Ces collections nous permettront de plus d'entreprendre des études plus approfondies par DNA-array afin de mettre en évidence d'autres attributs encore inconnus impliqués dans la traversée des barrières épithéliales rénales.

b. *E. coli* intestinaux :

Concernant les *E. coli*, la plupart des laboratoires recherche uniquement O157:H7 en se basant sur la réaction au sorbitol. En effet les O157:H7 ne fermentent pas le sorbitol. Or de plus en plus de souches d'*E. coli* atypiques dont des souches qui ne fermentent pas le sorbitol mais qui n'agglutinent pas forcément avec l'antisérum O157 sont observées au CNR.

Nous avons donc décidé d'essayer de déterminer le sérotype des souches sorbitol négatives reçues en 2007 au CNR-IP.

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 37.

Tableau 37 : Résultats de typages des souches d'*E. coli* sorbitol négatives reçues au CNR-IP en 2007 :

Numéro	Agglutination	PCR virulence	prélevements	Sérotypage moléculaire		Remarques
	Sérotype			O	H	
#07 0919	NT		selles	R102	F6	<i>E. coli</i> immobile
#07 3608	NT		selles	NT	F19	
#07 5741	NT		selles	NT	F12	
#07 5772	NT		urines	R83	F4?	
#07 6093	NT	EAST1	selles	R23	F15	
#07 6936	NT		selles	R83	F42/F47	<i>E. coli</i> déficient (Béta glu-)
#07 7502 ou #7550	NT	eae	selles	R115	F8	
#07 8085	rough		sang	ne	ne	
#07 8097	NT		selles	ne	ne	
#07 8139	NT		selles	ne	ne	
#07 0955	O119	eae	selles			
#07 7483	O119	eae, bfpA	selles			
#07 2315	O119	eae	selles			
#07 3212	O119	eae	selles			
#07 2719	O157:H -	eae, hlyA	selles			
#07 3412	O157:H -	eae, hlyA	selles			
#07 6234	O157:H -	stx2, eae, hlyA	selles			
#07 6986	O157:H -	stx2, eae, hlyA	selles			
#07 4726	O157:H -	eae	selles			
#07 7344	O157:H7	stx2, eae, hlyA	urines			
#07 1823	O157:H7	stx1, stx2, eae, hlyA	selles			
#07 7671	O157:H7	stx2, eae, hlyA	selles			
#07 5655	O157:H7	stx2, eae, hlyA	selles			
#07 2909	O157:H7	stx2, eae, hlyA	selles			
#07 0016	O157:H7	eae, hlyA	fèces de singe			
#07 6132	O157:H7	stx2, eae, hlyA	fèces de singe			
#07 6133	O157:H7	stx2, eae, hlyA	fèces de singe			
#07 0251	O26	eae	selles			
#07 6513	O26	eae	selles			
#07 1108	O86	EAST1	selles			

NT= non sérotypable (profil non présent dans la base de donnée)

ne = non effectué pour l'instant

30 souches sorbitol négatives ont été répertoriées en 2007, certaines étaient agglutinables et seulement 13 souches étaient O157 (43.3%) dont 7 immobiles. Les sérotypes de souches non O157 sont variés avec quatre O119, deux O26, un O86 un R23, un R83, un R102 et un R115. Il est donc important de ne pas basé le diagnostic O157 seulement sur le sorbitol.

Seules certaines des souches O157 sorbitol négatives présentaient des gènes *stx* (9/13).

Dans aucun cas le sorbitol ne peut suffire à établir le diagnostic. Le sérotypage et surtout la mise en évidence des gènes de virulence sont essentiels pour l'identification des souches STEC.

B- Shigella (IP) :

*** le CNR-IP participe au projet ACIP (Action Concertée Institut Pasteur) au « diagnostic d'urgence de la dysenterie et des diarrhées hémorragiques. Ce projet est étroitement lié à un nouveau projet PTR 179 (Programme Transversal de Recherche) : « An emergency diagnosis for bloody diarrhea »**

Dans le cadre de la lutte contre les maladies infectieuses dans les pays en développement, l'IP projette de réaliser le diagnostic rapide (10 minutes) sur le terrain (au pied du malade) des principales étiologies de la dysenterie et des colites hémorragiques à l'aide d'un outil simple à utiliser, peu onéreux et robuste. Deux objectifs sont définis :

(1) Développer des épreuves immunochromatographiques (captures antigéniques) sur bandelettes pour :

- *S. dysenteriae* 1
- *S. flexneri* 2a
- les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)
- *Entamoeba histolytica*

(2) Valider ces épreuves en conditions réelles sur le terrain.

Dans ce cadre le CNR fournit les souches de référence après contrôle de leur sérotypes et compositions en gènes de virulence. Ce PTR est en phase de validation sur le terrain pour certains pathogènes et d'autres sérotypes de *Shigella* et des facteurs de pathogénicité vont être ajoutés afin d'avoir une panoplie plus complète et plus précise de bactéries détectées.

Une bandelette pour la détection de *S. sonnei* est aussi en cours de développement.

*** Caractérisation du gène responsable de la résistance à l'AZM dans le cadre de l'épidémie à *S. sonnei* en Ile de France :** le CNR et le laboratoire associé ont dans ce cadre effectué la comparaison des souches par PFGE et REP-PCR (cf. partie 3-3 a), et le Pr Roland Leclercq (service de Microbiologie, CHU de Caen), a réalisé la caractérisation du gène de résistance aux macrolides. Un gène porté par un plasmide de conjugaison a pu être mis en évidence chez la souche résistante. Un article a été soumis pour publication.

*** Participation au Projet INSERM-CONICYT avec l'Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire (INSERM U786) :** le sujet étant l'amélioration de la surveillance des infections à *Shigella* dans la communauté semi-rurale nord de Santiago, Chili. Evaluation de terrain de nouveaux outils diagnostiques en vue de futurs essais vaccinaux.

Dans ce cadre le CNR a collaboré lors du stage de 2 semaines en juillet du Dr Cécilia Toro en fournissant des souches de différent sérotypes et différentes origines pour tester une PCR multiplex *set*, *sen* et *virF*, afin de tester la spécificité ou non des résultats pour distinguer *S. flexneri*. Un article a été soumis pour publication.

Participation au projet ACIP *Shigella «Epidémiologie moléculaire de la multirésistance aux antibiotiques chez *Shigella flexneri* en Afrique et en Asie». Ce projet qui a débuté cette année, sous la direction du Dr Antoinette Ngandjio du Centre Pasteur du Cameroun, vise à étudier les caractéristiques génétiques des souches de *S. flexneri* isolées en 2004-2005 dans trois pays africains (Cameroun, République Centrafricaine, Sénégal) et un pays asiatique (Vietnam). Après confirmation du phénotype ACSSuTe, les gènes de résistance correspondants seront recherchés et leurs localisations déterminées (plasmidique ou

chromosomique). La diversité génétique des souches sera déterminée par électrophorèse en champ pulsé.

Dans ce cadre le CNR a organisé la réunion de début de projet les 12 et 13 décembre 2007, et a été chargé de la rédaction de tous les protocoles (PCR, PFGE...) afin d'uniformiser les techniques et aussi de fournir les ADN témoins + pour chacune des PCR.

Ce projet permettra de connaître les gènes impliqués dans la résistance de type ACSSuTe chez *S. flexneri*, de même que la diversité clonale des souches. Il permettra aussi d'améliorer les compétences des sites collaborateurs en matière d'étude des mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques.

*** Projet d'étude de la structure de la population des *S. sonnei* :** ce projet initié par le Wellcome Trust Sanger Institute à Cambridge (UK) prévoit de typer un grand nombre de souches de *S. sonnei* du monde entier en utilisant le "Multi Locus Sequence Typing" (MLST) et des PCR ciblant des régions d'évolution rapides (surtout phagiques). Ce travail sera réalisé sur une collection d'environ 150 souches de *S. sonnei* du CNR, isolées entre 1943 et 2007.

*** Validation et mise en place d'une nouvelle technique de typage des souches de *S. sonnei* : le « multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) ».** Cette technique, développée au CDC de Taiwan, serait susceptible d'être plus discriminante et surtout plus simple à utiliser que le PFGE pour *S. sonnei*. La validation de la méthode, passe par le typage avec 26 loci d'un grand nombre de souches de différentes origines. Ce travail sera réalisé sur une collection d'environ 150 souches de *S. sonnei* du CNR, isolées entre 1943 et 2007. Une première validation de la méthode au CNR sera effectuée à l'aide des 4 loci (sur les 26 loci décrits) définis comme les plus discriminants.

*** Caractérisation des séquences de flagelline *fliC* de *Shigella*:**

Les souches de *Shigella* étant immobiles, le gène de la flagelline est considérée comme cryptique. Il est important pour connaître l'évolution des souches et essayer d'expliquer leur immobilité. Le CNR possède une base de données de profils de restriction de la région « H » (gène *fliC*) avec près de 150 souches séquencées pour 35 sérogroupes de référence (O). En 2007, le CNR s'est particulièrement intéressé au séquençage du gène *fliC*. La présence de séquences d'insertion dans *fliC* a pour l'instant pu être mise en évidence pour différents sérotypes de *S. dysenteriae* et *S. boydii*, par contre aucune séquence d'insertion n'a été détecté dans le *fliC* de *S. flexneri* et *S. sonnei*.

*** Etude de la présence de séquences répétées dans le génome de *Shigella* : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)**

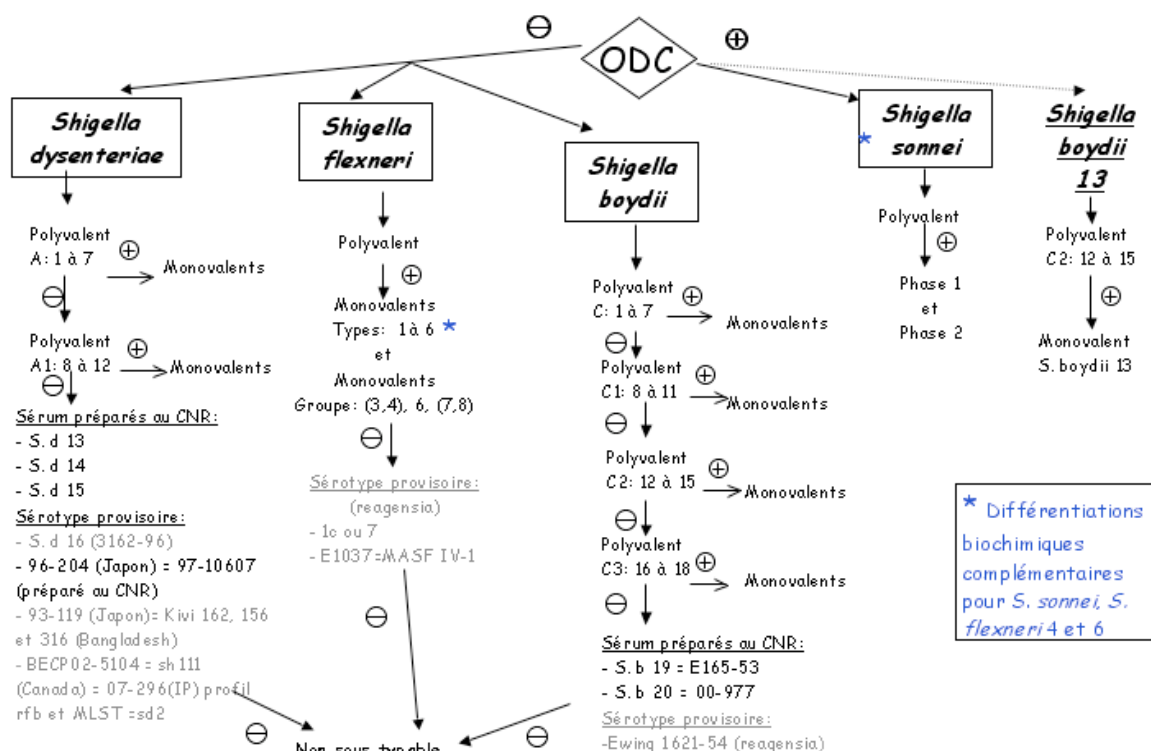
Le terme CRISPR désigne une famille de séquences génomiques répétées. Cette famille se caractérise par des séries de répétitions directes, courtes (de 21 à 37 paires de bases) et régulièrement espacées par des séquences, généralement uniques et non codantes, de 20 à 40 paires de bases (Espaceurs ou Spacers).

Une séquence répétée avait été mise en évidence chez *E. coli* par Jensen et al, en 2002 (Mol. Microbiology). Nous avons évalué sa présence dans les génomes publiés de *E. coli* et *Shigella*. Deux loci (1 et 2) ont été mis en évidence et des amorces pour le séquençage du premier locus ont été dessinées et sont en cours d'analyse pour les différents sérotypes de *Shigella*.

L'étude de la composition des souches en séquences espaceurs pourrait apporter un plus au typage des souches de *Shigella*.

* **Essai de caractérisation de nouveaux sérotypes de *Shigella*.** Chaque année le CNR isole des souches non sérotypables en agglutination classique. Dans ce cadre les souches non sérotypables de la collection du CNR et de l'ICDDRDB ont été analysées à la fois par agglutination avec nos sérums «maison» mais aussi par des méthodes moléculaires telles que le sérotypage moléculaire par *rfb*-PCR-RFLP, séquençage *fliC* et aussi le typage MLST en utilisant le set de gène décrit par Mark Achtman, Berlin (D). Ces comparaisons ont permis de relier des souches de *S. dysenteriae* décrites comme nouveaux sérotypes isolées au Japon et avec des souches isolées au Bangladesh, (étude et article en cours pour la définition de ce nouveau serotype). Un bilan des souches décrites dans la littérature comme nouveaux sérotypes a été fait lors du *Shigella* Workshop (ICDDRDB, Dhaka, Bangladesh en Novembre 2007) regroupant plusieurs équipes dont le CNR (CDC, ICDDRDB, IP). A la suite, le CNR a modifié son schéma d'agglutination (figure 21) pour y inclure les sérotypes provisoires décrits dans la littérature. En plus des sérums de Denka seiken (Japon, commercialisés par Eurobio) ou de SIFIN (Allemagne), de nouveaux sérums complémentaires ont été mis sur le marché et seront testés par le CNR, tels que les anticorps monoclonaux de Reagensia (suède).

Figure 21 : Schéma d'agglutination des *Shigella* au CNR (sérum Eurobio= Denka seiken) :



Les sérotypes provisoires dont les sérums ne sont pas disponibles au CNR sont indiqués en grisé. Les sérums commercialisés par Reagensia vont être testés prochainement.

* Étude de *S. dysenteriae* 1

Shigella dysenteriae de type 1 ou Bacille de Shiga est une bactérie entéropathogène très importante en Santé Publique car (i) elle a un potentiel épidémiogène (responsable de grandes épidémies dans les pays en voie de développement et est parfois importée en France chez des voyageurs), (ii) elle possède comme facteur de virulence la Shigatoxine, (iii) elle est multirésistante aux antibiotiques, (iv) et c'est un agent infectieux potentiel pour le bioterrorisme.

Actuellement les méthodes de sous-typage reposent sur le profil plasmidique, méthodes peu discriminantes, puis plus récemment, sur l'électrophorèse en champ pulsé (ECP), méthode qui n'apporte aucune information sur les relations évolutives entre les souches. De plus, il existe des modifications artefactuelles du profil de l'ECP du fait de la présence de plasmides ou suite à la mobilisation de séquences d'insertion, qui peuvent fausser son interprétation.

Il est donc important de pouvoir disposer d'une méthode de sous-typage fin de cet agent pathogène pour pouvoir investiguer les épidémies, pour pouvoir identifier et suivre certaines souches d'intérêt (souches virulentes, souches vaccinales en cours d'essais, souches potentiellement utilisées dans un but de bioterrorisme) et qui permettrait de retracer l'histoire évolutive de cet agent pathogène.

Pour cela nous avons constitué une collection de 100 souches issues du CNR-ESC, du CDC d'Atlanta et de l'ICDDR, Dhaka, Bangladesh représentant la plus grande biodiversité possible (souches isolées de 1918 à nos jours sur les différents continents). Ces souches ont été typées par les méthodes classiques (ECP avec les enzyme *XbaI* et *NotI*) et le support de la résistance aux antibiotiques (plasmide ou îlot génomique SRL-PAI) a été étudié.

L'analyse préliminaire des populations par la méthode MLST (schéma de Mark Achtman, Max Planck Institute, Berlin) de 38 souches du CNR-ESC n'a montré la présence que de deux séquençotypes, ST146 et ST260 qui ne diffèrent que par une mutation ponctuelle (ou Single Nucleotide Polymorphism, SNP) dans le gène *fumC*. L'analyse du seul génome de Sd1 publié (Sd197, souche isolée d'une épidémie en Chine dans les années 1950) et de celui en cours d'assemblage au Sanger Institute (M131649, souche multirésistante aux antibiotiques isolée d'une épidémie au Guatemala dans les années 1970) révèle que ces deux souches appartiennent également au même séquençotype, ST146.

Pour mettre au point une technique de sous-typage fin, nous allons devoir étudier plusieurs autres gènes comportant des SNPs. Un seul génome de Sd1 étant publié et un autre étant en cours d'assemblage, le choix des gènes à analyser sur la base de ces deux génomes risque de faire perdre de l'information du fait d'un biais de sélection de ces souches (ce d'autant qu'ils appartiennent au même ST). Nous sommes en train de faire l'inventaire de ces SNPs potentiels sur un sous-ensemble de 20 souches par la méthode Comparative Genome Sequencing Microarrays " (CGSM) proposée par la compagnie NimbleGen. A l'aide d'une puce, la présence de SNPs entre la souche à tester et la souche séquencée (sd197) va être recherchée sur 500 000 nucléotides (soit 500 à 1000 ORFs en double brin).

Dans un deuxième temps, nous analyserons la séquence des gènes contenant ces SNPs sur les 80 souches additionnelles de Sd1 par une puce de reséquençage ou par hybridation en milieu liquide (méthode Luminex). Le choix de la méthode se fera en fonction du nombre de gènes polymorphes détectés par CGSM.

7- Liste des publications et communications 2007

Publications

Grimont F, Lejay-Collin M, Talukder KA, Carle I, Issenhuth S, Le Roux K, Grimont PA. Identification of a group of shigella-like isolates as *Shigella boydii* 20. J Med Microbiol. 2007; 56:749-754.

Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, Durand L, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Nassif X and S. Bonacorsi. Detection and Identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. Appl. Environ. Microbiol 2007; 73; 2373-2377.

Houdouin V, Bonacorsi S, Mahjoub-Messai F, Mariani-Kurkdjian P, Bidet P, Sebag G, Loirat C, Bourrillon A and E Bingen. Phylogenetic groups and virulence factors of *Escherichia coli* strains causing pyelonephritis in children with and without urinary tract abnormalities. Clin Microb Infect. 2007 ; 13 : 740-742

Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, S Bonacorsi. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and or meningitis J. Infect. Dis 2007 ; 196 : 297-303.

Congrès nationaux ou internationaux en relation avec le CNR

I. Filliol. The application of molecular biology techniques for the identification of *Shigella* antigens. Communication Orale, *Shigella* Workshop, 12 & 13 Novembre 2007, ICDDR Dhaka, Bangladesh.

E. Daudens, I. Filliol, D. Dejour-Salamanca. Epidémie de GEA à *Shigella sonnei* résistantes à l'amoxicilline, au cotrimoxazole et à l'azithromycine en Ile-de-France, Janvier-Avril 2007. Journée de Veille Sanitaire, InVS, le 30 novembre 2007. Communication Orale par E. Daudens.

Participation de FX. Weill et I. Filliol à la Réunion annuelle du réseau européen de surveillance des maladies entérique (Enter-Net. Vienne, Autriche, du 5 au 7 juillet 2007.

S. Bonacorsi. "An emerging clone of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis and urosepsis". EMBO-FEMS Symposium : *Escherichia coli* – Facets of a versatile pathogen. 9-12 Octobre 2007, Université de Wuerzburg; Allemagne. Participation de I. Filliol au congrès.

Bonacorsi Stéphane, Bidet Philippe, Mariani Patricia, Doit Catherine, Ait Ifrane Shadia, Courroux Céline, Bingen Edouard. Caractérisation des groupes clonaux mondiaux de *Escherichia coli* responsables de méningite néonatale par rep-PCR semi-automatisée. RICAI , Paris, Décembre 2007.

8- Programme de travail 2008-2009

Dans le but de confirmer l'identité des souches reçues au **CNR-IP** et au **laboratoire associé** au niveau de l'espèce (espèce génomique *E. coli/Shigella*):

CNR-IP et le laboratoire associé réaliseront la recherche du gène *uid* codant la beta-glucuronidase par PCR, différenciant les *E. coli / Shigella* des autres *Escherichia* (système PCR d'Atlas)

Le CNR-IP réalisera dans les cas de souches difficilement identifiables:

- Le séquençage du gène *rrs* (importante base de données) et du gène *rpoB* permettant de confirmer l'identité de la souche à l'espèce (banque de données en cours au laboratoire pour toutes les Entérobactéries)

A/ Pour les *E. coli* responsables d'infections digestives

Point 1- Contribution au développement du diagnostic de routine des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et en particulier des *E. coli* producteurs de Shiga toxines (STEC) dans les laboratoires de diagnostic :

Développement et/ou amélioration des méthodes diagnostiques :

- Détection des gènes de virulence *stx1*, *stx2* et *eae* par l'optimisation de PCR multiplex de façon à réduire le nombre de PCR, et coordination des techniques utilisées entre le CNR et le laboratoire associé.
- Sous typage des gènes de shigatoxine en parallèle par des méthodes de PCR et restriction enzymatique (IP) et par PCR spécifiques (RD).
- Sous typage des gènes *eae* par PCR.
- Développement d'une base de données moléculaire avec la méthode de PFGE avec numérisation des profils afin de constituer une banque de données de profils types de *E. coli* O157:H7 qui pourraient être comparées avec les autres banques de données internationales, américaines (PulseNet) et européennes (EnterNet) afin d'identifier la circulation de clones en Europe et avec les USA. Les profils types de 48 souches françaises de *E. coli* O157:H7 ont déjà été étudiées et publiées (*Bidet et al, J Med Microb* 2005) (**CNR-IP et Laboratoire associé**)
- Participation au **diagnostic d'urgence de la dysenterie et des colites hémorragiques** (projet PTR 179) ; afin de permettre un diagnostic direct dans les selles des principaux pathogènes tels que *S. dysenteriae* 1, *S. flexneri* 2a, *S. Sonnei*, *E. coli* O 157 et les toxines *stx1* et *stx2*. Ce PTR devrait être ensuite généralisé à de nombreux sérotypes et de nombreuses autres espèces bactériennes responsables de diarrhées.

Développement de l'information des laboratoires et de leur formation par la diffusion de guides techniques :

Dans ce cadre un article a été rédigé par l'InVS, le CNR et le laboratoire associé : **E. Espié, P. Mariani-Kurkdjian, I. Filliol, V. Vaillant et H de Valk. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : Aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue Francophone des Laboratoires. Mars 2008, n°400, p59-65.** Cet article permettra aux laboratoires d'avoir toutes les informations concernant les souches STEC. De plus le CNR-IP et le Laboratoire associé vont continuer le travail d'information des laboratoires et de formation de stagiaires déjà entrepris.

Point 2- Contribution à la surveillance des infections à STEC et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire, en confirmant l'infection à STEC

Le CNR-IP et le Laboratoire associé vont poursuivre la surveillance des infections à STEC, en collaboration avec l'InVS, par

- Par la détection de gènes de pathogénicité sur les souches isolées ou directement à partir des selles particulièrement *stx* et *eae*, afin d'établir le lien avec le diagnostic SHU.
- **Par le sérodiagnostic (CNR-IP)** avec la technique de "line-blot" utilisant les 8 sérogroupes de *E. coli* fréquemment associés à la survenue de SHU (O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, et O157) **voir les 23 sérogroupes sur demande.**
- **Par la participation au Réseau Français de surveillance du syndrome hémolytique et urémique** en collaboration avec la Société Française de Néphrologie Pédiatrique et au **réseau Européen de surveillance des *E. coli* entérohémorragiques (EnterNet)**
- **La surveillance et l'alerte** s'effectueront comme décrit précédemment avec des possibilités d'adaptation en fonction des épidémies et des besoins diagnostics et à la demande de l'InVS.

Point 3. Participation, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire, à l'investigation de cas groupés

Le CNR-IP et le Laboratoire associé vont poursuivre leur participation à l'investigation des cas groupés, en collaboration avec l'InVS, par :

- **Typage des souches et comparaison des souches isolées chez les malades et d'autres sources (alimentaire ou animale):**

Les souches STEC suspectées groupées sont étudiées par :

- **Ribotypie manuelle ou automatisée** grâce au RiboPrinter® (Qualicon) avec lequel huit souches peuvent être ribotypées à la fois en quelques heures au lieu d'une semaine manuellement.
- **Electrophorèse en champ pulsé réalisé selon le protocole standardisé.** Cette technique a démontré une capacité de typage et un pouvoir discriminant élevés dans un grand nombre d'espèce. Cette technique permet le typage de 21 souches en même temps en minimum 3 jours.

Point 4- Collaboration avec les structures en charge de la surveillance chez l'animal, dans les aliments

Une collaboration a été engagée et se continuera avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme l'Ecole Vétérinaire de Lyon et de Maisons-Alfort, ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

Point 5- Contribution à des études de recherche appliquée

• **Sérotypage moléculaire des *Escherichia coli* (CNR-IP) :**

Le sérotypage des *E. coli* étant difficile (peu de sérums commercialisés, sérums non absorbés, nombreuses réactions croisées et incertitudes, prix des sérums élevés), avec une grande complexité du système de sérotypage (plus de 170 antigènes O et plus de 20 antigènes H connus) et l'émergence de nouveaux sérotypes. Nous avons mis au point une méthode de remplacement le sérotypage moléculaire.

- Cette méthode permet de déterminer un sérotype par comparaison des **profils de restriction obtenus après amplification de la région "O" (gène *rfb*) et "H" (gène *fliC*) des *Escherichia coli* et comparaison à la base de profils de référence**. Cette base comporte actuellement près de 250 profils correspondant à 148 sérogroupes O, et 155 profils correspondant à 70 sérogroupes H pour *E.coli*. Toutes les souches possédant des gènes de Shigatoxines qui n'ont pas pu être agglutinées, sont sérotypées de cette façon chaque année afin d'essayer de déterminer la prévalence des différents sérotypes chez les EHEC. Bien sûr cette technique permet d'avoir un nom de sérotype que lorsque celui-ci a été décrit c'est pourquoi la base de données est régulièrement complétée avec de nouveaux profils

- **Le séquençage du gène *fliC*** est particulièrement utilisé par le CNR pour déterminer le type H flagellaire. Cette technique est plus rapide et plus précise, mais nécessite la construction d'une importante base de données. Pour l'instant la base comporte un total de 744 souches séquencées pour un total de 550 profils pour 93 sérotypes H de *E. coli*. Cette base permet l'identification des souches les plus répandue, ainsi 100% des souches testés lors du contrôle enternet de 2007 ont pu être identifiées.

• Un Projet PHRC intitulé « **Facteurs de susceptibilité et de gravité dans le syndrome hémolytique et urémique du à *Escherichia coli* producteurs de Shiga like-toxine chez l'enfant** » a été déposé par le Pr Chantal LOIRAT (Service de Néphrologie, Hôpital Robert Debré, Paris). Ce projet vise à :

- étudier les corrélations entre la susceptibilité au SHU à STEC, sa gravité, et les gènes de virulence des STEC d'une part, le génotype du complément des patients d'autre part.
- Comprendre les mécanismes de la variabilité de gravité entre les patients et les personnes d'une même famille.
- Mieux comprendre ainsi la physiopathologie de la maladie.

Dans ce cadre, pour tous les enfants atteints de SHU D+ de 2008 à 2010 (ainsi que les frères et sœurs et les parents ayant une diarrhée), le CNR réalisera la mise en évidence d'anticorps anti LPS contre les 23 sérotypes disponible et le laboratoire associé réalisera l'analyse des selles, la détection de gènes de virulence (*eae*, *ehly*, *stx1*, *stx2* et leurs variants) et l'isolement des souches. En parallèle, sera effectué un recueil des données cliniques (critères de gravité) à la phase aiguë et à 1 an de recul, ainsi que l'analyse des gènes (mutations et polymorphismes) du complément (FH, FI, MCP, FB et C3)

• **Sensibilité aux antibiotiques des souches STEC (Laboratoire associé)**

Bien que l'utilisation des antibiotiques soit controversée dans les diarrhées à STEC, la sensibilité aux antibiotiques de ces souches reste importante à déterminer pour suivre l'évolution de la résistance de ces bactéries. La sensibilité des souches aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, aminosides et ciprofloxacine et azithromycine sera étudiée par la méthode de l'antibiogramme et la détermination des CMI. Ces techniques sont réalisées quotidiennement au laboratoire. La prévalence annuelle de la résistance pour chacun de ces antibiotiques sera ainsi déterminée.

Point 6- Contribution avec l'Institut de Veille Sanitaire aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens (Enter-Net)

- Le CNR participe depuis plusieurs années au réseau européen de surveillance Enter-Net qui est chargé de la surveillance internationale des infections gastro-intestinales humaines (*E. coli* entérohémorragiques).
- Le CNR répond aux demandes d'information émanant du réseau ENTER-NET où émanant de centres ou d'autorités sanitaires des états de l'Union Européenne et des pays de l'espace économique européen.
- Le CNR-IP et le laboratoire associé participent chaque année à des **contrôles de qualité** externes internationaux sur le « sérotypage, détection de gènes de virulence et PFGE de souches STEC ou *E. coli* » organisés par le **Réseau Européen de Surveillance aux infections à EHEC (Enter-Net)**

Point 7- Contribution à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles..

Le CNR et le laboratoire associé transmettent et continueront à transmettre quotidiennement par fax, téléphone, email et/ou par courrier tous les foyers de cas groupés à un même groupe de STEC (épidémies familiales, hospitalières, scolaires, crèches, toxi-infections alimentaires collectives, infections collectives) signalés par les laboratoires correspondants.

B/ Pour les *E. coli* responsables de méningites néonatales (Laboratoire associé)

Point 1- Développement et mise en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches. Distinction des souches responsables de cas groupés de celles responsables de cas sporadiques et affiliation des souches aux différents clones :

- Typage et génotypage de *E. coli* responsables de méningite néonatale (ECMN)

Les souches sont caractérisées d'une part par leur appartenance à un groupe phylogénétique et d'autre part par leur empreinte de virulence.

Le groupe phylogénétique sera déterminé par un PCR multiplex permettant de distinguer les 4 principaux groupes (A, B1, B2, D). Les sous groupes phylogénétiques seront déterminés par ribotypage (figure 6).

Les empreintes de virulence comporteront la recherche par PCR des gènes de virulence suivant :

- Adhésines : Pfimbriae (*papC*, *papGII*, *papGIII*), Sfimbriae (*sfaS*, *sfa/foc*)
- Toxines : Hémolysines (*hlyC*), cytotoxique necrotising factor (*cnfI*)
- Systèmes de captation du fer: yersiniabactine (*fyuA*), aerobactine (*iucC*), salmocheline (*iroN*)
- Invasines : invasine brain endothelial cell (*ibeA*)

L'ensemble de ces caractéristiques associé à la recherche phénotypique du sérotype capsulaire K1 et des principaux antigènes somatiques O (83, 45, 18, 16, 7, 1) permettra d'affilier chaque souche à un groupe clonal. Ce résultat sera confronté aux données cliniques de chaque patient.

De plus dans le cadre d'un projet collaboratif avec l'unité INSERM U722 du Pr Denamur, notre souche de référence O45 a été séquençée au Génoscope. L'analyse de la séquence a permis de développer une PCR spécifique du locus codant pour l'antigène O45.

- Investigation de cas groupés

Le laboratoire apportera également son expertise dans l'analyse de la survenue de cas groupés ou de la transmission mère-enfant qui pourra être réalisée grâce au typage des souches par champ-pulsé. Ces investigations bénéficieront de l'expérience du laboratoire depuis une quinzaine d'années dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire ce qui nous a permis de constituer une banque de profils type.

Point 2- Développement du réseau national de surveillance en lien avec l'InVS

Le Pr E. Bingen est coordinateur avec le Pr Aujard (Chef de service de Néonatalogie) de l'Observatoire national des méningites bactériennes de l'enfant. Cet observatoire a été créé à l'initiative du Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP) de la Société Française de Pédiatrie (SFP) et de l'association clinique et thérapeutique infantile du Val de Marne (ACTIV). Cet observatoire comprend un réseau 259 services de pédiatrie et 168 services de bactériologie répartis dans toutes la France.

Une meilleure prévention et l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des méningites à *E. coli* nécessitent l'établissement de **facteurs de risque prédictifs d'infection d'une part et prédictifs d'évolution péjorative** d'autre part. A ce jour il n'existe aucune étude nationale ou internationale ayant permis d'établir de tels facteurs.

Nous nous sommes proposés à travers une enquête nationale d'établir des facteurs prédictifs de risque en intégrant les données cliniques et microbiologiques moléculaires des méningites néonatales à *E. coli*.

Ce travail fait actuellement l'objet d'un thèse (Véronique Houdouin)

Point 3- Etude et suivi de la résistance des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, aminosides et ciprofloxacine sera étudiée par la méthode de l'antibiogramme et la détermination des CMI. Ces techniques sont réalisées quotidiennement au laboratoire. La prévalence de la résistance pour chacun de ces antibiotiques pourra ainsi être déterminée.

Point 4- Expertise pour une aide au diagnostic des méningites décapitées par antibiothérapie

Le laboratoire apportera une expertise pour l'aide au diagnostic des méningites néonatales décapitées par une antibiothérapie par la réalisation de PCR spécifique vis à vis de *E. coli* et le cas échéant vis-à-vis d'autres bactéries responsables de méningites néonatales. Le laboratoire a acquis une expérience en matière de diagnostic par PCR des méningites décapitées (Negre et al 2004) et à ce titre a obtenu l'appel d'offre pour l'innovation technologique de l'APHP.

Le laboratoire, de part son rôle de référent en thérapeutique anti-infectieuse au sein de l'hôpital Robert-Debré, pourra apporter son aide dans la prise en charge thérapeutique et le suivi du traitement antibiotique des méningites néonatales.

Point 5 -Contribution à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel

Grâce au réseau de l'Observatoire national des méningites, le laboratoire pourra signaler à l'INVS toute augmentation significative de cas liés à un clone ainsi que la survenue de formes cliniques particulières ou de souches inhabituelles.

C/ Pour les *Shigella*

Point 1- Suivi des tendances évolutives temporelles des différentes espèces de *Shigella*, en s'appuyant sur le réseau de LABM sur tout le territoire :

- **Sérogroupage des *Shigella* (CNR-IP)**

Les *Shigella* sont des *E. coli* adaptés à l'homme. L'identification des *E. coli* et des *Shigella* s'effectue habituellement à l'aide de caractères biochimiques. Mais les caractères différentiels entre *E. coli* et *Shigella* sont parfois peu nombreux, en particulier dans le cas des variants immobiles et agazogènes de *E. coli*. La différenciation par les tests biochimiques des espèces de *Shigella* est alors assez difficile. Le genre *Shigella* comprend 4 espèces (*dysenteriae*, *boydii*, *flexneri*, et *sonnei*), différenciées grâce à l'antigène O, qui sont elles-mêmes subdivisées en sérotypes ou sérovars. Le laboratoire peut identifier par agglutination à l'aide d'une cinquantaine de sérums agglutinants spécifiques (commercialisés ou produits au CNR), 16 sérogroupes de *Shigella dysenteriae*, les 6 sérotypes de *Shigella flexneri*, les 20 sérogroupes de *Shigella boydii* et d'autres sérogroupes non encore validés. Les sérums polyvalents sont disponibles dans le commerce.

La diversité antigénique des *Shigella* permet parfois **l'émergence de nouveaux sérogroupes de *Shigella***. En absence d'agglutinations avec les sérums dirigés contre les sérogroupes connus, le typage moléculaire associé à l'analyse moléculaire des antigènes somatiques de *Shigella* (sérogroupage moléculaire) permet d'orienter le diagnostic vers une espèce de *Shigella* et éventuellement d'envisager l'existence d'un nouveau sérotype. Dans ce cas, un sérum agglutinant spécifique est fabriqué chez le lapin. De plus les sérums complémentaires de Reagensia seront testés sur les souches non agglutinables.

Capacité de sérogroupage du laboratoire : environ 1.000 souches de *Shigella* sont étudiées annuellement.

- Détection des **gènes codant l'invasivité (*ial* et *IpaH*)** permet de différencier une souche déficiente de *E. coli* d'une *Shigella*. Il est plus difficile d'éliminer un *E. coli* entéroinvasif (EIEC) mais ces derniers sont rares

- **Ribotypie :** Pour *Shigella*, les ribotypes sont très bien corrélés aux sérogroupes pour *S. dysenteriae*, et *S. boydii*. Par contre un seul ribotype en général correspond pour *S. flexneri* ou pour *S. sonnei*. La ribotypie permet le rapprochement d'une souche atypique à une espèce ou à un sérotype de *Shigella*. Une nouvelle base de données de ribotypie pour *Shigella* avec l'aide de l'appareil automatisé, le RiboPrinter® (Qualicon) et l'endonucléase *MluI* a été constituée.

- **PFGE ou analyse moléculaire par électrophorèse en champ pulsé est réalisé avec plusieurs endonucléases** car il existe une grande homogénéité chez les « espèces de *Shigella* », cette technique permet la comparaison des souches humaines entre elles en cas d'épidémie.

Point 2- Suivi de l'évolution de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques et des mécanismes de résistance en liaison avec le CNR de la résistance aux antibiotiques :

La surveillance de la résistance aux antibiotiques des *Shigella* est maintenant réalisée en routine avec une attention particulière aux souches de *S. sonnei* résistante à AMX et SXT et la mise en place en routine pour ces souches d'un antibiogramme complémentaire à l'AZM. La caractérisation des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques est en cours de réalisation au CNR-IP et fait l'objet d'un projet ACIP *shigella* avec différents pays d'Afrique et d'Asie. Dans ce cadre le CNR devrait réaliser une étude sur les souches de Guyanes Française.

Point 3 - Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire

Le CNR continuera de communiquer à l'InVS tous les cas groupés d'infections à *Shigella* (épidémies familiales, hospitalières, scolaires, crèches, toxi-infections alimentaires collectives, infections collectives) signalés par les laboratoires de son réseau.

En cas d'investigation de cas groupés, le CNR communiquera aux autorités sanitaires, aussi fréquemment qu'il est nécessaire, les informations épidémiologiques essentielles sur les nouvelles souches identifiées par le CNR comme appartenant au sérotype épidémique. Le CNR mettra en œuvre toutes les techniques de typage nécessaires à l'identification d'un clone épidémique.

Point 4- Contribution à des études de recherche appliquée

Le CNR poursuivra ses travaux de recherche appliquée sur :

- **Le sérogroupage moléculaire (CNR-IP)**

- Une base de données de profils de restriction de la **région « O » (gène *rfb*)**, déjà constituée 55 profils pour 31 sérogroupes de référence et 10 souches non sérotypable, sera complétée avec les nouveaux sérogroupes de *Shigella*

- Une base de données de profils de restriction de la **région « H » (gène *fliC*)** est constituée près de 150 profils pour 35 sérogroupes de référence (O) sera peu à peu remplacé par le **séquençage du gène *fliC***. Le gène *fliC* de 151 souches représentant la plus part des sérotypes a été séquencé en totalité ou partiellement (pour les souches présentant des séquences d'insertion). Le séquençage total à l'aide d'amorce interne est en cours. Un pré alignement des séquences obtenues en enlevant les séquences d'insertion a permis de définir 2 grand groupes regroupant différents sérotypes ainsi que d'identifier des sérotypes présentant des séquences *fliC* spécifiques (analyse en cours). Par la suite une analyse des séquences permettra de déterminer les atouts et limites de cette base.

- **L'étude moléculaire de nouveaux sérogroupes de *Shigella***

Dans ce cadre les essais démarrés en 2007 avec ICDDRDB devront être poursuivis et les souches non sérotypable par agglutination seront typées de façon moléculaire et de nouveaux sérums seront préparés si besoin pour les nouveaux sérotypes majeur. De plus le CNR testera les sérums monoclonaux complémentaires de réagensia pour les souches non agglutinables.

- **Les mécanismes de résistance aux antibiotiques :**

Ce volet sera particulièrement étudié chez *S. flexneri* dans un premier temps, grâce à l' ACIP *Shigella* « Epidémiologie moléculaire de la multirésistance aux antibiotiques chez *Shigella flexneri* en Afrique et en Asie ». Dans ce cadre les PCR des différents gènes de résistance seront effectués dans les pays où les souches ont été isolées et le CNR testera des souches de Guyane française pour compléter l'étude. De plus le CNR recevra des stagiaires pour réaliser, le sérotypage, le PFGE, et les PCR des gènes de résistance.

- **L'étude de la structure de la population des *S. sonnei* :**

Le CNR continuera sa collaboration avec le Wellcome Trust Sanger Institute à Cambridge en fournissant une centaine d'ADN de *S. sonnei* pour valider l'étude.

- **L'étude des CRISPR chez *Shigella*:**

Le séquençage du premier locus sera effectué pour un maximum de sérotypes de *Shigella*, et la définition de nouvelles amorces pour amplifier le second locus sera réalisée.

- **Le test de technique de typage des souches de *S. sonnei* par MLVA :**

Dans ce cadre le CNR continuera sa collaboration avec le CDC de Taiwan en fournissant une centaine d'ADN de *S. sonnei* pour valider l'étude et en essayant de mettre au point la technique au CNR.

Point 5- Participation aux réseaux de surveillance et d'alerte internationaux et européens

Le CNR-IP participe depuis plusieurs années au réseau européen de surveillance Enter-Net concernant la résistance aux antibiotiques des *Shigella*. Il participe également aux contrôles de qualité externes organisés par le Réseau.

Le CNR-IP participe également en répondant aux demandes d'information émanant de centres ou d'autorités sanitaires des états de l'Union Européenne et des pays de l'espace économique européen.

Point 6- Contribution à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel (augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance..)

Le CNR-IP va poursuivre ses collaborations quotidiennes avec l'InVS

ANNEXES

Annexe 1 :

Fiches d'informations à joindre avec toutes demandes d'analyses.

1)- Fiche à joindre en cas d'envoi de souche :

 INSTITUT PASTEUR		Centre National de Référence des <i>Escherichia coli</i> et <i>Shigella</i> Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes Institut Pasteur - 28, rue du Docteur Roux - 75724 PARIS CEDEX 15 TEL : 01 45 68 87 39 (*) - FAX : 01 45 68 88 37 - e-mail : colishig@pasteur.fr Dr. François-Xavier WEILL - Dr. Ingrid FILLIOL		
Fiche de renseignement devant accompagner chaque envoi (téléchargeable à partir de notre site internet : http://www.pasteur.fr/santé/dre/cadre/cnr/colishig-index.html)				
Laboratoire : (Une seule adresse complète et lisible du laboratoire expéditeur)		Renseignements épidémiologiques ESSENTIELS		
Nom complet : _____		▲ Prélèvement humain		
N° et rue : _____		- Nom, prénom du patient ou Réf. : _____		
Code postal : _____ Ville : _____		Age _____ ou date de naissance _____ Sexe : F/M		
Cachet du laboratoire : _____		Code postal du domicile du patient _____		
E-mail : _____ TEL : _____		Statut : Malade ☐ Porteur ☐ inconnu ☐		
<u>Escherichia coli</u>		- Origine : Sang ☐ Selles ☐ Urines ☐ LCR ☐ Vaginal ☐		
• SOUCHE de <i>E. coli</i> (cocher les cases choisies)		Autre : _____		
☐ Détection de facteurs de virulence chez <i>E. coli</i> ☐ Sérotypie		- Manifestations cliniques : Diarrhée ☐ Diarrhée sanglante ☐ SHU ☐		
Orientation : Entéropathogène ☐ Entérohémorragique (SHU) ☐		Asymptomatique ☐ inconnu ☐ autre : _____		
Entéroinvasif ☐ Agent de diarrhée ☐ Méningite ou portage K1 ☐		- Date d'isolement : _____ et précisions : _____		
Uropathogène ☐ Septicémique ☐ autres : _____		- Cas isolé ☐ Voyage récent (pays, date) : _____		
• SELLE pour <i>E. coli</i> entérohémorragique (Syndrome Hémolytique et Urémique)		- Cas groupés : ☐ Nombre de cas : _____		
☐ examen réalisé après entente préalable **		Hôpital ☐ Familial ☐ Ecole ☐ Crèche ☐ Colonie de vacances ☐		
• SERUM POUR SERODIAGNOSTIC (Syndrome Hémolytique et Urémique)		T.I.A.C. ☐ Autres : _____		
☐ J0 ☐ J +15		- Voyage récent : _____ - Aliment suspecté : _____		
<u>Shigella</u>		Prrière de joindre une copie de l'ANTIBIOGRAMME		
• INFORMATION pour <i>Shigella sonnei</i> seulement ☐		▲ Prélèvement non humain		
(aucune souche envoyée) ONPG ☐ Rhamnose ☐		(facturé, Informations au 01 45 68 87 39)		
• SOUCHE de <i>Shigella</i> , Identification antigénique ☐		- Référence de la souche : _____		
Pour toute demande concernant le suivi des dossiers, nous vous prions de nous contacter : ** par fax (01 45 68 88 37) ou par E-mail (colishig@pasteur.fr). Merci de votre compréhension.		- Date d'isolement : _____		
		- Nature exacte du prélèvement : _____		
		Vétérinaire : _____ Alimentaire : _____ Environnement : _____		
		- Origine géographique du prélèvement (département) : _____		
		Nous vous remercions pour votre collaboration à la surveillance épidémiologique des infections dues aux <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i>		

2)- Fiche à joindre en cas d'envoi de selle ou de sérum :



Centre National de Référence des *Escherichia coli* et *Shigella*

Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Émergentes
Institut Pasteur - 28, rue du Docteur Roux - 75724 PARIS CEDEX 15
TEL : 01 45 68 87 39 - FAX : 01 45 68 88 37 - e-mail : colishig@pasteur.fr
Dr. François-Xavier WEILL – Dr. Ingrid FILLIOL



SURVEILLANCE DES SYNDROMES HEMOLYTIQUES ET UREMiques CHEZ L'ENFANT DE MOINS DE 15 ANS

Fiche à joindre au prélèvement de selles (1) ou de sérums (2)

PRELEVEMENT DE : SELLES (1) ☐ SERUMS (2) ☐ > 200 l
(sang coagulé ET centrifugé et non hémolysé)

Date du prélèvement : / /

Nom : Prénom :

Date de naissance : / /

Sexe : M ☐ F ☐

Renseignements cliniques :

Diarrhée ☐

Date de début : / /

Diarrhée sanglante ou glairo-sanglante ☐

Date de début : / /

Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) ☐

Date de début : / /

Autre ☐ ; préciser : Origine géographique :

Cachet du service où le résultat doit être adressé :

PRELEVEMENTS A ENVOYER A

(1) Pour les selles

Patricia MARIANI
Laboratoire associé au CNR
des *Escherichia coli* et *Shigella*
Service de Microbiologie
Hôpital Robert Debré
48, Bd Serurier
75019 Paris Cedex 19
Tél : (1) 40 03 23 41
Fax : (1) 40 03 20 20
e-mail : patricia.mariani@rdp.ap-hop-paris.fr

(2) Pour les sérums

Ingrid FILLIOL
CNR des *Escherichia coli* et *Shigella*
Unité Biodiversité des bactéries pathogènes émergentes
Institut Pasteur
28, rue du Dr Roux
75724 Paris Cedex 15
Tél : (1) 45 68 83 44
Fax : (1) 45 68 88 37
e-mail : ifilliol@pasteur.fr

Le CNR étant informatisé et n'ayant pas de contact direct avec les patients, nous vous remercions d'informer ceux-ci de leur droit d'accès et de rectification des informations les concernant (Loi N°78-17 du 06 janvier 1978).

Annexe 2 :

Liste des laboratoires expéditeurs et répartition par type d'analyse.

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	<i>Shigella</i>	Info. <i>Shigella</i>	<i>E.coli</i> IP	<i>E.coli</i> RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non <i>E. coli-Shig.</i>	pas de culture
C.H. de Fleyriat	1	BOURG-EN-BRESSE		1								
CH haut Buget/Syndicat Interhospitalier	1	OYONNAX			2	1						
L.A.M. Lalande/Baillat boiste calen	1	BOURG EN BRESSE		2								
L.D.A. de l'Ain-Cenord	1	BOURG EN BRESSE		4								
C.H. de Chateau-Thierry	2	CHATEAU-THIERRY		2		1						
C.H. de Laon	2	LAON		1								
C.H. de Saint-Quentin	2	SAINT-QUENTIN				1		3		1		
C.H. de Moulins	3	MOULINS-YZEURE		3			1			2		
L.A.M. Lapalisse/ Orhant	3	LAPALISSE				1						
L.A.M. Recoules-Andrianony	3	MOULINS		1		5						
L.A.M. Saint-Jacques	3	MONTLUCON		2								
C.H. Dignes les bains	4	DIGNE LES BAINS					2					
L.A.M. de La CCAS	4	MANOSQUE		3								
L.A.M. Montpellier-Lacombe	4	MANOSQUE				1						
L.A.M. Peretti	4	MANOSQUE									1	
CH Des Escartons	5	BRIANCON						1	1			
C.H. d'Antibes-Juan-Les-Pins	6	ANTIBES		1		5	2	1	3	2		
C.H. Lenval	6	NICE		3	1	7						
C.H.U. de l'Archet	6	NICE		2			1	2				
L.A.B.M Mannant-Beyrac	6	BEAUSOLEIL							1		1	
L.A.M. Arnaud Tzanck	6	ST LAURENT DU VAR		1								
L.A.M. Barla/achiardy	6	NICE				2						
L.A.M. Coic-Amrane	6	NICE				1						
L.A.M. March	6	NICE				1						
L.A.M. Pastorello	6	MOUANS-SARTOUX		1		1						
L.A.M. Selarl Anabiol/Chiche	6	MENTON		1		1						
L.A.M. Forestier	7	ANNONAY		1								
C.H.I du Val d'Ariège	9	FOIX			1			1				
L.A.M. De Verbizier-Barrau	9	SAINT-GIRONS		2								
C.H.G. de Troyes	10	TROYES		1								
L.A.M. de la Gare	10	ROMILLY-SUR-SEINE				2						
C.H.G. Antoine Gayraud	11	CARCASSONNE						1				
L.A.M. BIO 11	11	CARCASSONNE		2								
L.A.M. Manton-Marty	11	CASTELNAUDARY		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
C.H.I. du Sud Aveyron	12	SAINT-AFFRIQUE						1				
C.H. de la Timone	13	MARSEILLE	5					11	1			
L.A.M. Alphabio	13	MARSEILLE	6			1						
C.H. Saint-Joseph Fondation	13	MARSEILLE	8			3						
L.A.M. St Marcel	13	MARSEILLE	11					1				
C.H.I. des Armées Laveran	13	MARSEILLE ARMEES	13			1						
C.H. Nord	13	MARSEILLE	15					2				
C.H.G. d'Aix-en-Provence	13	AIX-EN-PROVENCE		7								
C.H. Aubagne	13	AUBAGNE			1	3					1	
C.H. Marseille	13									2		
L.A.M. de Welle	13	VELAUX		1		1						
L.A.M. Pico-Maille	13	ROGNAC				2						
LABM Querel-plumelle / CBM	13	SALON DE PROVENCE		1								
LABM VITROLY - MASIUS	13	ARLES						1				
SELARL Monat-Goffart	13	MIRAMAS				3					1	
C.H. G. Robert Bisson	14	LISIEUX				1		1				
C.H.R.U. de Caen/ cote de nacre	14	CAEN			1	1		7	3	2		
L.A.M. Beaulieu	14	CAEN		1								
L.A.M. des Carmes	14	CAEN		1								
L.A.M. Lexobio/Sébé-Visseaux	14	LISIEUX		3								
C.H. Lisieux	14	LISIEUX								1		
Laboratoire Départemental et Régional	14	CAEN				3						
PAS ADRESSE	14	CAEN						1				
SELARL Databio	14	DEAUVILLE				12						
C.H.G. Henri-Mondor	15	AURILLAC		1								
L.A.M. Charbonnier-Rougery-Roche...	15	AURILLAC				1						
C.H. d'Angouleme	16	SAINT MICHEL					1	1		1		
L.A.M. C.J. BIO	16	CHATEAUBERNARD				4						
L.A.M. C.J. BIO	16	COGNAC				10						
L.A.M. C.J. BIO	16	JARNAC				2						
L.A.M. de lunesse/LABIO 16	16	ISLE DESPAGNAC		1								
L.A.M. du chateau /LABIO 16	16	ANGOULEME		1		1						
CHG JONZAC	17	JONZAC						1				
L.A.M. Boyer	17	JONZAC		1								
L.A.M. Desprez	17	SURGERES				1						
L.A.M. du Champ de Mars	17	LA ROCHELLE				4						
C.H. de Vierzon	18	VIERZON				1						
C.H. de Brive	19	BRIVE-LA-GAILLARDE		1								
LABM Chanut	19	UZERCHE						1				
C.H.G. Bastia	20	BASTIA		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Ospédale	20	PORTO-VECCHIO						1				
C.H.R.U. du Bocage	21	DIJON		4		1						
L.A.M. Analabo	21	DIJON		1								
L.A.M. Breuillot	21	BEAUNE		1								
L.A.M. Morfaux-Lutchmaya	21	TALANT				1					1	
C.H. de Guingamp	22	GUINGAMP				1						
C.H. de Lannion/ Pierre Le Damany	22	LANNION		3								
C.H. "Yves Le Foll"	22	SAINT-BRIEUC						8				
L.A.M. Chauvin-Goelab	22	ETABLES-SUR-MER		1		3						
L.A.M. Morvan-Mascart	22	PAIMPOL				1						
L.A.M. Tréguier-Lemoine	22	LANNION									1	
L.A.M. Tréguier-Parent	22	PERROS-GUIREC				1						
L.A.M. Biomarché/Ménard	23	LA SOUTERRAINE				1						
C.H. de Périgueux	24	PERIGUEUX		1								
C.H. Belfort-Montbeliard (André-Boulloche)	25	MONTBELIARD		1	1							
CHU jean minoz	25	BESANCON				1		2		1		1
L.A.M. de Montjoux/Saint-Claude	25	BESANCON		1		1						
L.A.M. Gambetta/Aymard-Herbez	25	BESANCON		1								
C.H. de Montélimar	26	MONTELMAR		1	3							
C.H. de Valence	26	VALENCE						1		1		
L.A.M. Bourg	26	MONTELMAR		2								
L.A.M. Unibio (Peyle-raguin)	26	ROMANS SUR ISERE		2								
LBM Mathieu- Arnuti	26	CREST			1							
C.H.G. Saint-Louis	27	EVREUX				1		1				
C.H.i eure et seine/ Saint-Louis	27	EVREUX		1	2							
L.A.M. Le Gall-Praet-Palau	27	BERNAY				1						
Centre de Biologie Médicale	28	CHARTRES		1								
H L. Pasteur	28	CHARTRES			2							
L.A.M. Chauvin	28	EPERNON		2								
L.A.M. Girard	28	LUISANT		5		1						
L.A.M. Laumonier	28	AUNEAU		1								
C.H.G. de Morlaix	29	MORLAIX		1					1			
C.H.U. de brest	29	BREST							1	6		
L.A.M. Brinquin	29	BREST				1						
L.A.M. Gaudron	29	CARHAIX-PLOUGUER		1								
L.A.M. Monard	29	BREST		1								
L.A.M. Verdier	29	BREST		1								
Selarl Gama /sucini de luca fousnant	29	FOUESNANT		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
Selarl Gama/ L.A.M. Barbot-Witté-Delhostal	29	ROSPORDEN		1								
C.H.G. Louis Pasteur	30	BAGNOLS-SUR-CEZE				4						
C.H.U. Nîmes	30	NIMES					1					
L.A.M. Bonidan-Vivinie	30	ALES				1						
L.A.M. Hoyet-Zaranis	30	NIMES				1					1	
L.A.M. Pages/ crampette	30	SAINT-HIPPOLYTE DU FORT				1					1	
L.A.M. Unibio/Achard-Monneret-Schlup	30	NIMES		2								
C.H.U. de Toulouse /hotel dieu-st jaques	31	TOULOUSE						1				
C.H.U. de Toulouse Institut federatif de biologie/C.H.U. Purpan	31	TOULOUSE		3	1	1		2				
CEDIBIO	31	TOULOUSE			2							
L.A.M. Astié	31	SAINT-ALBAN		2		3						
L.A.M. BIO 4 grenade	31	GRENADE-SUR-GARONNE		1								
L.A.M. Chastaing	31	VILLEFRANCHE-DE-LAURAGAIS		4								
L.A.M. Larrard	31	SAINT-GAUDENS		1		1						
L.A.M. SNCF / Toulouse Raynal	31	TOULOUSE		1								
L.A.M. st jean /roudier pietri gandois	31	SAINT-JEAN				1						
Selarl mulet- pechmeja /L.A.M. Mulet	31	SAINT-JEAN		2								
Selarl mulet- pechmeja /L.A.M. Pechmeja	31	L'UNION		1								
L Froment Fernandez, clos manescau	32	AUCH			2							
C.H.G. Robert-Boulin	33	LIBOURNE		1		2		1	1			
CEEB Hôpital Pellegrin	33	BORDEAUX		4				14		5		
L.A.M. Bats-Subra	33	FLOIRAC		1								
L.A.M. Lacaze	33	ANDERNOS LES BAINS						1				
L.A.M. Pouget-Rechenmann	33	BORDEAUX		1								
L.A.M. Roussille-Erny	33	COUTRAS		1								
L.A.M. Selarl La Bonnaly	33	CAVIGNAC				2						
L.A.M. Taupin	33	BORDEAUX		1								
LABM Beau Bouchareinc	33	LATRESNE			1							
Selarl Biocean 33	33	LESPARRE				1						
C.H. de Sète	34	SETE		1								
C.H.U. Arnaud de Villeneuve	34	MONTPELLIER		3		2		9				
L.A.M. Bressy-Blachon	34	PEZENAS				1						
L.A.M. C.Gilles	34	MARSILLARGUES				1						
L.A.M. Casteran	34	MAGALAS		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
LABM des Facultés	34	MONTPELLIER						1				
LABM Lagarde - marie-Balbi	34	PEROLS		1				1				
LABM PORTAL	34	JUVIGNAC						1				
C.H.R. Sud Anne de Bretagne	35	RENNES						14				
C.H.R.U. Pontchaillou	35	RENNES						2				
L.A.M. Decraene	35	PACE				1					1	
L.A.M. des Olympiades	35	RENNES		1								
L.A.M. Godin	35	BETTON		1								
L.A.M. Legarrec-Lepesant-Rochard	35	VITRE		1		5						
L.A.M. Lys	35	RENNES						1				
L.A.M. st laurent /Delanoë-Mesnard-Combeau	35	RENNES		1		5						
L.A.M. George Sand	36	LA CHATRE		1								
SELARL Camenen-Jamet	36	CHATEAUROUX			2							
C.H.R. Gatien-de-Clocheville	37	TOURS						2		3		
C.H.R.U. Trousseau	37	TOURS		1								
C.H.U. Bretonneau	37	TOURS						1	1	2		
L.A.M. Poireau	37	SAINTE-MAURE-DE-TOURNAINE				1						
L.A.M. Roger	37	CHAMBRAY-LES-TOURS		1								
C.H.G. Lucien Hussel-Dr. Fèvre	38	VIENNE		1								
C.H.R.U. de Grenoble	38	GRENOBLE		3	5	4		3	1		1	
CH VOIRON	38	VOIRON			1							
L.A.M. du Drac/Revol	38	LE PONT-DE-CLAY				1						
Laboratoire Vétérinaire	38	GRENOBLE				1						
Centre de Biologie médicale/Mathieu	39	LONS-LE-SAUNIER		1								
C.H.G. de Dax	40	DAX		1	1							
C.H.G. Layne	40	MONT-DE-MARSAN						1	1			
L.A.M. Claude de France	41	ROMORANTIN				1	1					
L.A.M. De La Salamandre/maunoury	41	BLOIS		1								
Polyclinique de Blois	41	LA CHAUSSEE ST VICTOR				1						
C.H.G. de Roanne	42	ROANNE		2								
C.H.U. Nord-St Etienne	42	SAINT-ETIENNE		4		1		3				
L.A.M. du Parc /antoine	42	ST PRIEST EN JAREZ		1								
L.A.M. Seneterre et Associés	42	SAINT-CHAMOND				2						
CH E. Roux	43	LE PUY EN VELAY			1							
L.A.M. Rigaud-Gravier	43	LE PUY-EN-VELAY		1								
C.H.G. de Saint-Nazaire	44	SAINT-NAZAIRE		1	1		2	2		1		
C.H.U. de Nantes/ Hotel dieu	44	NANTES		12				18		13		
L.A.M. Attiogbe-Hue-Seon	44	BOUGUENAIS		2								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Biolam/Lièvre	44	SAINT-NAZAIRE		1	1							
L.A.M. d'Ancenis/Selarl Isosel	44	ANCENIS		3								
L.A.M. Grandjean/Brousse	44	LE LOROUX-BOTTEREAU				4						
L.A.M. Roche	44	PORNICHET		2								
L.A.M. Tharreau-Caudal	44	REZE		1	1	2						
C.H. de l'Agglomération Montargoise	45	AMILLY		1								
C.H.G. de Pithiviers	45	PITHIVIERS				4						
C.H.R. d'Orléans - Hôpital de la Source	45	ORLEANS		7								
L.A.M. de la source/Desson	45	ORLEANS LA SOURCE		2								
L.A.M. Graveron-David	45	FLEURY-LES-AUBRAIS		1								
SELARL E. Petat	45	BELLEGARDE			1	1						
C.H. de Cahors	46	CAHORS		1								
C.H. de Saint-Cyr	47	VILLENEUVE-SUR-LOT		1	1							
C.H.I. Marmande-Tonneins	47	MARMANDE		3								
L.A.M. Ferret-Astruc	48	MARJEVOLS				1						
C.H.U. d'Angers	49	ANGERS		3	2			5	1	1	1	
L.A.M. du Parc	49	CHOLET				1						
L.A.M. Tharreau	49	SEGRE		1								
LCAT d'Angers	49	LES PONTS DE CÉ									3	
CH Public du Cotentin-louis Pasteur	50	CHERBOURG		1				1				
C.H. Saint Lo, France-usa	50	SAINT LO					1			1		
L.A.M. Chambrin-Textier	50	VALOGNES		1		1						
L.A.M. Mouchel	50	TOURLAVILLE		2								
L.A.M. Texier-Langlois	50	OCTEVILLE		1		1						
SELARL Biocentre manche	50	SAINT LO			3	1						
C.H.G. Auban-Moët	51	EPERNAY		1								
C.H.U. de Reims-H maison blanche	51	REIMS						1				
C.H.U. Robert Debré	51	REIMS		4		2		9				
CH Chalons en Champagne	51	CHALONS EN CHAMPAGNE			1							
L.A.M. Gillard	51	REIMS		5	2							
L.A.M. Leulier	51	REIMS		1								
L.A.M. Roualet	51	REIMS									1	
C.H. de Langres	52	LANGRES		2								
L.A.M. Bio Santé	52	SAINT-GEOSMES		1								
CH Laval	53	LAVAL			2	4						
L.A.M. Biolaris	53	LAVAL		1		3						
C.H.U. de Nancy-H central	54	NANCY			1		1	11		1		
C.H. Longwy	54	LONGWY					1					
L.A.M. Aubert	54	SAINT-MAX				1						

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
C.H. du Centre Bretagne	56	PONTIVY		1				1		1		
C.H.Bretagne Sud de Lorient	56	LORIENT		1				2				
L.A.M. Blanc-Galiby	56	HENNEBONT		1								
C.H. Sainte-Barbe	57	FORBACH		1								
C.H.R. de Metz-Thionville	57	METZ		1	1	2						
L.A.M. De La Tannerie	57	ST JULIEN LES METZ				1						
L.A.M. du Saulnois	57	DIEUZE		1								
L.A.M. Pax	57	METZ				1						
C.H. de Nevers Pierre Beregovoy/Fédération des LAM	58	NEVERS			2			1				
L.A.M. Ferrand	58	NEVERS		2								
L.A.M. Guerin-Levy & Associés	58	NEVERS		1								
C.H. d'Armentières	59	ARMENTIERES		2								
C.H. de Valenciennes	59	VALENCIENNES				1			1			
C.H. Gustave Dron	59	TOURCOING		4	6							
C.H. Saint-Philibert	59	LOMME		2	3			2				
C.H. Saint-Vincent de Paul	59	LILLE						2				
C.H.R. Huriez	59	LILLE						1				
C.H.R.U. Albert Calmette	59	LILLE		1	2			8				
C.H.R.U. Jeanne Flandre	59	LILLE						10				
CH Sambre Avesnois	59	MAUBEUGE			1							
Institut Pasteur de Lille	59	LILLE				2		23				
L.A.M. Biocentre	59	TOURCOING		4	1							
L.A.M. Biolille	59	LILLE						2				
L.A.M. Coisne-Gabert	59	LA MADELEINE		1								
L.A.M. Lavieville-Coppé-De Bisschop/Selarl Biopath	59	GRAVELINES				17					1	
L.A.M. Porte	59	HAZEBROUCK				1						
LABM KUPERWASER-HACOT	59	ARMENTIERES						1				
Selafa Biofrance /martin, degaey, Cavrois	59	MAUBEUGE		1		1						
C.H. Creil	60	CREIL				4		4				
C.H. de Senlis	60	SENLIS		4								
C.H.G. de Compiègne	60	COMPIEGNE						1				
CH Beauvais	60	BEAUVAIS			1							
L.A.M. Ferrandier-Cazeaud	60	BEAUVAIS		4								
L.A.M. Heurté-Mesnard	60	BEAUVAIS		2								
L.A.M. Mbaloula-Modeste	60	LIANCOURT		1								
L.A.M. Peyssies-Martin	60	MERU				1						
L.A.M. Preux-Elaerts	60	NOYON				1						
C.H.G. Jacques Monod	61	FLERS		1								
C.H.I.C. d'Alençon-Mamers	61	ALENCON		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Moulin-Huart	61	L'AIGLE		2								
C.H. Bethune-beuvry/Germon-Gauthier	62	BETHUNE						3				
C.H. Duchene	62	BOULOGNE-SUR-MER				1						
C.H. Région Saint-Omer/Gernez-Rieux	62	SAINT-OMER				1						
L.A.M. Allard	62	SAINT-POL-SUR-TERNOISE		1								
L.A.M. De Bisschop	62	BAPAUME		1								
C.H. Lievin	62	LIEVIN					2			2		
LABM -Polyclinique de Riaumont	62	LIEVIN					2			2		
C.H.U. Gabriel Montpied	63	CLERMONT-FERRAND		1		3		5				
CH Guy Thomas	63	RIOM			1							
L.A.M. Chapy-Valleix	63	BEAUMONT						1			1	
SELARL Biolam	63	CHAMALIERES				1						
C.H. de la Côte Basque	64	BAYONNE						1				
C.H.G. de Pau	64	PAU		1		1						2
L.A.M. Couture-Reutin	64	MORLAAS		1								
L.A.M. De La Plaine	64	NAY					1	1				
L.A.M. Fenot-Marsaud	64	HENDAYE				1						
Laboratoire Duco-Trousson/actubio	64	PAU						1				
LABM Alpha Bio	65	LOURDES								1		
C.H.G. st jean /Maréchal-Joffre	66	PERPIGNAN		3				1				
L.A.M. du Biopole 66/tournemire schlouch marnet	66	CABESTANY		1								
L.A.M. Juan	66	TOULOUGES				2						
L.A.M. Mouliade-Pasquie	66	CANET-PLAGE				2						
Biosphère/L.A.M. Schuh-Ebla	67	STRASBOURG		4					1			1
C.H. Sainte-Catherine	67	SAVERNE		1								
C.H.U. de Strasbourg	67	STRASBOURG			5			1				
CH Haguenau	67	HAGUENAU			2							
Faculté de Médecine	67	STRASBOURG		8								
L.A.M. de la Redoute	67	HAGUENAU		1								
L.A.M. Sainte-Barbe/Sel Biocentra	67	SELESTAT		1		1						
L.A.M. Trens	67	STRASBOURG		2								
C.H. Emile Muller-Moenchsberg	68	MULHOUSE		1								
L.A.M. Lenys-Eimer	68	COLMAR		1		4						
L.A.M. Monnier	68	CERNAY				3						
L.A.M. Pasteur Zup	68	COLMAR				1						
L.A.M. Unterlinden	68	COLMAR				4						
C.H. Edouard Herriot	69	LYON	3		3			8	1			
C.H.Instruction Armées Desgenettes	69	LYON	3	1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
C.H. La Croix Rousse	69	LYON	4	2								
L.A.M. Croix-Rousse	69	LYON	4	2								
C.H. Debrousse	69	LYON	5	2	1							
Laboratoire Marcel Mérieux	69	LYON	7	31	16	7		2		4		
Groupe Hospitalier Est /bld pinel	69	BRON		4	2							
L.A.M. Cornet-Dumont	69	MORNANT		2	1	2						
L.A.M. Didier	69	VILLEURBANNE									1	
C.H. des Chanaux	71	MACON		3								
C.H. Jean-Bouveri	71	MONTCEAU-LES-MINES				3						
L.A.M. Boucicaud	71	CHALON SUR SAONE		2								
L.A.M. Centre Labo	71	CHALON-SUR-SAONE		1								
C.H. du Mans	72	LE MANS		1				1				
L.A.M. Biomaine/Selca	72	LE MANS		6		12						
L.A.M. Le Cronier	72	LA FERTE-BERNARD				1						
L.A.M. Le Moing-Bondu	72	ALLONNES		2		4					1	
C.H. d'Aix-les-Bains	73	AIX-LES-BAINS		2								
C.H. de Chambéry	73	CHAMBERY		1		1		1				
L.A.M. Bravais	73	LA MOTTE-SERVOLEX		3		1						
L.A.M. de Cognin/Monteil	73	COGNIN		3		1						
C.H. d'Annecy	74	ANNECY		4			1					
C.H. du Léman	74	THONON-LES-BAINS		2								
C.H.G. de Sallanches	74	SALLANCHES		2								
C.H.I. d'Annemasse-Bonneville/ambilly	74	ANNEMASSE		1	2	3						
C.H.I. Sud-Leman-Valserine	74	SAINT-JULIEN-EN-GENEVOIS				1						
L.A.M. Bore-Guillin	74	THONON-LES-BAINS				4						
L.A.M. Louveau	74	CLUSES		1		1						
L.A.M. Michel	74	CHAMONIX		1								
L.A.M. du C.M.E.T.E	75	PARIS	1	4								
L.A.M. de la C.P.A.M.	75	PARIS	2	1								
L.A.M. Richelieu	75	PARIS	2	3								
L.A.M. Saint-Paul/ kerdelhue	75	PARIS	4			1						
LABO C.Bernard	75	PARIS	5				1			1		
L.A.M. de la Clinique de l'Alma/ Kimmel	75	PARIS	7			1						
L.A.M. Gendrault-Mancy-Tallobre	75	PARIS	7			1						
L.A.M. C.o.s.e.m	75	PARIS	8	1	1							
C.H. Lariboisière/ bld de la chapelle	75	PARIS	10	2				1				
L.A.M Noet SELARL	75	PARIS	10		1	6					1	
L.A.M. Benassaya	75	PARIS	10	2		2						

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Guirao-Devilaine	75	PARIS	10	1								
L.A.M. S.N.C.F. paris idf /Nord-Est	75	PARIS	10			1						
Centre de Biologie du Chemin Vert	75	PARIS	11	1	1							
L.A.B.M. Philippe Auguste/Nataf	75	PARIS	11		1	1		1				
C.H. d'Enfants Armand Trousseau	75	PARIS	12		1		3	6		3		
C.H. Saint-Antoine	75	PARIS	12	1	1			2		2		
C.H. Pitié-Salpêtrière	75	PARIS	13	12	2					3		
Centre Biologique Tolbiac /selarl bio famm	75	PARIS	13	3		4						
L.A.M. Creplet/Italie 2	75	PARIS	13								1	
L.A.M. Olympiades/Jaquot-Denis	75	PARIS	13	2								
AP-HP COCHIN /PORT ROYAL, st vincent de paul	75	PARIS	14				2			5		
C.H. Fondation Saint-Joseph	75	PARIS	14	1	1							
C.H. Notre Dame de Bon Secours	75	PARIS	14	1			1				1	
L.A.M. BIODÉ Denfert Rochereau	75	PARIS	14	3								
L.A.M. Jouve	75	PARIS	14			1						
C.H. Européen Georges Pompidou	75	PARIS	15			1				2		
C.H. Necker - Enfants Malades	75	PARIS	15	1		4	1	13		10		
Institut Pasteur	75	PARIS	15	12		2						
L.A.M. Berel /Bernard	75	PARIS	15	1								
L.A.M. de la Croix Nivert	75	PARIS	15								1	
L.A.M. Félix Faure-Lourmel	75	PARIS	15	1								
L.A.M. Maublanc	75	PARIS	15	2		1						
L.A.M. Vaugirard/Lokiec-Zérah	75	PARIS	15	5								
L.A.M. FL bio Passy-Nicolo	75	PARIS	16	1								
L.A.M. Lavergne-victor hugo-Dr zerat	75	PARIS	16	1								
L.A.M. Spontini-Georges-Mandel/Cohen	75	PARIS	16					1				
L.A.M. berthellier/Timsit	75	PARIS	17	3								
L.A.M. du Parc Monceau	75	PARIS	17	1								
L.A.M. Risse-Verseau	75	PARIS	17					1				
LABM SELAFA BIOCP/Prony	75	PARIS	17					1				
AP-HP BICHAT, claud bernard	75	PARIS	18				2			1		
L.A.M. Samana /Max Dormoy/LCD	75	PARIS	18	1								
L.A.M. Vauvenargues	75	PARIS	18	2								
C.H. Robert Debré	75	PARIS	19	15	11		12	17		31		

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
CMS Enfance et Famille/L.A.M. Guyot-Lequitte	75	PARIS	19	2		1						
L.A.M. AJ bio Crimée-Curial	75	PARIS	19	2								
L.A.M. Bio Horizon	75	PARIS	19	7								
L.A.M. Naccache	75	PARIS	19	1								
L.A.M. Selarl-BPA/Dosbaa	75	PARIS	19	2		1						
selarl Cazalet-Gilardone	75	PARIS	19	4								
C.H. Tenon	75	PARIS	20	4	1		1	1	1	1		
L.A.M. Gambetta	75	PARIS	20	2								
L.A.M. Nation	75	PARIS	20	2		3						
C.H.G. de Dieppe	76	DIEPPE				2						
C.H.G. Jacques Monod du Havre/ montvilliers	76	LE HAVRE		1				6				
C.H.I. Elbeuf/Louvier/Val-de-Reuil	76	SAINT AUBIN LES ELBEUF		1								
C.H.U. Charles-Nicolle	76	ROUEN		2	1	2	1	10	1			
C.H. du Havre	76	LE HAVRE					1			3		
C.H. J Monod	76	MONTIVILLIERS								2		
L.A.M. Dhalluin	76	GRAND-COURONNE									1	
L.A.M. Le Portal	76	PAVILLY		1								
L.A.M. Lemercier-Salomon-Volle	76	MONTVILLE				2						
L.A.M. Mathilde	76	ROUEN										1
L.A.M. Selarl Leroy & Dircks Dilly	76	BOLBEC				2						
LAM d'harfleur	76	HARFLEUR			1							
LBM Pepin Leluan Sannier Guillo	76	FÉCAMP			1							
C.H. de Nemours	77	NEMOURS		1								
C.H. Marc-Jacquet	77	MELUN		1								
C.H.G. de Lagny/Marne la Vallée	77	LAGNY-SUR-MARNE		2	1							
C.H.G. de Meaux	77	MEAUX		1								
C.H.G. Fontainebleau	77	FONTAINEBLEAU		1				1				
CH Montereau	77	MONTREAU			2							
L BIO VSM	77	VAIRES SUR MARNE			2							
L.A.M. Bio VSM/ weber	77	VAIRESMARNE		1								
L.A.M. Bonhoure	77	NEMOURS		1								
L.A.M. Bouriot	77	SAVIGNY-LE-TEMPLE				1						
L.A.M. Damonville	77	MELUN		1		3					2	
L.A.M. de Fontenay-Trésigny	77	FONTENAY-TRESIGNY		1								
L.A.M. du Centre/Nozach	77	SAINT-GERMAIN-SUR-MORIN		1								
L.A.M. Lantenois	77	LA FERTE-GAUCHER		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Saal	77	CHELLES				1						
L.A.M. Zanderman	77	OZOIR-LA-FERRIERRE				1						
Laboratoire du Centre	77	COULOMMIERS									1	
C.H. de Rambouillet	78	RAMBOUILLET		1		1			1			
C.H. François Quesnay	78	MANTES-LA-JOLIE		2	3							
C.H.G. André Mignot de Versailles	78	LE CHESNAY		1	4							
C.H.G. de Meulan	78	MEULAN		1								
C.H.I. de Poissy	78	POISSY		1		1		1		1		
CHI St Germain en Laye	78	SAINT GERMAIN EN LAYE			2							
L des pyramides	78	MAUREPAS			2							
L.A.M. Chantiers Franciscaines/Delage-Leonard	78	VERSAILLES		5		5						
L.A.M. "La Caravelle"	78	LA CELLE-SAINT-CLOUD		2		8						
L.A.M. Alpha	78	VERSAILLES		2								
L.A.M. Aurensan	78	SAINT-CYR-LECOLE		1								
L.A.M. Carnot	78	HOUILLES		2							1	
L.A.M. Faure-Nalpas Selarl	78	VERNOUILLET		1		1						
L.A.M. Gillette-Dumont	78	LE PORT-MARLY				1						
L.A.M. Guittet-Courdesses	78	TRAPPES		2		1						
L.A.M. Guyancourt/Morgado	78	GUYANCOURT				2					1	
L.A.M. Le Manach Selarl	78	MAGNY-LES-HAMEAUX		2								
L.A.M. Lucas	78	SARTROUVILLE		1		1						
L.A.M. Marie-Thérèse/Lalanne	78	SAINT-GERMAIN-EN-LAYE		1								
L.A.M. Mathonnet	78	NOISY LE ROI				2			3		1	
L.A.M. Moisset	78	NEAUPHLE-LE-CHATEAU				1						
L.A.M. Poissy Centre/Chabin	78	POISSY		2								
L.A.M. Poulet	78	POISSY		1								
LAM Mlynarz	78	ACHERES			1							
C.H. de Niort	79	NIORT				1	1	2	1			
L.A.M. Bottos-Michaud-Lelong	79	NIORT		1								
L.A.M. Jamet-Laborde	79	THOUARS				1						
L.A.M. Naulleau-Baillargeau-Fleury	79	PARTHENAY		1								
C.H. d'Abbeville	80	ABBEVILLE		1								
C.H.R.U. Nord	80	AMIENS			2	1		4				
C.H.U. Amiens	80	AMIENS								6		
L.A.M. Drelon	80	AMIENS				1						
L.A.M. Stal	80	ALBERT		1								
Laboratoire Regional de biologie medicale	80	ABBEVILLE		1								

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
C.H.G. d'Albi	81	ALBI		1								
C.H.G. de Castres	81	CASTRES		1								
L.A.M. Selarl Caramel	81	ALBI				1						
LABM Seguret-Ouradou	81	ALBI					1					
LAM oden souquet/BIOLAB 81	81	GAILLAC		1								
L.A.M. Henryon-Lecat	82	MOISSAC		3								
L.A.M. Bioconvergence	83	LELUC-EN-PROVENCE				1						
L.A.M. des Lices	83	SAINT-TROPEZ		1								
L.A.M. jayez-beta /Les Muriers	83	LA VALETTE DU VAR		2								
C.H. Henri Duffaut	84	AVIGNON				3						
L Valentin	84	CARPENTRAS			1							
L.A.M. Del Puech	84	SORGUES				2						
L.A.M. Marasca	84	CAVAILLON									1	
L.A.M. Martin-Pétris	84	BOLLENE				1						
C.H.D. de la Vendée	85	LA ROCHE-SUR-YON		2	1							
L.A.M. Baudel	85	AIZENAY				1						
L.A.M. Bonnaudet-Saïdi	85	LA ROCHE-SUR-YON		1								
L.A.M. Bonnici-Pouget	85	MONTAIGU		1		7						
L.A.M. Colas-Vergnot	85	SAINT-GILLES-CROIX-DE-VIE		1		1						
L.A.M. Grimaud-Benard	85	LES HERBIERS				1						
L.A.M. Le Reste	85	LES SABLES-DOLONNE		1		2						
L.A.M. Les Salines/Marche et Associés	85	LES SABLES-DOLONNE		2								1
L.A.M. Touzeau	85	MOUTIERS-LES-MAUXFAITS				1						
C.H. de Châtellerault	86	CHATELLERAULT		1								
C.H.U. de Poitiers /H de la miletrie/ RCP	86	POITIERS		1		1		3				
L.A.M. Blanchon-Lhomme	86	POITIERS				2						
L.A.M. Fame /Ries Grejon	86	JAUNAY-CLAN		1								
L.A.M. Payard-Grau	86	POITIERS		1								
LABM AIMON MEIRE-OPSOMER	86	CHATELLERAULT			1							
LABM du Parc	86	POITIERS				2		1				
LABM BLANCHON - LHOMME	86	POITIERS								1		
C.H.R.U. Dupuytren	87	LIMOGES		4	2	1	3	4		2		
C.H.G. "Champ-le-Roi"	88	NEUFCHATEAU		2		1						
C.H.G. de Remiremont	88	REMIREMONT		1								
L.A.M. du Parc/Gaultier	88	VITTEL				12					1	
C.H. d'Auxerre	89	AUXERRE		7		3						
C.H. de Sens/ Gaston Ramon	89	SENS		1		1		1				
C.H.G. de Belfort montbeliard	90	BELFORT		1	2							

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
BS BIO SELARL	91	EVRY			1							
C.H. d'Orsay	91	ORSAY				1						
C.H. Louise Michel/Sud Francilien	91	EVRY		2	1			1		1		
C.H.G. d'Arpajon	91	ARPAJON		1								
C.H.G. de Longjumeau	91	LONGJUMEAU				1						
L.A.M Jacques Cartier	91	MASSY		1								
L.A.M. Agora	91	EVRY		1								
L.A.M. Arrang	91	DOURDAN		1								
L.A.M. Ayache	91	MONTGERON		5		3						
L.A.M. De Sousa	91	VIRY-CHATILLON									1	
L.A.M. Delaitre-Guillemot	91	LES ULIS		2		1						
L.A.M. des Godeaux	91	YERRES				1						
L.A.M. D'Orsay Gare/devillayer/(SELARL BIOCAPS)	91	ORSAY		1		1						
L.A.M. du val d'Yerres	91	YERRES			1							
L.A.M. Hernandez-Morin	91	LONGJUMEAU		1								
L.A.M. Leroy/ leroi-Bérard (SELARL)	91	ARPAJON		1								
L.A.M. Sasson	91	BRUNOY		1								
LABM Claude Galien	91	QUINCY SOUS SENART						1				
SELARL Dosdat	91	MONTLHERY			1							
C.H. Ambroise Paré	92	BOULOGNE-BILLANCOURT		2		5				1		
C.H. Américain	92	NEUILLY-SUR-SEINE		1	4							
C.H. Antoine Béclère	92	CLAMART		4	3							
C.H. Beaujon	92	CLICHY		1								
C.H. Jean Rostang/ Chaville	92	SEVRES		1								
C.H. Notre Dame du Perpétuel Secours	92	LEVALLOIS-PERRET		1								
C.H. Raymond Poincaré	92	GARCHES		1				1		1		
Centre Municipal de Santé	92	MALAKOFF		1								
H Louis-Mourier	92	COLOMBES			2							
HOPITAL FOCH	92	SURESNES					1	1		4		
L.A.M. Aboulker	92	NEUILLY-SUR-SEINE						1				
L.A.M. Benoit-Naline	92	SAINT-CLOUD				1						
L.A.M. Beria /SEL BIO paris OUEST	92	PUTEAUX		1		2					1	
L.A.M. Cramier	92	BAGNEUX		2								
L.A.M. decoudun /Foch	92	SEVRES				1						
L.A.M. Delord	92	SEVRES				1						
L.A.M. Destrée/Selarl Bio	92	ISSY-LES-MOULINEAUX		1								
L.A.M. Dieudonné	92	ANTONY		1								
L.A.M. du Bois de Verrières	92	ANTONY		4				1	1			

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. du Plessis	92	LE PLESSIS-ROBINSON		2		1						1
L.A.M. Fiévez/Selarl Bio	92	FONTENAY-AUX-ROSES		1								
L.A.M. FOCH	92	GARCHES		1							1	
L.A.M. joli mai/Cuisinier	92	MEUDON-LA-FORET		1								
L.A.M. Maison Blanche	92	CHATILLON		2								
L.A.M. Plaisance	92	ASNIERES		1								
L.A.M. Royer	92	VILLENEUVE-LA-GARENNE				1						
L.A.M. Sandré	92	CLICHY		4		1						
L.A.M. Sel Bio Paris Ouest	92	LA GARENNE-COLOMBES				2						
L.A.M. SEL RUEIL	92	RUEIL-MALMAISON				5						
L.A.M. Soulard-Papot	92	PUTEAUX		2								
L.A.M. Widmer	92	COLOMBES				2						
LABM Angotti- Jalladeau	92	BOULOGNE			1							
LABM Benoit	92	CHATENAY MALABRY			1							
C.H. de Saint-Denis	93	SAINT-DENIS		12		1						
C.H. Jean Verdier	93	BONDY		10	4					1		
C.H.G. Robert Ballanger	93	AULNAY-SOUS-BOIS		7	3							
C.H.I. André Grégoire	93	MONTREUIL-SOUS-BOIS		2					1			
L.A.M. Amgar-Calonne	93	ROMAINVILLE		4								
L.A.M. Clément	93	LE BLANC-MESNIL		1								
L.A.M. des Franciliens /andiva bounhiol	93	AULNAY-SOUS-BOIS		3		1						
L.A.M. Diai	93	SEVRAN		1								
L.A.M. Duchenne-Guilngar	93	LES PAVILLONS SOUS BOIS				1						
L.A.M. Flammang	93	NEUILLY-PLAISANCE		1								
L.A.M. Gallieni	93	ROSNY-SOUS-BOIS		6								
L.A.M. Journo-Boadas	93	LES LILAS		7	1							
L.A.M. Zerah-Taar-Pfeffer	93	BAGNOLET		1								
LABM Bio horizon	94	BRY SUR MARNE								1		
C.H. Paul Brousse	94	VILLEJUIF		3		2						
C.H.I. de Créteil	94	CRETEIL		1				1				
C.H.I. de Villeneuve-Saint-Georges	94	VILLENEUVE-SAINT-GEORGES		3	1	1						
H de Bicêtre	94	LE KREMELIN BICETRE			1					2		
L.A.M. St maurice Prabouine	94	SAINT-AURICE		1								
L.A.M. Azaïs	94	CHAMPIGNY-SUR-MARNE		1								
L.A.M. Beauhaire-Bienvenu	94	SAINT-MANDE		16								
L.A.M. Biopath	94	CHARENTON-LE-PONT		1		2						

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	Shigella	Info. Shigella	E.coli IP	E.coli RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non E. coli-Shigella	pas de culture
L.A.M. Clavel	94	NOGENT-SUR-MARNE		2								
L.A.M. de la Mairie/ kirren	94	VINCENNES		2								
L.A.M. Déchy-Zaccarini	94	MAISONS-ALFORT		2								
L.A.M. du Tremblay	94	CHAMPIGNY-SUR-MARNE		1								
L.A.M. Farjon	94	CRETEIL		1								
L.A.M. Hershkovitch/ biopath le plessis	94	LE PLESSIS-TREVERSE		1								
L.A.M. Hurtel-Cohen-Zaccarini-van de loo-mesguich-mesquieu	94	CHARENTON-LE-PONT		12		1						
L.A.M. Le Magnen/saget	94	FRESNES		1								
L.A.M. Stordeur-(Kirren)	94	VINCENNES		2								
L.A.M. Teboul	94	SUCY-EN-BRIE				2						
L.A.M. Vanheste-Bauduret	94	SAINT-MAUR-DES-FOSSES		2								
L.A.M. Vigier-Chaléon/Biopath bercy	94	CHARENTON-LE-PONT		1								
Laboratoire LCL	94	IVRY SUR SEINE						1				
SELARL BIO HORIZON	94	BRY-SUR-MARNE		1		1		1				
C.H. de Beaumont/jaques fritschi	95	BEAUMONT-SUR-OISE		1								
C.H. Emmanuel Rain	95	GONESSE		9	1							
C.H. René Dubos	95	PONTOISE		3	2	5		2		1		
C.H. Victor Dupouy	95	ARGENTEUIL		8	2							
CH Simone Veil	95	EAUBONNE			3							
L.A.M. "La Croix Blanche"	95	MONTIGNY-LES-CORMEILLES				2						
L.A.M. Ackermann	95	ERMONT		1								
L.A.M. Bichon-Danon	95	SANNOIS		1								
L.A.M. Bonan	95	MERY-SUR-OISE		2								
L.A.M. Clinique Claude-Bernard	95	ERMONT		1								
L.A.M. de la Constellation	95	CERGY				1						
L.A.M. De Saint-Leu La Forêt	95	ST LEU LA FORET				1						
L.A.M. Deutsch	95	GOUSSAINVILLE		1								
L.A.M. d'osny/ Saint-André	95	OSNY		1								
L.A.M. du Clos Bertin	95	FRANCONVILLE		1		3						
L.A.M. Froger/ rouzaud, benoist	95	EAUBONNE				1						
L.A.M. Guedj	95	VILLIERS-LE-BEL		3		1						
L.A.M. I.R.A.B.S	95	SARCELLES		4								
L.A.M. Miel selambo/Vaureal	95	VAUREAL		5								
L.A.M. Renard	95	EAUBONNE				1						
L.A.M.Tubiana/ Poincaré	95	SARCELLES		3		1						
cerba	95	SAINT OUEN L'AUMONE					1			1		
L.A.M. Hippomène-Pages	971	POINTE-A-PITRE		1								
L.A.M. Pean Dulormne	971	POINTE-A-PITRE				1						

Laboratoire expéditeur	Département	Villes	Arrondissement	<i>Shigella</i>	Info. <i>Shigella</i>	<i>E.coli</i> IP	<i>E.coli</i> RD	Sérums	Selles IP	Selles RD	non <i>E. coli-Shigella</i>	pas de culture
C.H. du Lamentin	972	LE LAMENTIN				1						
C.H. Zobda-Quitman	972	FORT DE FRANCE		3		1						
L.A.M. C.G.N.	972	FORT DE FRANCE				1						
L.A.M. Saint-Paul	972	FORT DE FRANCE				1						
C.H. de l'Ouest Guyanais "Franck Joly"/L.A.M. Ouest Bio Santé	973	SAINT-LAURENT DU MARONI		71								1
C.H.G. de Cayenne	973	CAYENNE		13		1					2	
L.A.M. Plenet/Selarl Biologie Centre	973	CAYENNE		1								
C.H. Gabriel Martin	974	SAINT-PAUL		1								
C.H. Sud Réunion	974	SAINT-PIERRE						2		1		
C.H.D. Félix Guyon	974	SAINT-DENIS		2								
L.A.M. Fridmann	974	SAINT-GILLES-LES-BAINS				1						
L.A.M. Kamoun	974	SAINT-PIERRE		1								
C.H. de Mamoudzou	976	MAMOUDZOU		2								
PAS ADRESSE		PAS ADRESSE		3	1	2	3					
C.H. Princesse Grâce	98	MONACO				1						
Centre des Salmonella et Shigella	B	BRUXELLESB				1						
FLEMING LABS	Italie	BRESCIA						1				
Laboratoire National De Santé	L	LUXEMBOURG		1								
TOTAL				853	181	455	55	330	28	144	37	8