



INSTITUT PASTEUR



Hôpital R. Debré - Paris

Rapport d'Activité 2006

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

Grimont Francine Tél : 0145688344

Filliol Ingrid Tél : 0145688344

Téléphone : 0145688739 (Secrétariat)

colishig@pasteur.fr

fxweill@pasteur.fr

fgrimont@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

Historique :

Renouvellement du CNR par Arrêté du 6 Janvier 2006 (création par Arrêté du 26/04/2002).

Renouvellement du laboratoire associé par Arrêté du 6 Janvier 2006 (création par Arrêté du 26/04/2002).

Directeur du CNR : Patrick Grimont remplacé par François-Xavier Weill le 31 décembre 2005

Directeur adjoint du CNR : Francine Grimont remplacée par Ingrid Filliol le 1^{er} septembre 2006

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 de *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'Institut de Veille Sanitaire, 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 européens (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 évènement 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 2006

L'année 2006 s'est caractérisée par quelques changements dans la structure du CNR : tout d'abord la décision du Dr Patrick Grimont de laisser sa place de directeur du CNR au Dr François-Xavier Weill, puis le départ en retraite du Dr Francine Grimont qui a été remplacée par le Dr Ingrid Filliol au poste de Directeur adjoint du CNR.

Du point de vue activité, alors que la fin d'année 2005 avait été marquée par deux épidémies successives à *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC), aucune épidémie collective à *E. coli* n'a été signalée cette année. Un total de 629 souches d'*E. coli* a été analysé. Cent cinquante trois selles ont été testées pour la présence de gènes de virulence spécifiques des *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC ou STEC), 383 sérologies anti-LPS pour les EHEC ont été réalisées et 763 souches de *Shigella* sérotypées. Seule une épidémie de *Shigella sonnei* g a été signalée dans la région d'Auxerre chez des gens du voyage. La collaboration avec le CH d'Auxerre et l'InVS nous a permis de mettre en évidence l'apparition de souches résistantes à l'amoxicilline et d'adapter le traitement.

Dans le domaine de la surveillance des *E. coli* STEC, tous les résultats (selles, souches, sérologie) sont communiqués à l'InVS. Concernant la surveillance des *Shigella*, toute épidémie est signalée à l'InVS et une attention particulière est portée à la résistance aux antibiotiques. De plus un antibiogramme est maintenant réalisé sur toutes les souches de *Shigella* en complément du sérotypage.

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 espèces *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* en fluorescence 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 ainsi que quelques sérums spécifiques fabriqués « maison ».

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 218 profils 147 sérogroupes O pour *E. coli* et 41 profils pour 38 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 près 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 Syndrome Hémolytique et Urémique (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) d'appartenance. Pour *Shigella*, la base n'est pas encore validée car les comparaisons sont plus difficile 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 en cas d'épidémie, particulièrement à EHEC.

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

- 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* entéro-pathogènes (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.

- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Un antibiogramme est réalisé en routine depuis environ 6 mois 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
Gentamycine	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).

- 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 : *Sh. dysenteriae* 1, *S. enterica* sérotype *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 2006 :

En ce qui concerne les prélèvements reçus au CNR :

Un total de 1291 souches, 26 selles et 383 sérums ont été reçus et analysés au CNR-IP en 2006.

Un total de 134 souches, 127 selles ont été reçus et analysés au laboratoire associé RD en 2006.

Soit globalement **1431** souches, **153** selles et **383** sérums analysés par le CNR-ESC en 2006.

Ces prélèvements se répartissaient de la façon suivante :

Tableau 1 : répartition des prélèvements reçus au CNR

	France métropolitaine	France outre-mer	Étranger	Total
Selles IP	26	0	0	26
Selles RD	127	0	0	127
Total Selles	153	0	0	153
<i>E. coli</i> IP	470	15	10	495
<i>E. coli</i> RD	134	0	0	134
Total <i>E. coli</i>	604	15	10	629
Absence de culture	4	0	0	4
Non <i>E. coli-Shigella</i>	30	3	2	35
Sérums	380	3	0	383
<i>Shigella</i>	697	50	16	763

En plus de ces prélèvements, 192 feuilles d'informations concernant des cas de *Shigella sonnei* ont été renvoyées au CNR. (Exemple de feuille d'information : cf. Annexe)

A- E. coli

a- Inventaire global des souches et selles de E. coli en 2006

Le CNR-IP a reçu au total 495 souches et 26 selles, et le laboratoire associé (RD) a reçu 134 souches et 127 selles, adressées par de nombreux laboratoires hospitaliers, laboratoires d'analyses médicales, facultés de médecine, centres de santé, laboratoires départementaux, et Instituts médicaux ou vétérinaires .

Parmi les 495 souches reçues à l'IP, nous détaillerons les 470 provenant de France métropolitaine. Les autres souches provenaient de départements français d'outre mer, du Maroc ou de République Centrafricaine.

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

	IP	RD	Total
Nbr de souches reçues d'origine humaine	455 pour 430 patients	113	568
Nbr de souches reçues d'origine animale ou alimentaire	15	21	36
Souches vaginales (test K1)	21 pour 20 patients (5 +)		21
Souches isolées de selles	338 pour 323 patients	72	410
Souches urinaires	36 pour 32 patients *	3	39
Souches sanguines	14 pour 13* patients	17	31
Souches d'autres origines (Biopsie, LCR, pus, lait de mère...)	9 pour 9 patients	21	30
Souches d'origines non précisées	34 pour 34 patients		34
Selles reçues dans le cadre de la surveillance du SHU	26 pour 25 patients	127	153

* pour un patient, une souche a été isolée dans l'urine et dans le sang

b- Résultats obtenus sur les prélèvements de selles

Les 153 prélèvements de selles humaines ont été adressés dans le cadre du Réseau de surveillance du SHU en France et dans le cadre d'investigations de cas isolés ou d'épidémies de colites hémorragiques ou de SHU.

Ces prélèvements provenaient de 152 patients :

- **95 enfants** âgés de 1 mois à 15 ans (45 filles et 50 garçons)

- 19 enfants de moins d'un an
- 59 enfants âgés de un à cinq ans
- 9 enfants âgés de 5 à 10 ans
- 8 enfants âgés de 10 à 15 ans

Les renseignements cliniques lors de l'envoi des selles n'étaient disponibles que dans 40 cas : 9 diarrhées simples, 6 diarrhées sanglantes, et 25 SHU

- **57 adultes** âgés de 16 à 84 ans (32 hommes / 25 femmes), prélèvements réalisés dans le cadre de diarrhées sanglantes, de colites hémorragiques ou dans le cadre d'une enquête épidémiologique autour d'un cas de SHU ou de diarrhée glairo-sanglante à STEC

Les renseignements cliniques lors de l'envoi des selles n'étaient disponibles que dans 20 cas : 5 diarrhées simples, 8 diarrhées sanglantes, 4 SHU et 3 microangiopathies thrombotiques

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 2006, 153 selles sur les 1784 selles reçues dans le service de Microbiologie pendant cette période.

Sur les 153 prélèvements de selles, la recherche directe des gènes de pathogénicité par amplification génique *in vitro* a été positive dans 37 cas, avec les profils de virulence suivants :

- 4 profils *stx1* + *stx2* + *eae*
- 21 profils *stx2* + *eae*
- 5 profils *eae*
- 1 profil *stx1*
- 4 profils *stx2*
- 1 profil *eae* + EAST1
- 1 profil EAST1

Les résultats de la PCR directe sur les selles a été corrélée 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 . Quarante et une souches ont été isolées, avec les caractéristiques suivantes (Tableau 3):

Tableau 3 : Profils de virulence des 41 souches retrouvées dans les selles positives

Sérotypes	N	Profil de virulence			
		<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1+stx2</i>
O157 H7	15	15		12	3
O 26	1	1		1	
O 111	2	2			1
O 124	1	1			
O 127	1	1			
O128	1	1			1
NT	20	4	1	15	
Total	41				

NT = *E.coli* non sérotypable

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

Le CNR a recherché, dans les prélèvements reçus, 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 dans tous les prélèvements reçus. Il a également détecté le **gène *eae*** codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC.

Après exclusion des 21 souches vaginales, sur les 434 souches d'origine humaine à l'IP (410 patients) et 113 souches à RD, on retrouve les souches STEC ou VTEC suivantes :

- **66 patients (12%)** ont été trouvés porteurs de souches possédant des gènes *stx*: ces souches sont réparties de la façon suivante: (Tableau 4).

Tableau 4 : Répartition des souches VTEC par sérotype :

	O26	O111	O128	O157	NT	Total
<i>stx1, stx2</i>					1	1
<i>stx1, stx2, eae</i>		1		4		5
<i>stx1, stx2, ehlyA</i>			1		1	2
<i>stx1, stx2, eae, ehlyA</i>				1	1	2
<i>stx1</i>					7	7
<i>stx1, eae</i>	1					1
<i>stx1, ehlyA</i>					1	1
<i>stx1, eae, ehlyA</i>	4	1			1	6
<i>stx2</i>					3	3
<i>stx2, eae</i>	1			12	14	27
<i>stx2, eae, ehlyA</i>				10	1	11
TOTAL	6	2	1	27	30	66

Sérotype O26

Les 6 souches correspondantes ont été isolées chez des enfants de sexe masculin, de 1 à 5 ans, un symptôme de diarrhée ayant été précisé pour 2 cas.

Sérotype O111

Les 2 souches correspondantes ont été isolées chez des d'enfants de sexe masculin, de 1 à 5 ans, un symptôme de SHU ayant été précisé pour 1 cas.

Sérotype O128

La souche correspondante a été isolée chez un enfant de sexe masculin, de 3 ans, présentant une diarrhée.

Sérotype O157

Parmi les 27 souches de sérotype O157 H7, on retrouve 27 patients dont la répartition en fonction de l'âge du sexe et des signes cliniques est indiquée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Répartition par symptômes, âge et sexes des souches O157 (M= Masculin, F= Féminin)

	1 à 5 ans		5 à 15 ans		15 à 64 ans	> 65 ans
	M	F	M	F	F	F
SHU	5	5	1	5		
Diarrhée sanglante			1		1	
Diarrhée	2	1			2	
Non précisé	1	1	1			1
Total par sexe et âge	8	7	3	5	3	1
Total par âge	15		8		3	1

Parmi ces souches, 2 épidémies familiales chez des enfants de 1 à 5 ans (deux soeurs dans un cas et deux frères dans l'autre) ont été mentionnées.

E. coli non sérotypables (NT)

Parmi les 30 souches NT, on retrouve 30 patients dont la répartition en fonction de l'âge du sexe et des signes cliniques est indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Répartition par symptômes, âge et sexes des souches non sérotypables (M= Masculin, F= Féminin)

	< 1 an		1 à 5 ans		5 à 15 ans		15 à 64 ans		> 65 ans
	M	F	M	F	M	F	M	F	M
SHU	1	3	5	5		1			
Diarrhée sanglante							2		
Diarrhée			1			1	1		
Non précisé	1		2	1	1		3	1	1
Total	2	3	8	6	1	2	6	1	1

Le sérotypage moléculaire de 23 de ces 30 souches non sérotypables a été réalisé par l'IP. Les autres sont en cours. (Voir paragraphe 2-2-A-d).

Tableau 7 : Caractérisation des gènes en fonction des signes cliniques :

	SHU	Diarrhée sanglante	Diarrhée	Non précisé
<i>stx1, stx2</i>	1			
<i>stx1, stx2, eae</i>	4		1	
<i>stx1, stx2, hlyA</i>			1	1
<i>stx1, stx2, eae, hlyA</i>			2	1
<i>stx1</i>		2	1	4
<i>stx1, eae</i>			1	
<i>stx1, hlyA</i>				1
<i>stx1, eae, hlyA</i>			1	4
<i>stx2</i>	1		1	1
<i>stx2, eae</i>	20			7
<i>stx2, eae, hlyA</i>	6	2	2	1
TOTAL	32	4	10	20

d- Sérotypage moléculaire des souches STEC non sérotypables

Les résultats du sérotypage moléculaire de 23 souches sur les 30 souches non sérotypables par agglutination sont présentés ci dessous. L'analyse des autres souches est en cours.

Tableau 8 : Résultats du sérotypage moléculaire de 23 souches de 2006 (NT= non sérotypable)

N°RD	N°IP	Agglutination		PCR virulence	Sérotypage moléculaire		bilan O
		RD	IP		O-RFLP	flhC	
	#06 0516		NT	stx2	ND	F19	NT
	#06 0471		NT	stx1	NT	F7	NT
	#06 2849		NT	stx1, EAST1	NT	NT	NT
	#06 3143		NT	stx1	NT	NT	NT
	#06 6282		NT	stx1, stx2	NT	NT	NT
21924	#06 4246	NT	NT	stx2, eae	NT	F2	NT
22793	#06 4253	NT	NT	stx2, eae	R1	ND	1
22760	#06 4252	O111	NT	stx1, stx2, eae	R111	ND	111
	#06 4312		NT	stx1, eae	R117	F7	117
	#06 5628		NT	stx1	R117	F7	117
	#06 7343		NT	stx1	R117	F7	117
	#06 8670		NT	stx1	R117	F7	117
	#06 8990		NT	stx1, EAST1	R117	F7	117
	#06 4754		NT	stx2, eae	R145	F28	145
	#06 6888		NT	stx1, stx2, eae	R157	F7	157
21981	#06 4248	NT	NT	stx2, eae	R2	ND	2
	#06 4110		NT	stx1, eae	R26	F11	26
23412	#06 4260	NT	NT	stx2, eae	R26	ND	26
21925	#06 4261	NT	NT	stx2, eae	R26	ND	26
	#06 0065		NT	stx2, eae	R80	F2	80
23374	#06 4258	O55	NT	stx2, eae	R80	ND	80
23248	#06 4256	NT	NT	stx1, stx2	R91	F21	91
23282	#06 4257	NT	NT	stx1	R91	F21	91

Il est intéressant de noter l'appartenance de 5 souches au sérotype O117. On peut aussi remarquer le défaut de sensibilité des réaction d'agglutination car les sérotypes O26, O157, O111, O145 devraient être identifiés par agglutination.

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

Tableau 9 : analyses des gènes de virulence des souches non STEC

	NT	O25	O26	O55	O86	O111	O112	O114	O119	O124	O125	O126	O127	O128	O142	O157	rough	Total
<i>aer</i>	7 ^c																	0
<i>AFA, aer</i>	2																	2
<i>cnf</i>	1																	1
<i>eae</i>	17		1	10				1			1		4	10	2	1		47
<i>eae, bfpA</i>	1												1		1			3
<i>eae, EAST1</i>	1		1											1				3
<i>eae, ehlyA</i>	2		2													2		6
<i>EAST1</i>	24 ^{ae}	1	1	1	1	11				1		1	3					20
<i>EAST1, aer</i>	1																	1
<i>EAST1, ehlyA</i>	1																	1
<i>EAST1, PAP</i>	1																	1
<i>EAST1, PAP, aer</i>	2 ^b																	0
<i>ial</i>	2																	2
<i>ial, ipaH</i>	2																	2
<i>ial, ipaH, EAST1</i>	1																	1
<i>ipaH</i>	1																	1
<i>PAP</i>	6																	6
<i>PAP, aer</i>	3 ^c																	0
<i>PAP, SFA, cnf</i>	2																	2
<i>SFA</i>	3 ^d												1 ^d					0
<i>SFA, aer</i>	1																1	2
sans gène	212 ^{ab}		2	8	3		1		1	1	4	5	2	2			2	243
Total	254	1	7	19	4	11	1	1	1	1	6	5	8	16	3	3	3	344

Chaque lettres en exposant correspond à un patient pour lesquels deux souches avec des résultats différents ont été isolé

f- Sérodiagnostic des Syndromes Hémolytiques et Urémiques (IP)

Un total de **382 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 des *E. coli* et *Shigella* 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, (liste courte) dans la majorité des cas

Pour 82 patients, 2 sérums ont été analysés à 15 jours d'intervalle ; pour 5 patients, 3 sérums ont été envoyés et pour 1 patient, 4 sérums ont été envoyés. En considérant un sérum par patient, soit **287 sérums**, le bilan des résultats obtenus est le suivant : (tableau 10).

Tableau 10: Répartition par âge, et sexe des résultats de sérologie anti LPS

	< 1 an		1-5 ans		5-15 ans			15-64 ans			> 65 ans			NR		Total
	M	F	M	F	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	
O26			1	2	1			1	1			1			1	8
O91																0
O103												1				1
O111						1			1							2
O128																0
O145			2	3				1	1							7
O157			21	17	8	11		8	9		1	5			1	81
O103/O157			1		1				1							3
Total Positifs			25	22	10	12		10	13		1	7			2	102
Négatif	3	3	25	38	7	5	1	31	37	2	11	14	1	4	3	185
Total	3	3	50	60	17	17	1	41	50	2	12	21	1	4	5	287

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

36% des sérums analysés ont révélé la présence d'anticorps anti-LPS avec pour 79% des positifs des anticorps O157.

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

Pour 30 patients les analyses ont été effectuées à la fois sur le sérum et sur la souche les résultats sont représentés dans le tableau 11. L'agglutination est moins sensible que la sérologie pour 3 souches, et inversement pour une souche. Il y a une discordance de résultats dans un cas. Pour 2 souches non typables des anticorps anti O111 ou O157 ont été détectés. Le O124 n'est pas testé en serologie et ne peut donc pas être détecté. Concernant les souches agglutinant en O157 des anticorps ont pu être détectés dans 11 cas sur les 12 testés (92%).

Tableau 11 : comparaisons des résultats obtenu pour les souches et sérums de 30 patients

Résultats souches				sérologies	nombre de cas
agglutinations	stx1	stx2	eae		
NT	-	+	+	négative	4
NT	-	-	-	négative	1
NT	-	-	-	négative	6
NT	-	-	-	O111	1
NT	-	-	-	O157	3
NT	+	-	+	O157	1
O124	-	-	-	négative	1
O157	-	+	+	négative	1
O157	-	+	+	O157	10
O157	+	+	+	O157	1
O86	-	-	-	O157	1

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 17 souches de *E.coli* isolées de LCR de nouveau-nés atteints de méningites néonatales. Les caractéristiques de ces souches sont représentées ci dessous(Tableau 12).

Tableau 12 : résultats de l'étude des souches de méningites néonatales

S	Origine	gp	K1	ChuA	Hra	TSPE4. C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G*	cnf1	iroN
RD - 245	Versailles	B21	+	+	-	+	+	+	-	+	+	II	-	+
RD - 246	Cochin- Paris	B2	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
RD - 247	Pontoise	B21	+	+	-	+	+	-	-	+	+	II	-	+
RD - 248	Lyon	B21	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
RD - 249	Reims	B2	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
RD - 250	Poissy	B21	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
RD - 251	Lagny	B2	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
RD - 252	Nice	D	+	+	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-
RD - 253	Rennes	B2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	III	+	+
RD - 254	Bordeaux	B21	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
RD - 255	Villefranche /Saône	B21	+	+	-	+	+	-	-	+	+	II	-	+
RD - 256	Bondy	D	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
RD - 257	Aulnay sous bois	B21	+	+	-	+	+	-	-	+	-	II	-	-
RD - 258	Arpajon	B21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
RD - 259	Nice	D	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
RD - 260	Limoges	B21	+	+	-	+	+	-	-	+	+	II	-	+
RD - 261	St Michel	B2	-	+			+	-	-	-	+	-	-	-

* pour PAP G : les résultats positifs sont indiqué 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 et sensibilité aux antibiotiques

Le laboratoire associé a reçu 16 souches de *E. coli* isolées des hémocultures de nourrissons < 3 mois dont les caractéristiques sont représentées dans le tableau 13.

Tableau 13 : facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de septicémies

2006	gp	sfa/ foc	iroN	papC	papGI	papGII	papGIII	fyuA	hly	cnf1	aer	AMX	CFM	CTX	SXT	NAL	CIP
142	D	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	R	S	S	R	S	S
141	B2	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	S	S	S	S	S	S
140	D	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	R	R	R	R	R	S
139	B21	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	R	S	S	R	S	S
138	D	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	R	S	S	R	R	S
137	D	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	R	S	S	S	S	S
136	B2	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	S	S	S	R	S	S
135	D	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	S	S	S	S	S	S
134	B2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	R	S	S	R	S	S
133	A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	R	S	S	S	S	S
132	B2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	R	S	S	S	S	S
131	B2	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	R	S	S	R	S	S
130	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	R	S	S	R	S	S
129	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	R	S	S	R	S	S

B-Shigella

Durant l'année 2006, le CNR-ESC a reçu et étudié **865** souches envoyées comme *Shigella*. **763** souches ont été identifiées comme *Shigella*, **78** comme *E. coli* (9%) et **24** comme étant ni *E. coli*, ni *Shigella*. Parmi les 763, souches **697** ont été identifiées chez **692** patients en France métropolitaine, 50 en outre mer (49 en Guyane française et une à la Réunion) et 16 à l'étranger (cf tableau Annexe 2).

De plus, **192** fiches d'informations ont été envoyées au CNR pour signaler une infection à *Shigella*. En compilant informations plus souches, un total de **950** souches de *Shigella* a été répertorié au CNR en 2006 (dont 884 en France métropolitaine).

a- Analyses des 697 souches reçues de 692 patients en France métropolitaine en 2006

La répartition des différents sérotypes de *Shigella* est indiquée dans les tableaux 14 à 17.

- Tableau 14 : *Shigella boydii* (60 souches pour 60 patients)

Sérotipe	Nombre de cas	Départements touchés () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
1	5	25, 66, 69, 75, 77		Burkina Faso, Angola
2	18	16, 26, 31, 35, 59, 67 (2), 69, 75 (2), 91, 92(2), 94, 95 (4)	Familiale (2, 95)	Bénin, Mali (2), Sénégal, Tunisie
4	6	29, 33, 69, 91, 92 (2)		Inde, Maroc (2), Mauritanie
5	1	75		
8	2	69, 75		Inde
10	2	75, 79		
11	2	11, 95		
12	1	59		Inde
13	3	04, 42, 92		
14	4	55, 69, 75, 78		
18	4	30, 60, 75 (2)		
19	3	33, 78, 95		Afrique, Togo
20	9	35, 38 (2), 72, 75 (2), 94 (2), 95		Afrique, Inde, Cote d'Ivoire

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

b- si épidémie : type (nombre de cas, département)

- Tableau 15 : *Shigella dysenteriae* (33 souches pour 32 patients)

Sérotipe	Nombre de cas	Départements touchés () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
1	2	77, 94	Familiale (?, 94)	Mali
2	9	54 (2), 75 (3), 77 (2), 78, 92		Haïti, Niger, Soudan
3	9	06, 13, 37, 41, 67, 69 (2), 74, 94		Afrique, Maroc, Sénégal, Turquie
4	4	33, 50, 75, 93	Familiale (?, 33)	Sénégal
12	2	31, 69		Bénin
97-10607	6	61, 69, 75 (2), 78, 84		Egypte, Gabon

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

b- si épidémie : type (nombre de cas, département)

- Tableau 16 : *Shigella flexneri* (265 souches pour 265 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Départements touchés () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
1	2	87, 94		
1a	3	24, 75 (2)		
1b	34	13, 17, 22 (2), 34, 44, 47, 49, 59, 68 (2), 69 (5), 74, 75 (5), 78 (3), 81, 87, 89 (4), 92 (2), 93	Familiale (? , 78) Collective (3, 89, mariage)	Afrique, Algérie, Cameroun (2), Colombie, Egypte, Guinée, Madagascar, Mali, Maroc, Pakistan, Tunisie
2a	76	06, 10, 22 (2), 25, 28, 29, 33 (3), 35 (2), 38 (3), 40, 45 (2), 47, 50 (2), 51, 59 (2), 61, 65, 68, 69 (9), 73, 74, 75 (10), 76 (2), 77 (2), 78 (6), 79, 80, 81, 83, 85 (2), 91, 92 (4), 93 (3), 94, 95 (3)	Familiale (3 92)	Afrique, Algérie (2), Cameroun, Congo, Cote d'ivoire, Guinée, Inde (3), Madagascar (2), Mali (3), Maroc (2), Namibie, Niger (2), Sénégal (5)
2b	19	31, 37, 42, 54, 66, 69 (2), 75 (2), 78, 91 (2), 92 (3), 93 (2), 94, 95	Familiale (3, 37)	Algérie, Arabie Saoudite, Madagascar (4), Sénégal
3a	32	06, 26, 27, 33, 34, 35, 47, 67, 69 (3), 71, 74 (2), 75 (8), 78, 79, 81, 85, 91 (3), 92, 93, 95	Collective (2, 78, internat)	Afrique, Angola, Arabie Saoudite, Costa rica, Ethiopie, Inde, Madagascar, Maroc, Niger, Sénégal
3b	3	01, 66, 67		
4	18	18, 29, 47, 67, 69 (2), 75 (5), 77, 78, 91, 93, 94, 95 (2)	Familiale (? , 75) Familiale (2, 95)	Burkina Faso, Comores, Madagascar, Maroc (3)
4 variété Saigonensis	5	42, 68, 69, 75, 77		Cote d'Ivoire, Pérou
6 Boyd 88	4	65, 69, 75, 78		Congo
6b	51	08, 17, 21, 23, 31, 33, 35, 40, 43, 44, 45 (2), 49, 58, 60, 69 (8), 71, 73, 75 (4), 76, 78 (10), 83, 85, 91 (2), 92, 93 (2), 94 (2), 95 (2)	Collective (? , 17, restaurant)	Afrique, Burkina Faso, Canada, Cameroun, Egypte, Inde, Maroc, Mauritanie, Tunisie, Turquie, Sénégal
Y	5	06, 18, 69, 75, 94		Inde
Non sous typable (nst)	13	44, 47, 49, 59, 69 (3), 73, 76, 87, 91, 92 (2)		Algérie, Egypte (2), Espagne, Inde

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

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

- Tableau 17 : *Shigella sonnei* (337 souches pour 333 patients)

Sérogroupe	Nombre de cas	Départements touchés () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
a	22	06, 10, 33, 35 (4), 36, 48, 53, 56 (2), 59, 60, 67, 73, 75 (2), 78, 82, 93, 95	Familiale (4, 35), Familiale (3,56)	Brésil (2), Haïti, République Dominicaine, Tunisie
e	1	93		
g	262	01 (2), 02, 04 (3), 06 (7), 11, 13 (5), 16, 17 (4), 21 (3), 22, 24, 25 (2), 26 (2), 30 (20, 31 (6), 33 (9), 34 (8), 35 (2), 38 (2), 39, 41 (2), 42, 44 (4), 45, 49, 50, 51 (5), 53 (6), 54 (2), 55 (6), 56 (2), 57 (3), 58 (2), 59 (4), 60 (4), 61, 62 (3), 64, 65 (2), 66 (2), 67, 69 (3), 71, 73 (2), 74 (5), 75 (41), 76 (2), 77 (6), 78 (12), 80 (2), 83 (2), 85 (4), 86, 89 (12), 91 (9), 92 (21), 93 (7), 94 (6), 95 (10)	Familiales : (2, 2), (3, 4), (2, 6), (3, 31), (2, 41), (4, 51), (2, 53), (2, 53), (2, 75), (3, 75, Maroc), (2, 78), (4, 92), Groupés : (2, 17), (3, 34, glace), 52, 69), (2, 74, œufs), (2,75, Pakistan), (6, 85, repas), Gens du voyage **: (6,55), (12, 89)	Afrique, Algérie (4), Asie (2), Cambodge, Cap-Vert, Cote d'Ivoire (2), Egypte (8), Guinée, Inde (7), Mali (2), Mauritanie, Maroc (15), Mexique, Népal (2), Nigeria, Ouzbékistan, Pakistan (3), Pologne, Sénégal (2), Soudan, Thaïlande, Tunisie (4), Turquie (3), Vietnam, Yémen
g (ONPG-)	47	01 (2), 06 (2), 13 (2), 14, 16, 31, 33, 34, 38, 42, 44 (4), 45, 52, 56, 59, 62, 66, 68, 71, 72, 74 (2), 75 (6), 78 (4), 84, 91 (2), 93, 94 (5)		Algérie (3), Bénin (2), Burkina Faso, Mali (3), Maroc (2), Togo, Tunisie (4), Sénégal (3)

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

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

** Épidémie chez des familles de gens du voyage dans la région d'Auxerre, détaillée dans la partie 3-3

- ***Shigella non sérogroupable***: 2 souches isolées de 2 patients différents dans les départements 13, et 45 sans notion de voyage à l'étranger.

c- Souches reçues d'outre-mer (50 souches)

49 souches de Guyane française réparties comme il suit :

4 *S. flexneri* 1b

11 *S. flexneri* 2a

8 *S. flexneri* 3a

5 *S. flexneri* 6 Boyd 88

4 *S. flexneri* 6b

1 *S. flexneri* Y

16 *S. sonnei* g

1 souche de *Shigella sonnei* a de la Réunion.

d- Bilan des feuilles d'informations reçues au CNR (192 fiches)

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 permettant de noter le caractère ONPG et Rhamnose de la souche, ce qui permet, si rempli, de définir le biotype. Le tableau 21 vous présente les résultats obtenus à partir de ces comptes-rendus.

- Tableau 18 : Feuilles d'information *Shigella*

Sérotype	Nombre de cas	Département touché () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
<i>S. boydii</i>	1	35		Mali
<i>S. flexneri</i>	2	67, 92		
<i>S. sonnei a</i>	4	69		
<i>S. sonnei d</i>	2	67		
<i>S. sonnei e</i>	1	67		
<i>S. sonnei g</i>	73	08 (2), 26, 35, 39, 42 (4), 45, 59 (4), 62, 67 (3), 69 (27), 75 (6), 76 (3), 77, 79, 80 (3), 84, 90, 92 (7), 95 (5)	Familiale (2, 8), Familiale (2, 42), Familiale (2, 59), Familiale (2, 80), Familiale (4, 80), Familiale (2, 92)	Algérie (3), Brésil (2), Burkina Faso, Egypte, Inde, Kenya (2), Maroc (3)
<i>S. sonnei g (ONPG-)</i> ^o	10	35, 43, 59 (4), 67 (2), 78, 94		Sénégal, Tunisie
<i>S. sonnei non précisé</i>	99	02 (2), 06, 08, 14 (2), 22, 25, 26 (3), 28 (2), 29, 35 (4), 36, 37, 38, 44 (2), 45 (4), 47, 49 (2), 50, 51, 53 (2), 54 (2), 59 (5), 60 (2), 62, 63, 69 (8), 73, 74 (3), 75 (8), 76 (5), 77 (8), 78 (3), 80, 81, 85, 91 (2), 93 (2), 95 (3),	Familiale (2, 6), Familiale (2, 8), Familiale (2,35), Familiale (4, 74)	Algérie (3), Belgique, Brésil (2), Chine, Congo, Egypte (4), Gambie, Guyane, Inde, Kirghizstan, Maroc (2), Mauritanie, Sénégal (6), Tunisie

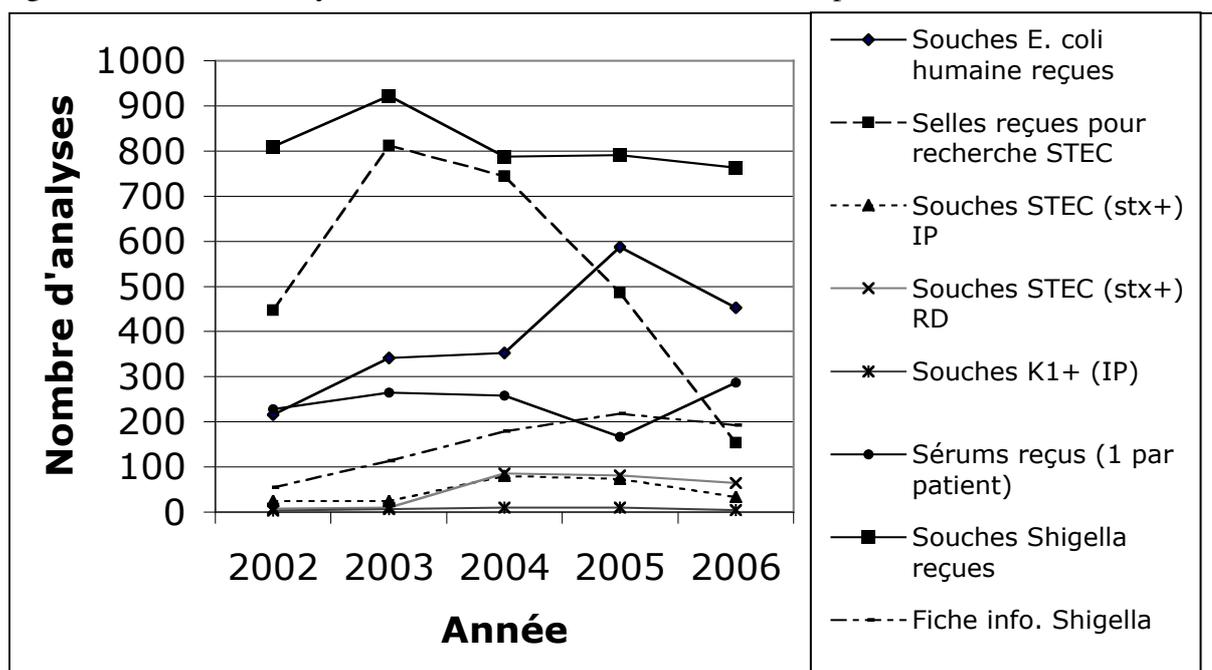
a- nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b- si épidémie : type (nombre de cas, département)

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 :



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 lui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (Laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...)

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

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

Tableau 19 : Répartition par âge et sexe de 466 souches de *E. coli* pour lesquels des données étaient disponibles: (410 IP, 56 RD)

	< 1 an			1-5 ans			5-15 ans			15-64 ans			> 65 ans			NR			Total
	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	
O25				1															1
O26				7	7						1								15
O55	2			9	4	1				1	1							1	19
O86	1			2							1								4
O111		1		8	2	1				1								1	14
O112											1								1
O114					1														1
O119	1																		1
O124					1														1
O125	3			1	2									1					7
O126	1			1	2											1			5
O127	1			6			1						1				1		10
O128	1			13	4														18
O142				3															3
O157	1	1		9	4		2	3			2			3					25
non typable	28	22	2	52	55	2	5	7	1	45	60	4	15	24	1	4	10	1	338
Rough					1			1						1					3
Total	39	24	2	112	83	4	8	11	1	47	66	4	16	29	1	5	11	3	466

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

Figure 2 : Répartition par département (selon les laboratoires demandeurs) du nombre de souches reçues pour sérotypages *E. coli* en 2006

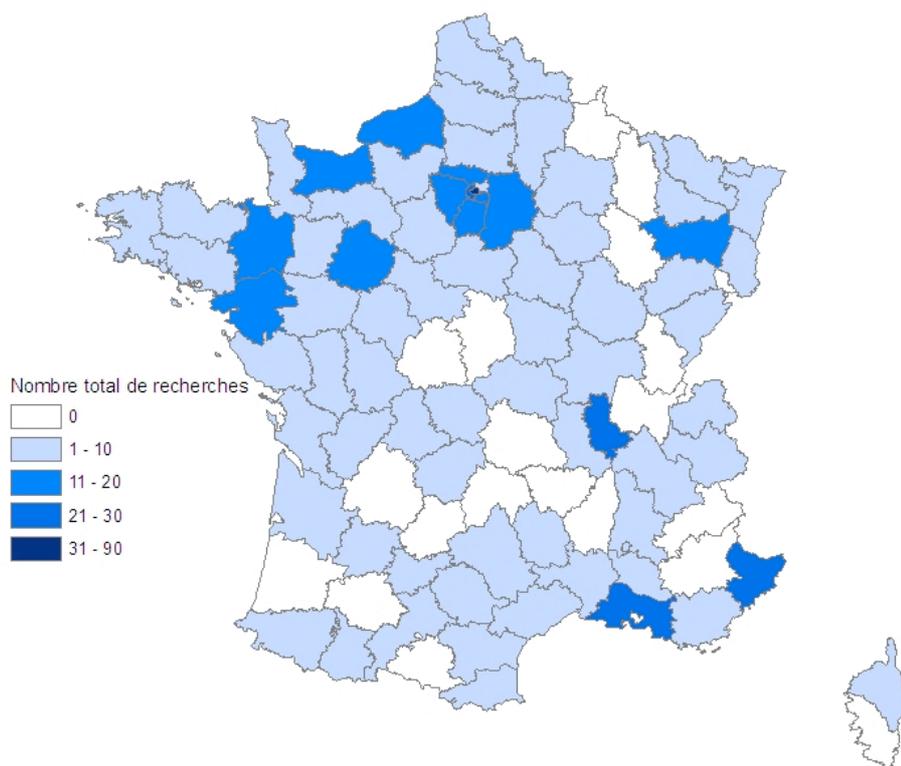
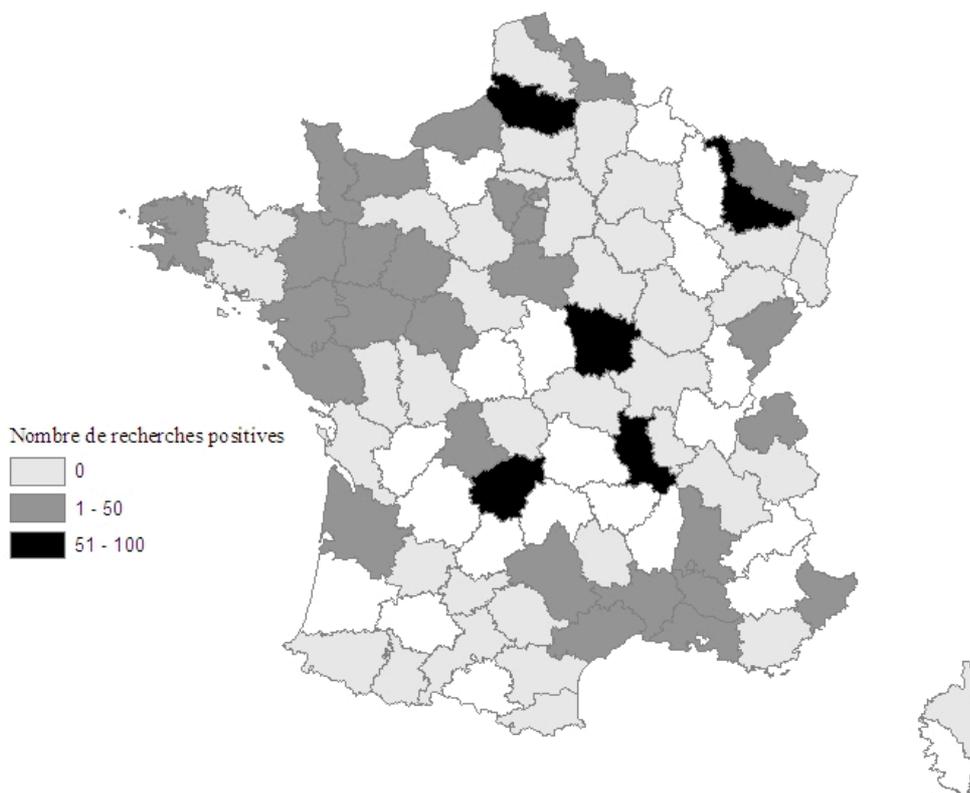


Figure 3 : Pourcentage de souches STEC (stx+) parmi les souches *E. coli* envoyées pour sérotypage dans départements:



- Analyse des selles reçues pour recherche d'*E. coli* :

Tableau 20: Répartition par âge et sexe des 37 selles contenant des facteurs de virulences :

	< 1 an			1-5 ans			5-15 ans			15-64 ans			> 65 ans			NR			Total
	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	
stx2, eae+	1	3		8	5			1						1				2	21
stx1, stx2, eae				2	1			1											4
stx1										1									1
stx2	1	1		1										1					4
eae					2			1		1	1								5
eae+EAST1																		1	1
EAST1																		1	1

NR=Non Renseigné, M= Masculin, F=Féminin.

- Répartition des analyses sérologiques :

Répartition des résultats de sérologie par âge et sexe pour les 287 patients (cf. tableau 12 paragraphe 2-2-A-g)

Figure 4 : Répartition par département (selon les laboratoires demandeurs) du nombre de sérologies d'*E. coli* reçues en 2006

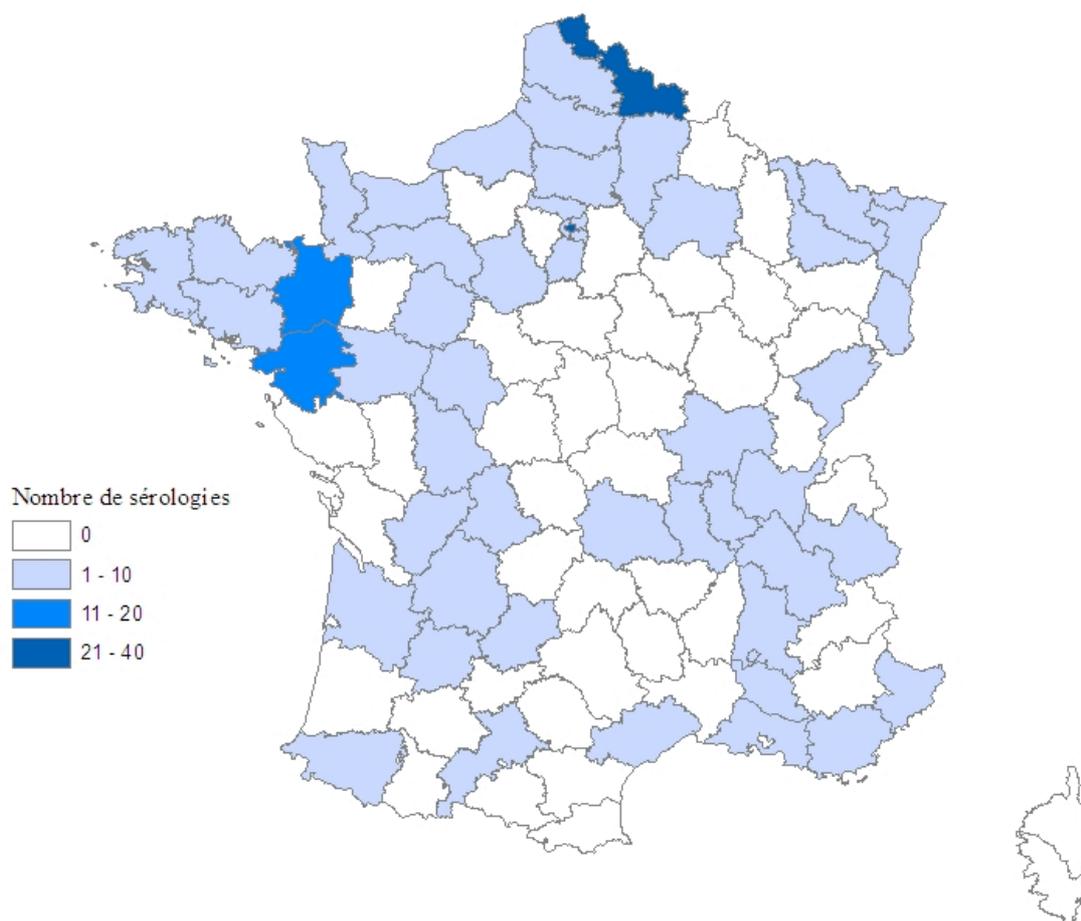


Figure 5 : Répartition par département du pourcentage de sérologies *E. coli* positives en 2006

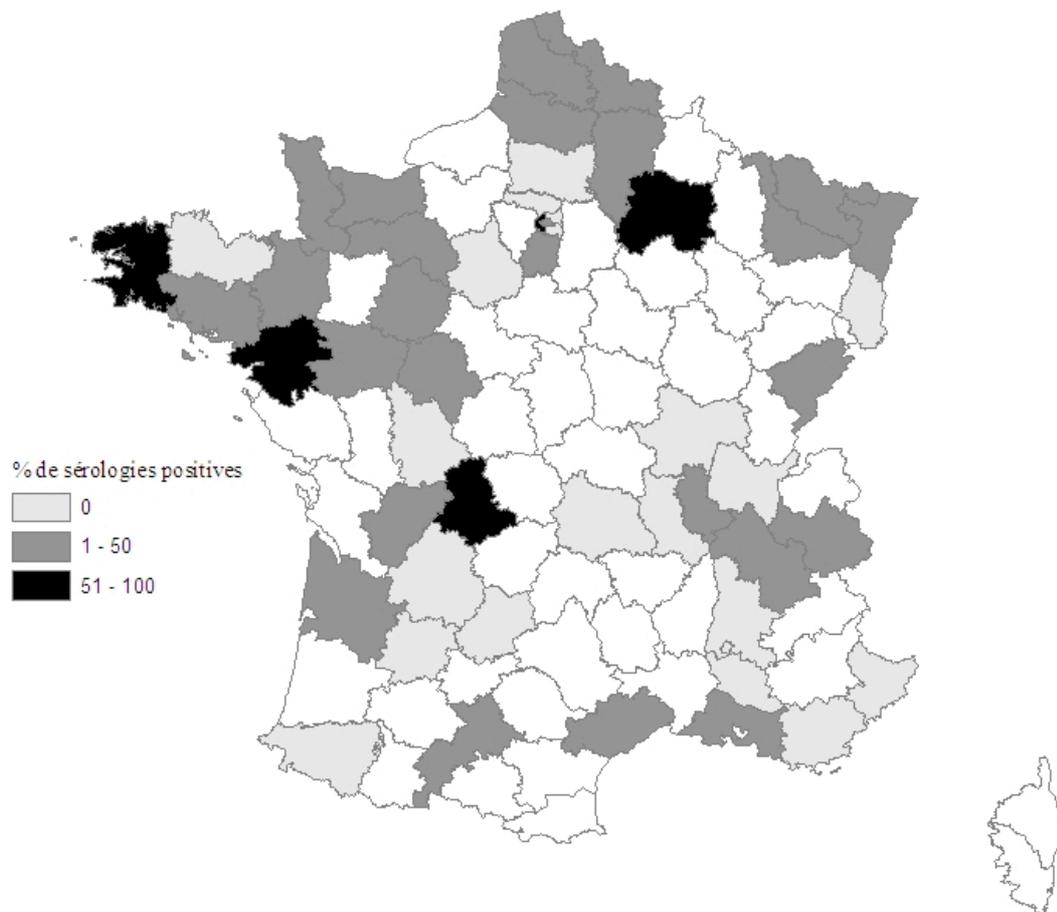
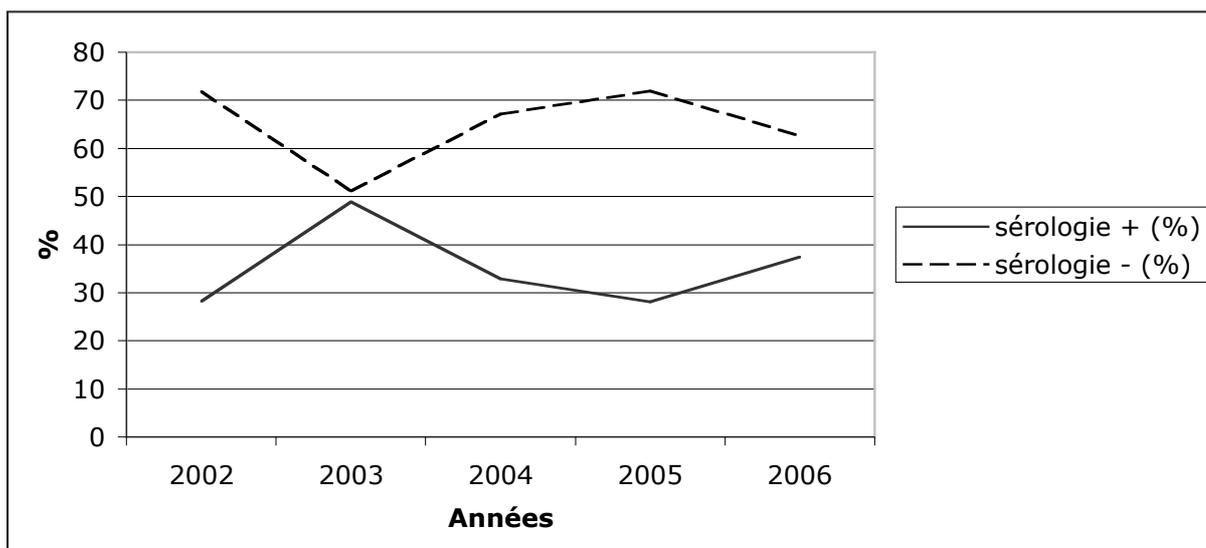


Figure 6 : Évolution des résultats de sérologies depuis 2002



- Souches de *Shigella* :

Des souches de *Shigella* ou des fiches d'information ont été adressées par 83 départements de France métropolitaine et 2 départements d'outre-mer. Le détail de la répartition par département selon les sérotypes est disponible dans les tableaux de résultats (tableaux 14 à 18). Seuls 12 départements, dont les numéros suivent, n'ont pas envoyé de souches ou de feuilles d'information : 03, 05, 07, 09, 12, 15, 19, 20, 32, 46, 70 et 88.

Figure 7 : Répartition par département du nombre de *Shigella* reçues en 2006 des laboratoires correspondant du CNR-ECS:

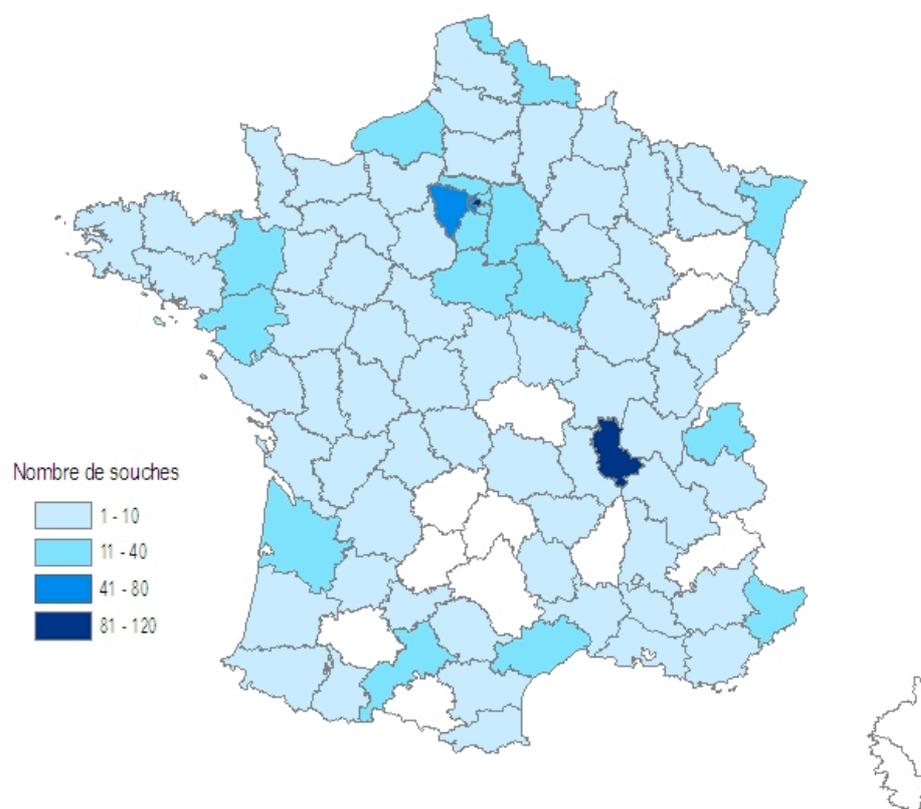


Tableau 21 : Distribution des différents sérotypes de *Shigella* par âge et par sexe

	< 1 an			1-5 ans			5-15 ans			15-64 ans			> 65 ans			NR			Total
	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	M	F	NR	
<i>S. boydii</i> 1										2	3								5
<i>S. boydii</i> 2				2	2		1			5	5		2			1			18
<i>S. boydii</i> 4								1		1	4								6
<i>S. boydii</i> 5										1									1
<i>S. boydii</i> 8					1					1									2
<i>S. boydii</i> 10										1					1				2
<i>S. boydii</i> 11										1	1								2
<i>S. boydii</i> 12														1					1
<i>S. boydii</i> 13	1		1							1									3
<i>S. boydii</i> 14							1			1	2								4
<i>S. boydii</i> 18				1						1	1		1						4
<i>S. boydii</i> 19										2	1								3
<i>S. boydii</i> 20										1	6	1	1						9
<i>S. boydii</i> info										1									1
Total <i>S. boydii</i>	1	0	1	3	3	0	2	1	0	19	23	1	4	1	1	1	0	0	61
<i>S. dysenteriae</i> 1								1		1									2
<i>S. dysenteriae</i> 2				1			1			3	3							1	9
<i>S. dysenteriae</i> 3				2						2	4		1						9
<i>S. dysenteriae</i> 4										1	3								4
<i>S. dysenteriae</i> 12										2									2
<i>S. dysenteriae</i> 97-10607								1		2	3								6
Total <i>S. dysenteriae</i>	0	0	0	3	0	0	1	2	0	11	13	0	1	0	0	0	0	1	32
<i>S. sonnei</i> a				2	1			2		3	12			1			1		22
<i>S. sonnei</i> e					1														1
<i>S. sonnei</i> g	1	3		18	18	1	33	25	2	59	87	2	6	1		2	1	1	260
<i>S. sonnei</i> g (ONPG-)				4	5	1		4		14	19								47
<i>S. sonnei</i> info		1		18	17		18	23	4	39	61	2	2	3	1				189
Total <i>S. sonnei</i>	1	4	0	42	42	2	51	54	6	115	179	4	8	5	1	2	2	1	519
<i>S. flexneri</i> 1	1			3			5	2		12	10	1	1	3					38
<i>S. flexneri</i> 2		1		7	3	3	8	6	1	30	28		3	2		1		2	95
<i>S. flexneri</i> 3				1	2	1	4	1		15	8	1		1		1			35
<i>S. flexneri</i> 4					1	1	2	4		5	7	1	2						23
<i>S. flexneri</i> 6				5	10		1	1		9	22	1		3		2		1	55
<i>S. flexneri</i> nst				2			1	1		5	3			1					13
<i>S. flexneri</i> Y										3	1							1	5
<i>S. flexneri</i> info					1								1						2
Total <i>S. flexneri</i>	1	1	0	18	17	5	21	15	1	79	79	4	7	10	0	4	0	4	266
<i>S non sérogroupable</i>											2								2
Total <i>Shigella</i>	3	5	1	66	62	7	75	72	7	224	294	9	20	16	2	7	2	6	878

Tableau 22: Distribution des 258 souches de *Shigella* signalées comme importées en France au retour d'un séjour à l'étranger :

	Afrique noire	Afrique du nord	Amérique centrale	Amérique du sud	Amérique du nord	Asie	Europe	Total
<i>S. boydii</i> 1	2							2
<i>S. boydii</i> 2	4	1						5
<i>S. boydii</i> 4	1	2				1		4
<i>S. boydii</i> 8	0					1		1
<i>S. boydii</i> 12	0					1		1
<i>S. boydii</i> 19	2							2
<i>S. boydii</i> 20	2					1		3
<i>S. boydii</i> info	1							1
Total <i>S. boydii</i>	12	3	0	0	0	4	0	19
<i>S. dysenteriae</i> 1	1							1
<i>S. dysenteriae</i> 2	2		1					3
<i>S. dysenteriae</i> 3	3	1						4
<i>S. dysenteriae</i> 4	1							1
<i>S. dysenteriae</i> 12	1							1
<i>S. dysenteriae</i> 97-10607	2							2
Total <i>S. dysenteriae</i>	10	1	1	0	0	0	0	12
<i>S. sonnei</i> a	0	1	2	2				5
<i>S. sonnei</i> g	24	23	1			19	1	68
<i>S. sonnei</i> g onpg-	10	9						19
<i>S. sonnei</i> info	19	13		5		4	1	42
Total <i>S. sonnei</i>	53	46	3	7	0	23	2	134
<i>S. flexneri</i> 1	8	3		1		2		14
<i>S. flexneri</i> 2	23	5		4				32
<i>S. flexneri</i> 3	6	1	1			2		10
<i>S. flexneri</i> 4	5	3		1				9
<i>S. flexneri</i> 6	13	7			1	1		22
<i>S. flexneri</i> nst	2	1				1	1	5
<i>S. flexneri</i> Y	0					1		1
Total <i>S. flexneri</i>	57	20	1	6	1	7	1	93
Total <i>Shigella</i>	132	70	5	13	1	34	3	258

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

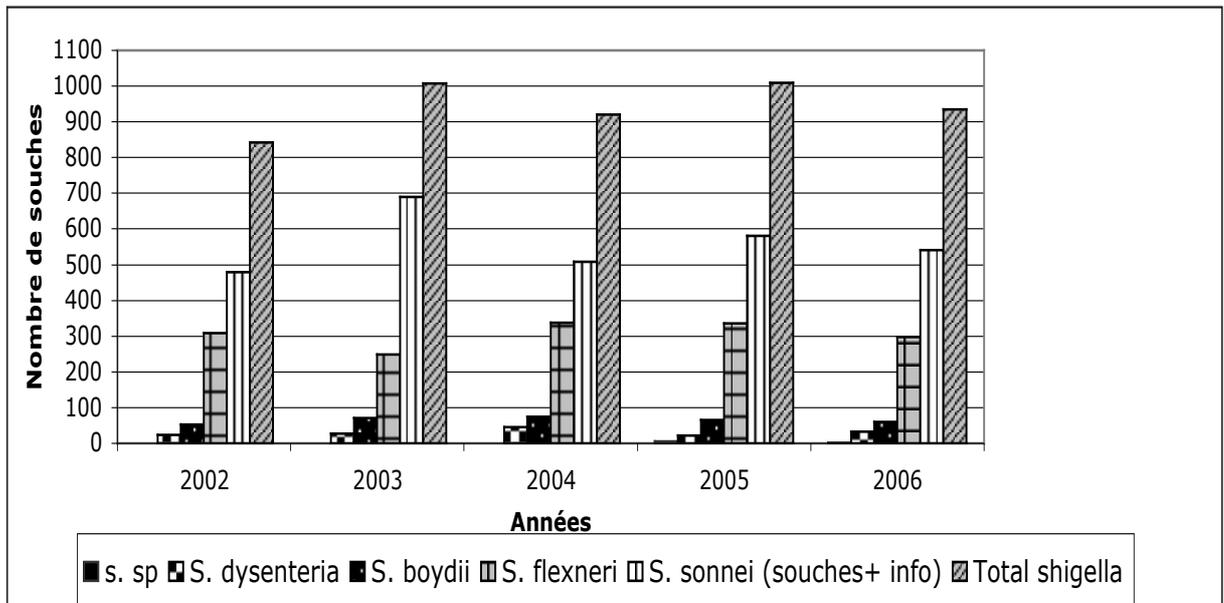
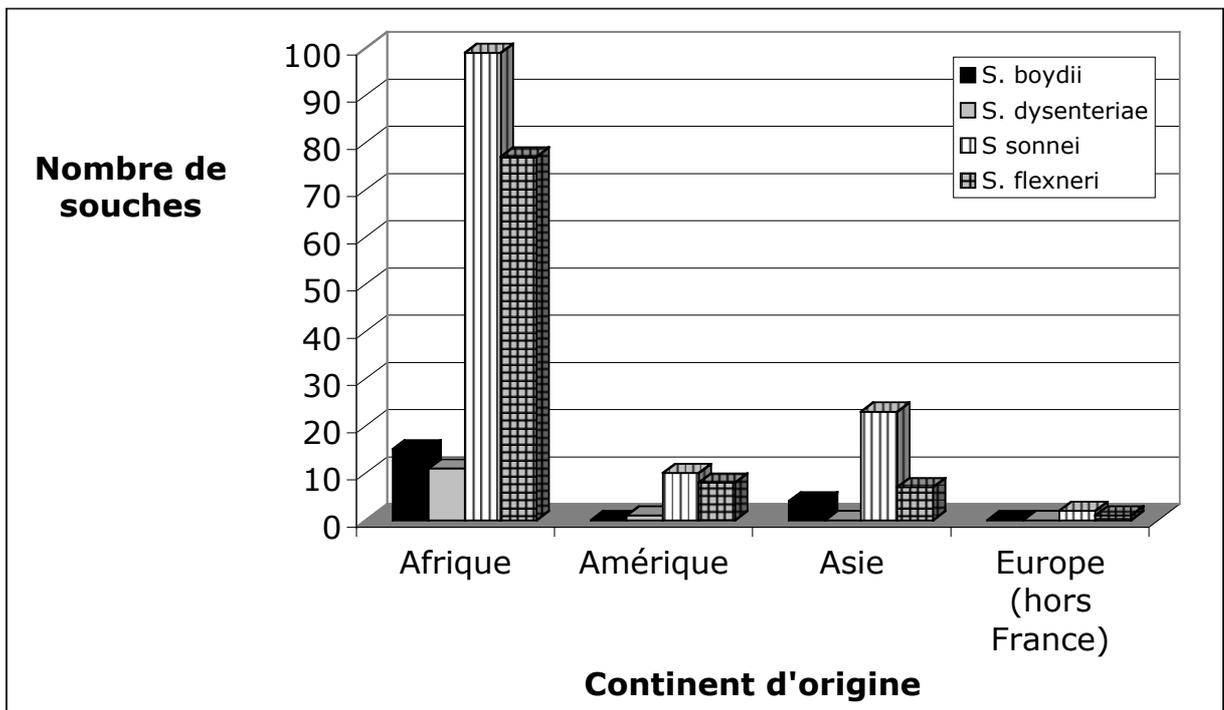


Figure 9 : Distribution des souches de *Shigella* contractées à l'étranger en 2006 (selon le continent d'origine)



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

Une fiche de renseignements spécifique au CNR de *E. coli* et *Shigella* doit accompagner chaque souche ou prélèvement reçu au CNR. 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 Syndrome Hémolytique et Urémique 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 a signalé l'épidémie de *Shigella sonnei* à Auxerre le 9/11/06 et l'apparition de souches résistantes à l'amoxicilline le 20/12/06. Un programme de surveillance mensuelle des *Shigella* par sérotype et par département est à l'étude.

- 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.

- 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 continuera 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 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 »

E- Collaboration avec des partenaires internationaux :

- Réseau des Institut Pasteur :

Les Instituts Pasteur du réseau tels que ceux de République Centrafricaine ou du Sénégal, nous envoient quelques souches à sérotyper chaque année.

Une collaboration, avec l'Institut Pasteur de Saint Petersburg (Russie), a permis la formation d'une personne au CNR pour le typage et la caractérisation des gènes de virulence de 42 souches d'origines diverses.

Une collaboration, avec l'Institut Pasteur de Casablanca (Maroc), a permis, grâce à la venue de 2 doctorants au CNR, le typage et la caractérisation des gènes de virulences de 220 souches d'origine alimentaire en provenance du Maroc afin d'évaluer la proportion de différents *E. coli* pathogènes chez différents fournisseurs de viande et dans différents types d'aliments.

- 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. Quarante-cinq souches de fruits de mer et 52 souches de viandes ont été sérotypées et analysées pour la recherche de gènes de virulence.

- Essai de puce à ADN en collaboration avec le Dr Josée Harel de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe au Québec, Canada. Cette puce réalisée par l'équipe du Dr Harel permet la détection de gènes de pathogénicité, de gènes d'antibiorésistance ainsi que de certains gènes spécifiques de sérotypes d'*E. coli*. Ces puces ont été testées dans notre laboratoire.

3-2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes 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 2005, vis-à-vis des antibiotiques suivants :

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

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résistance (tableau 23)

Tableau 23: Résistance des souches aux antibiotiques (%)

	AMX	CFM	ROC	SXT	CIP
Sérotype O157 H7 (n=14)	0	0	0	0	0
Sérotypes non O157 (n=18)	37	0	0	12,5	4, 3

En raison des fortes concentrations

intraluminales de l'azithromycine, les CMI de l'azithromycine ont été déterminées vis à vis des souches isolées de 2005 par la méthode du E-test (Tableau 24).

Tableau 24: CMI des souches STEC à l'azithromycine

Azithromycine	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	Range (mg/l)
Sérotype O157 H7 (n=14)	6	8	3 - 16
Sérotypes non O157 (n=18)	12	32	6 - >256

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

La sensibilité des 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 17 souches de ECM (tableau 25).

Tableau 25 : résultats de l'étude de sensibilité à 4 antibiotiques

Antibiotique	CMI (µg/ml)			% Résistance
	Range	50%	90%	
Amoxicilline	0,5->32	4	>32	41
Céfotaxime	≤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

Un antibiogramme a été réalisé en 2006 sur toutes les souches de *Shigella*. Les résultats sont présentés dans le tableau 26.

- **Tableau 26 : Pourcentage de souches de *Shigella* résistantes aux antibiotiques.**

	nbr de souches testées / nbr de souches reçues	AMX	CRO	CAZ	K	GM	NA	CIP	C	TE	SSS	TMP	SXT
<i>Shigella boydii</i>	60/60	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	15,0	51,7	63,3	56,7	51,7
<i>Shigella dysenteriae</i>	32/32	65,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	59,4	87,5	71,9	68,8	65,6
<i>Shigella flexneri</i>	265/265	60,0	0,0	0,0	3,0	0,4	5,3	1,5	52,1	72,8	64,2	60,4	56,6
<i>Shigella sonnei</i>	333/333	14,4	0,3	0,0	1,2	0,3	6,3	4,5	1,5	70,9	74,2	92,2	82,3
Shigella total	692/692	34,5	0,1	0,0	1,7	0,3	5,9	2,9	24,9	70,8	69,4	75,9	69,1

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

Pour la kanamycine (K) et la ciprofloxacine (CIP), sont considérés comme résistantes, les souches résistantes et intermédiaires.

Précédemment, la surveillance de la résistance des *Shigella* était axée sur 2 antibiotiques : amoxicilline et cotrimoxazole. Depuis août 2006 et de façon rétroactive sur toutes les souches

de *Shigella* de l'année 2006 identifiées au CNR, un antibiogramme plus complet est réalisé (16 antibiotiques testés).

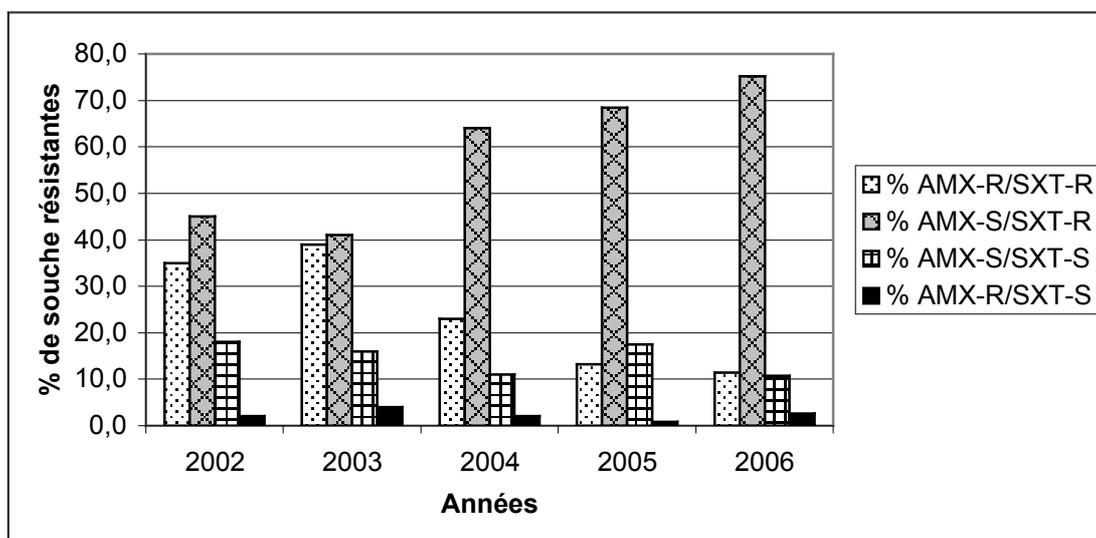
L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Dans certains cas, la méthode du E-test est utilisée pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Tableau 27 : Bilan des tendances de résistance à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) des *S. sonnei* g :

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

R= résistant, S= sensible

Figure 10 : Histogramme des tendances de résistance à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) des *S. sonnei* g :



R= résistant, S= sensible

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

Épidémie chez des familles de gens du voyage dans la région d'Auxerre

Cette épidémie a touché plusieurs foyers au sein d'une communauté de gens du voyage tout d'abord dans la région d'Auxerre (89) puis de Bar-le-Duc (55), après contamination lors d'un passage à Auxerre. Une enquête sur place a permis de relier ces 2 épidémies et le CNR a reçu 12 souches du CH d'Auxerre et 6 souches du CH de Bar-le-Duc. La première souche a été reçue au laboratoire comme un cas isolé le 3/11/06 et identifiée *Shigella sonnei* g le 7/11/06. Par la suite, 3 autres souches ont été reçues le 7/11/06 cette fois signalées en infection collective avec 5 cas. Cette infection collective a été signalée à l'InVS le 9/11/06 et l'épidémie a été suivie par le sérotypage de toutes les souches par agglutination, galerie biochimique pour déterminer le biotype et antibiogramme. L'antibiogramme réalisé par le CH et le contrôle antibiogramme réalisé au CNR ont permis de voir apparaître une résistance à l'amoxicilline chez 4 cas d'une même famille dans la région d'Auxerre. L'apparition de cette résistance a été signalée à l'InVS le 20/12/06.

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 systématiques de tous les cas de Syndrome Hémolytique et Urémique 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* est 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.
- 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 à un atelier de travail dans le cadre du PTR179 « Diagnostic d'urgence des diarrhées sanglantes » la réalisation de travaux pratique et cours théorique sur l'identification de *E. coli* et *Shigella* (I. Filliol, F. Grimont)
- Participation à l'enseignement universitaire sur *E. coli* intestinaux et extraintestinaux (E.Bingen et P.Mariani-Kurkdjian): Aux étudiants de 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 Novembre 2006 (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 2006 :

- Melle Samira BADRI (Maroc)	16 août au 13 novembre 2006
- Mme Laila BENSMAIL (Maroc)	7 au 23 novembre 2006
- M. Nour Eddine CHAOUQY (Maroc)	8 au 28 novembre 2006
- Mme Nozha COHEN (Maroc)	4 au 21 avril 2006
	9 au 16 octobre 2006
- Mme Maria MAKAROVA (Russie)	22 janvier au 14 avril 2006

- **DEA et thèses** (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian) :
 - 2 DEA – Paris XI - 2006:

Céline Plainvert : Implication du locus codant l'antigène somatique O45 dans la virulence de *Escherichia coli* O45:K1:H7 responsable de méningite néonatale.

Chantal Peigne : Rôle du plasmide pS88 dans la virulence de la souche de *Escherichia coli* S88 (O45:K1:H7) responsable de méningite néonatale.

- 2 thèses de 3^{ème} cycle en cours : Véronique Houdouin et Philippe Bidet

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 (importances des gène 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).

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 spécifique tel que le cours de bactériologie médicale. 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 à des consultations OMS telles que celle du 25-27 septembre 2006 à Genève « consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases ».

- Participation au groupe de travail de l'AFSSA sur l'analyse quantitative du risque STEC en France (laboratoire associé)

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

*** Puce à ADN *E. coli***

Avec la collaboration du Dr Josée Harel de la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe au Québec, Canada. Nous avons pu tester 15 souches d'*E. coli* sur des puces sur lame de verre confectionnées par l'équipe Canadienne. Ces puces sont composées de sondes de 70-mer qui permettent la détection de 234 gènes de pathogénicité, 31 gènes responsables de résistances aux antibiotiques, 10 gènes spécifiques de différents sérogroupes O et 5 gènes conservés servant de contrôles positifs, des gènes d'autres espèces servant de contrôles négatifs. Les résultats des 15 souches testées dans notre laboratoire ont été comparés avec les résultats obtenus par PCR au CNR. Tous les gènes détectés par PCR étaient bien détectés par la puce, et de nombreux autres gènes non recherchés au laboratoire ont pu être identifiés. Pour les souches dont une sonde pour le sérotype O était sur la puce (tel que O157), l'identification du sérotype a aussi été possible.

*** Le CNR-IP participe grâce à un projet ACIP au « diagnostic d'urgence de la dysenterie et des diarrhées hémorragiques. Ce projet est étroitement lié à un nouveau projet PTR 179 : « 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 :

- de la dysenterie à *Shigella dysenteriae* 1

- de *S. flexneri* 2a
- de *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 sérotype 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

* Étude de *S. dysenteriae* 1

- Le CNR a travaillé sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques du bacille de Shiga (*S. dysenteriae* 1). Il a été mis en évidence que le support de la résistance était chromosomique par l'intermédiaire d'un îlot de pathogénicité (PAI) de 66 kb. Au sein de ce PAI existe une zone (SRL) contenant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.
- Une grande étude sur l'histoire évolutive de *S. dysenteriae* 1 par MLST et détection de mutations ponctuelles (SNPs) est en cours de réalisation.

7- Liste des publications et communications 2006 :

Publications :

Espié E, Grimont F, Vaillant V, Montet MP, Carle I, Bavai C, de Valk H, Vernozy-Rozand C. O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:992-8.

Espié E, Vaillant V, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Martin-Schaller R, De Valk H, Vernozy-Rozand C. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect.* 2006;134:143-6.

Bercion R, Demartin M, Recio C, Massamba PM, Frank T, Escriba JM, Grimont F, Grimont PA, Weill FX. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 causing dysentery outbreaks in Central African Republic, 2003-2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:1151-8.

Houdouin V, Bonacorsi S, Bidet Ph, Bingen-Bidois M, Barraud D and E. Bingen. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:748-751.

Bonacorsi S, Houdouin V, Mariani-Kurkdjian P, Mahjoub-Messai F, Bingen E. Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. *J. Clin Microbiol.* 2006; 44: 1156-1158

Micol R, Lortholary O, Jaureguy F, Bonacorsi S, Bingen E, Lefort A, Memain N, Bouchaud O, Larroche C. *Escherichia coli* native valve endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:401-403

Congrès nationaux ou internationaux en relation avec le CNR

Mailles A., P.Mariani-Kurkdjian, C.Vernozy-Rozand, F.Grimont, N. Pihier, B. Horen, V. Doireau, B.Llanas, E.Espié, V.Vaillant. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of ground beef, France, 2005. Communication affichée, VTEC 2006, Melbourne

Espié E, P.Mariani-Kurkdjian, F.Grimont, N.Pihier, V.Vaillant, S.Francart, H.de Valk, C. Vernozy-Rozand. Shigatoxin producing *Escherichia coli* O26 infection and unpasteurised cows cheese, France, 2005 . Communication affichée, VTEC 2006, Melbourne

Mailles A. , Vernozy-Rozand C. , Mariani-Kurkdjian P. , Rappoport M. , Pihier N. , Dufraisse M.P. , Charron M. , Perret F. , Horen B. , Doireau V. , Neau J., Grimont F., Espié E., Vaillant V. Epidémie d'infections à *E. coli* O157:H7 due à la consommation de viande hachée surgelée, France 2005. Communication orale aux Journées Nationales d'Infectiologie à Bordeaux, Juin 2006.

8- Programme de travail 2007-2008

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 diagnostic :

- 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.
- Évaluation d'un kit de détection de la présence de shigatoxine sur selles et souches (Kit Meridian : ImmunoCard STAT® EHEC). Ce kit permettrait de vérifier la présence de toxine de façon simple après enrichissement sur bouillon.

- Évaluation directement sur les selles d'une méthode de diagnostic de routine déjà validée sur les souches et qui permet de mettre en évidence les gènes des Shigatoxines, le gène *eae* et le gène *ipaH* selon la technologie DNA-STRIP (RD). Ce test étant rapide, il permettrait de ne pas initier une antibiothérapie en cas de diarrhée sanglante si le test est positif afin de prévenir la survenue d'un SHU. Cette évaluation a fait l'objet d'un article soumis pour publication
- 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 (Enter-Net) afin d'identifier la circulation de clones en Europe ou 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**. par le projet PTR 179 ; afin de permettre un diagnostic direct dans les selles des principaux pathogènes tels que *S. dysenteriae* 1, *S. flexneri* 2a, *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** : 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'École 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

- **Des systèmes de détection de gènes** codant différentes toxines ou d'adhésines ont été mises au point, et sont utilisées au CNR afin de reconnaître d'autres pathovars pouvant apparaître en France. Leur adaptation en multiplexe est en cours de réalisation, de même que la possibilité d'étudier d'autres gènes. Les puces à ADN pourraient nous donner une idée plus précise du type de gènes important dans les souches pathogènes.

- **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 *E. coli* et comparaison à la base de profils de référence.** Cette base comporte actuellement 218 profils correspondant à 147 sérogroupes O, et 141 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 évalué en parallèle pour, si possible, remplacer la technique des profils de restriction du gène codant la flagelline 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 547 profils pour 92 différents sérotypes H de *E. coli*. De nombreuses séquences seront encore nécessaires pour avoir un typage précis.

• **Le CNR-IP a un projet de collaboration de puce à ADN avec la Plate-forme CNR/Santé publique**

Ce projet vise l'identification rapide de différents pathogènes bactériens et viraux ainsi que leurs profils génétiques de virulence et antibio-résistance par l'utilisation d'une puce à ADN haute densité. Ce projet a été développé en collaboration avec la société **Affymetrix** dans le cadre d'un financement du National Institute of Health de trois ans.

Les membres de notre CNR sont régulièrement sollicités dans le cadre de ce projet en qualité d'expert pour valider la liste comprenant les gènes d'identification d'espèces, et ceux impliqués dans la pathogénicité (toxines, ...), et fournir des souches caractérisées génétiquement afin de tester et valider les différentes générations de cette puce à ADN.

• **Mise au point d'une technique de PCR en temps réel (Laboratoire Associé)**

Cette mise au point a 3 objectifs principaux:

- Rendu plus rapide des résultats pour la recherche de *E. coli* producteur de Shiga-toxines permettant au clinicien une décision d'instaurer ou non une antibiothérapie à un enfant atteint d'une diarrhée sanglante fébrile :

- Une quantification du nombre de gènes de Shiga-toxines présents dans les selles chez les enfants hospitalisés pour SHU. Ce nombre de gènes pourrait être corrélé à la gravité des symptômes et à l'évolution de la maladie ;

- Certains antibiotiques (fluoroquinolones) joueraient un rôle dans la mobilisation et la multiplication des bactériophages porteurs des gènes de Shiga toxines aboutissant à leur transfert à d'autres *E. coli* et donc à l'extension du nombre de STEC. Cette hypothèse pourra être confirmée par une étude *in vitro* transfert de gène de souches productrices à des souches initialement non productrices en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique. Une quantification par PCR en temps réel du nombre de gènes rapporté au nombre de bactéries avant et après contact avec l'antibiotique y sera associée.

• **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 ou 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 nécrotisant (*cnf1*)
- 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 (DEA -Paris X I- Céline Plainvert)

- 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.

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. La caractérisation des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques est en cours de réalisation au CNR-IP.

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 41 profils pour 31 sérogroupes de référence et sera complétée avec les nouveaux sérogroupes de *Shigella*

- Une base de données de profils de restriction de la **région « H » (gène *fliC*)** déjà constituée près de 150 profils pour 35 sérogroupes de référence (O) et sera complétée avec les nouveaux sérogroupes de *Shigella*

Le **typage flagellaire** (flagelline cryptique chez *Shigella*) est étudié en parallèle par **séquençage du gène *fliC***. Les premiers résultats montrent la présence de différente séquence d'insertion empêchant le séquençage complet du gène. La mise en œuvre de séquençage interne est en cours de mise au point pour obtenir des séquences complètes.

- **L'étude moléculaire de nouveaux sérogroupes de *Shigella***
- **Les mécanismes de résistance aux antibiotiques**

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

ANNEXE

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

Disponibles sur le site web du CNR :

<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreocr/ecolishig/ecolishig-pratique.html>

.



Fiche de renseignement devant accompagner chaque envoi (téléchargeable à partir de notre site internet : <http://www.pasteur.fr/sante/dra/cadre/cnr/ecolishig-index.html>)

Laboratoire : (Une seule adresse complète et lisible du laboratoire expéditeur)

Nom complet :

N° et rue :

Code postal : |_|_|_|_|_| Ville :

Cachet du laboratoire :

E-mail : TEL :

Escherichia coli

• **SOUCHE** de *E. coli* (cocher les cases choisies)

Détection de facteurs de virulence chez *E. coli* Sérotypie

Orientation : Entéropathogène Entérohémorragique (SHU)

Entéroinvasif Agent de diarrhée Méningite ou portage K1

Uropathogène Septicémique autres _____

• **SELLE** pour *E. coli* entérohémorragique (Syndrome Hémolytique et Urémique)

examen réalisé après entente préalable **

• **SERUM** POUR SERODIAGNOSTIC (Syndrome Hémolytique et Urémique)

J0 J +15

Shigella

• **INFORMATION** pour *Shigella sonnei* seulement

(aucune souche envoyée) ONPG Rhamnose

• **SOUCHE** de *Shigella*, Identification antigénique

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.

Renseignements épidémiologiques ESSENTIELS

▲ Prélèvement humain

- **Nom, prénom** du patient ou Réf.

Age |_|_| ou date de naissance |_|_|_|_|_| Sexe : F/M

Code postal du domicile du patient |_|_|_|_|_|

Statut : Malade Porteur inconnu

- **Origine** : Sang Selles Urines LCR Vaginal

Autre.....

- **Manifestations cliniques** : Diarrhée Diarrhée sanglante SHU

Asymptomatique inconnu autre

- **Date d'isolement** : |_|_|_|_|_| et précisions :

- **Cas isolé** Voyage récent (pays, date)

- **Cas groupés** : Nombre de cas :

Hôpital Familial Ecole Crèche Colonie de vacances

T.I.A.C. Autres

- **Voyage récent** - **Aliment suspecté** :

Prière de joindre une copie de l'ANTIBIOGRAMME

▲ Prélèvement non humain

(facturé, Informations au 01 45 68 87 39)

- Référence de la souche :

- 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 *E. coli* et *Shigella*

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).



**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).