



## Rapport d'activité 2011

**Centre National de Référence des *Escherichia coli* / *Shigella***  
**Unité des Bactéries Pathogènes Entériques**  
**Institut Pasteur**

et

**Laboratoire associé**  
**Service de Microbiologie**  
**Hôpital Robert - Debré - Paris**

**Responsables :**

**CNR-IP :**

François-Xavier Weill

Malika Gouali

Téléphone : 0145688339 (Secrétariat)

Tél : 0145688345

Tél : 0145688344

Télécopie : 0145688837

[colishig@pasteur.fr](mailto:colishig@pasteur.fr)

[francois-xavier.weill@pasteur.fr](mailto:francois-xavier.weill@pasteur.fr)

[malika.gouali@pasteur.fr](mailto:malika.gouali@pasteur.fr)

**Laboratoire associé (HRD) :**

Edouard Bingen

Patricia Mariani-Kurkdjian

Stéphane Bonacorsi

Téléphone : 0140032340 (Secrétariat)

Tél : 0140032340

Tél : 0140032341

Tél : 0140035792

Télécopie : 0140032450

[edouard.bingen@rdb.aphp.fr](mailto:edouard.bingen@rdb.aphp.fr)

[patricia.mariani@rdb.aphp.fr](mailto:patricia.mariani@rdb.aphp.fr)

[stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr](mailto:stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr)

## SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	4
1.1 Missions et Objectifs du CNR.....	5
1.2 Résumé des activités 2011 .....	6
1.3 Les équipes .....	7
1.3.1 Le CNR-ECS : Effectif / Qualification du Personnel .....	7
1.3.2 Le laboratoire associé (LA-RD) : Effectif / Qualification du Personnel.....	8
1.3.3 Démarche qualité.....	8
1.4 Les locaux et équipements .....	10
1.4.1 CNR-ECS (Institut Pasteur) .....	10
1.4.2 Le LA-RD (Hôpital Robert Debré) .....	11
2. ACTIVITES D'EXPERTISE .....	12
2.1 Capacité technique du CNR .....	12
2.1.1 Techniques du CNR-ECS.....	12
a. Techniques d'identification du genre, des espèces et des sous-espèces.....	12
c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR .....	13
d. Techniques de sous-typage des <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> .....	14
e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> .....	14
f. Sérodiagnostic lors des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU) .....	14
2.1.2 Techniques du LA-RD .....	15
a. Diagnostic/identification .....	15
b. Typage .....	15
c. Sensibilité aux anti-infectieux : .....	15
2.1.3 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles .....	15
2.1.4 Collection de souches .....	15
2.1.5 Techniques recommandées par le CNR-ECS-LA : .....	16
2.2 Activités d'expertise pour l'année 2011 .....	17
2.2.1 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ECS-LA en 2011 ...	17
2.2.2 Bilan des activités concernant les EHEC .....	18
a. Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou souches .....	18
b. Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2011 .....	18
c. Analyse des souches de <i>E. coli</i> d'origine humaine productrices de Shiga-toxines..	19
d. Analyse des variants des gène <i>stx</i> (LA-RD).....	21
e. Analyse des prélèvements (selles et/ou souches) dans l'entourage de patients .....	21
f. Sérotypage moléculaire des souches STEC non sérotypables .....	22
g. Sérodiagnostic des SHU (CNR-ECS) .....	23
h. Comparaison des résultats obtenus à partir des sérums et des selles ou des souches chez un même patient .....	24
2.2.3 Bilan des activités concernant les <i>E. coli</i> extra-intestinaux (LA-RD) .....	25
a. Etude des facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> responsables de méningites .....	25
b. Etude des facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> extra-intestinales responsables de pathologies autres que les méningites .....	26

2.2.4 Bilan des activités du CNR-ECS concernant les <i>Shigella</i> .....	28
a. Analyse des 570 souches reçues de France métropolitaine en 2011 .....	28
b. Souches reçues des DOM-TOM .....	32
c. Souches reçues de l’Etranger .....	32
d. Bilan des feuilles d’informations reçues au CNR-IP (226 fiches pour 219 patients) .....	32
2.2.5 Analyse de l’évolution des tendances de l’activité du CNR ECS-LA .....	33
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>35</b>
3.1 Surveillance de l’évolution et des caractéristiques des infections .....	35
3.1.1 Réseau partenaire .....	35
3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances .....	35
3.1.3 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l’InVS.....	38
3.1.4 Collaboration avec des partenaires nationaux exerçant dans le domaine animal, alimentaire ou dans l’environnement .....	39
3.1.5 Collaboration avec des partenaires internationaux.....	39
3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux .....	39
3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches STEC (LA-RD).....	39
3.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E.coli</i> responsables de pathologies extra-intestinales (LA-RD).....	40
3.2.3 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de <i>Shigella</i> (CNR-ECS) .....	41
a. Surveillance globale .....	41
b. Surveillance de <i>Shigella sonnei</i> .....	43
c. Résistances émergentes chez <i>Shigella spp</i> .....	44
3.3 Détection et investigation des cas .....	45
3.3.1 Cas probables identifiés en France en lien avec l’épidémie de EHEC O104:H4 en Allemagne (mai-juin 2011) .....	45
3.3.2 Epidémie de SHU et de diarrhée sanglante due à <i>E. coli</i> O104:H4 dans le sud-ouest de la France (juin 2011) .....	46
3.3.3 Epidémie à <i>E. coli</i> O157:[H7] sorbitol positif dans le nord de la France en lien avec la consommation de viande hachée de bœuf .....	47
3.3.4 Epidémie de SHU dans le Finistère (été 2011) .....	49
3.3.5 Cas groupés de SHU à <i>E. coli</i> O104:H4 chez des touristes français de retour de Turquie (septembre 2011) .....	49
3.3.6 Cas groupés de diarrhées sanglantes à Strasbourg – septembre 2011.....	51
3.3.7 Regroupement temporo-spatial de SHU à Caen – Eté 2011 .....	52
3.3.8 Cas sporadiques de SHU liés à <i>E. coli</i> O104:H4 survenus après l’épidémie de Bègles .....	53
3.3.9 Autres types d’investigations .....	54
3.4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens.....	55
<b>4. ALERTE.....</b>	<b>56</b>
<b>5. ACTIVITES D’INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....</b>	<b>56</b>
5.1 Enseignement / formation .....	56
5.2 Information et conseil aux biologistes et praticiens .....	57
5.3 Diffusion des données de surveillance à l’InVS .....	57
5.4 Activités d’expertises après du Ministère chargé de la santé, de l’InVS, la DGS, l’AFSSA, l’OMS .....	58

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-ECS-LA.....	59
6.1 <i>E. coli</i> .....	59
6.2 <i>Shigella</i> .....	59
7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2011.....	62
7.1 Publications nationales .....	62
7.2 Publications internationales.....	62
7.3 Communications internationales .....	63
8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013 .....	64
8.1 Apporter une expertise microbiologique : .....	64
8.1.1 Infections à <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques.....	64
8.1.2 <i>E. coli</i> responsables d'infections extra-intestinales (LA-RD).....	65
8.1.3 Infections à <i>Shigella</i> .....	66
8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS).....	67
8.3 Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel .....	70
9. COLLABORATION AVEC LA PF8 .....	71

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Missions et Objectifs du CNR

Les objectifs du Centre National de Référence des *E. 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-ECS répartit les missions entre le CNR de l'Institut Pasteur (CNR-IP) et le laboratoire associé au CNR situé à l'Hôpital Robert Debré (RD).*

*Pour une meilleure compréhension du présent rapport, le terme CNR-ECS-LA sera utilisé pour décrire des activités ou des données communes aux deux laboratoires et les termes CNR-ECS et LA-RD seront utilisés séparément pour décrire les activités spécifiques de chacun des laboratoires.*

*Les missions du CNR-ECS-LA se répartissent de la manière suivante :*

### *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 Shiga-toxines (STEC) dans les laboratoires de diagnostic (CNR-ECS-LA).
- Contribuer à la surveillance des infections à STEC (*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en confirmant l'infection à STEC par sérologie (CNR-ECS), et/ou mise en évidence de STEC dans les selles (CNR-ECS-LA).
- Participer, en lien avec l'InVS, à l'investigation de cas groupés par typage des souches et comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources 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 et l'ANSES.
- Contribuer à des études de recherche appliquée (CNR-ECS-LA).
- Contribuer avec l'InVS aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen (Enter-Net) notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE (CNR-ECS-LA).
- 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 (CNR-ECS-LA).

### *Pour les E. coli responsables de méningites néonatales : (LA-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 (léthalité, 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'InVS tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, cas groupés, formes cliniques ou souches inhabituelles, etc.

### ***Pour les Shigella (CNR-ECS)***

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

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

## **1.2 Résumé des activités 2011**

Au cours de l'année, un total de **2725 souches, 998 prélèvements de selles et 611 sérums** ont été analysés au CNR-ECS-LA, ce qui représente une augmentation de 17,2 % de son activité par rapport à l'année 2010 au cours de laquelle, le CNR-ECS-LA avait reçu, 2325 souches, 405 prélèvements de selles et 421 sérums.

L'analyse de cette augmentation en tenant compte de l'activité *E. coli* ou *Shigella* et du type de prélèvement montre que celle-ci concerne l'activité *E. coli* (1978 souches, 998 prélèvements de selles et 611 sérums par rapport à 1550 souches, 405 prélèvements de selles et 421 sérums en 2010, ce qui représente dans chacun des cas, une augmentation d'activité respectivement de 27,6%, de 146,4% et de 45,1%.

Cette augmentation importante s'explique en grande partie par la survenue en France, en 2011, à la même période (juin-juillet) d'une part, d'une épidémie à *E. coli* O157:[H7] dans le Nord Pas-de-Calais, ayant touché 18 enfants âgés entre 6 mois et 10 ans qui ont développé un SHU et d'autre part, de la survenue de 15 cas de SHU identifiés en Gironde dus à une souche de *E. coli* O104:H4 productrice de Shiga-toxine et de bêta-lactamase à spectre élargi, génétiquement reliée à la souche *E. coli* O104:H4 responsable de l'épidémie allemande.

En effet, la large médiatisation de ces épidémies (nombreuses sollicitation des médias, conférences, communiqués de presse), le déclenchement d'une alerte européenne (EWRS), l'approfondissement des enquêtes et des investigations pour connaître l'origine de la contamination ont eu, pour effet, de limiter l'ampleur des épidémies survenues en France en identifiant rapidement la source des contaminations et dans un deuxième temps de sensibiliser les laboratoires de biologie médicale sur l'intérêt de surveiller les infections aux *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

Les nombreuses sollicitations de nos laboratoires par téléphone pour avoir des informations sur les modalités d'envoi des prélèvements au CNR, des conseils sur le diagnostic des infections à EHEC et la demande de souches d'EHEC pour la mise en place de techniques PCR attestent également de la volonté des laboratoires de biologie médicale d'améliorer la détection de ces infections.

Quant à l'activité *Shigella*, elle a connu une légère baisse puisque le CNR a reçu 670 souches et 219 fiches d'informations contre 761 souches et 250 fiches d'informations en 2010 soit un total de 889 souches répertoriées au CNR-ECS pour l'année 2011 contre 1011 en 2010 ce qui représente une diminution de 13,7 %.

Cette diminution se retrouve également au niveau du nombre de laboratoires ayant expédié des fiches d'informations sur l'isolement de souches de *Shigella* puisque l'on passe de 686 laboratoires en 2009 à 329 en 2011 soit une diminution de 52 %. Une des raisons probables expliquant cette diminution pourrait être la parution de l'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2009 obligeant les laboratoires de biologie médicale à être accrédités par le COFRAC selon la norme NF EN ISO/CEI 15189 pour la totalité de leurs activités d'ici 2016. La mise en place d'un système de management de la qualité dans les laboratoires ayant un coût important a entraîné la mutualisation des moyens des laboratoires privés en créant des plateaux techniques et des laboratoires multi-sites réduisant ainsi le nombre de structures participant à la veille microbiologique. Cette diminution est aussi confirmée pour l'inscription au CNQ en bactériologie générale (2253 laboratoires participants au 2<sup>ème</sup> semestre 2011 contre 3380 au 1<sup>er</sup> semestre 2009, -33%, données AFSSAPS)

## **1.3 Les équipes**

### **1.3.1 Le CNR-ECS : Effectif / Qualification du Personnel**

#### **- Effectif par catégories de fonctions**

L'Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques (UBPE) a été créée en 2010 et a remplacé le laboratoire des Bactéries Pathogènes Entériques. Cette unité est dirigée par le Dr François-Xavier Weill et regroupe les CNR *E. coli* et *Shigella*, *Salmonella*, Vibriens et choléra et le CCOMS des *Salmonella*. Le personnel du CNR *E. coli* et *Shigella* se répartissant de la façon suivante:

Nom - Prénom	Libellé Emploi	ETP
M. WEILL François-Xavier	Médecin biologiste	0,30
Mme GOUALI Malika <sup>1</sup>	Pharmacienne, microbiologiste	-
Melle MACE Muriel	Pharmacienne biologiste	0,80
M. LE HELLO Simon	Pharmacien biologiste	0,10
Mme CARLE Isabelle	Technicienne supérieure de laboratoire	1,00
Mme LEJAY-COLLIN Monique	Technicienne supérieure de laboratoire	1,00
Mme Corinne RUCKLY	Technicienne supérieure de laboratoire	1,00
Mme GOMIS Dakatheare	Secrétaire	0,25
Mme HAY Laurence <sup>2</sup>	Secrétaire	
Mme Colette PRETESAC	Agent de Laboratoire	0,15
<b>TOTAL ETP</b>		<b>4,30</b>

<sup>1</sup> : Arrivée de Malika Gouali au CNR le 03/07/2011 en remplacement de Melle Muriel Macé

<sup>2</sup> : Arrivée de Laurence Hay au CNR le 01/03/2011 en remplacement de Mme Dakatheare GOMIS

- **François-Xavier Weill**, Médecin-biologiste, Doctorat d'Université, ancien Interne et Assistant Hospitalier Universitaire.
- **Malika Gouali**, pharmacienne microbiologiste, DESS en sécurité sanitaire des aliments.
- **Simon Le Hello**, Docteur en pharmacie, DES de Biologie Médicale, DEA, ancien interne de l'AP-HP.

### 1.3.2 Le laboratoire associé (LA-RD) : Effectif / Qualification du Personnel

#### - Effectif par catégories de fonctions

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

### 1.3.3 Démarche qualité

#### CNR-ECS

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections AFSSAPS, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

En septembre 2010, un état des lieux des dispositions qualité des CNR et des services supports (Service QSE-DD, Pôle équipements, Département Achats, DRH,...) de l'Institut Pasteur assurant un appui efficace et maîtrisé aux CNR a été dressé.

La Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 partielle des CNR (envoi des actes de candidatures pour l'accréditation avant le 31/10/2012 et obtention de l'accréditation ISO 15189 partielle avant le 31 mai 2013) et complète (avant le 1/11/2016) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

#### Projet ISO 15189 des CNR de l'Institut Pasteur :

##### ➤ Bilan 2011 :

1. Projet piloté par le service QSE-DD en collaboration avec la Direction Médicale et la Coordination des Centres de Référence
2. Appui méthodologique par des consultants extérieurs possédant une expérience des démarches qualité d'accréditation ISO 15189
3. Discussion avec la direction générale de la santé concernant les activités spécifiques des CNR par rapport à des LBM « classiques »
4. Mise en place des dispositions en matière de gestion du matériel, RH, gestion documentaire et achats
5. Acquisition d'un SGL pour la gestion des non conformités, actions d'amélioration et audits qualité pour les CNR

##### ➤ Perspectives 2012 :

1. Sélection des CNR avec une avancée significative dans le déploiement du plan d'action, pour le dépôt de dossier de candidature au COFRAC en octobre 2012 : Mars 2012
2. Lancement d'un groupe de travail technique pour mutualiser la méthodologie en matière de vérification/validation de méthode : mars 2012
3. Audit blanc ISO 15189 : juillet 2012
4. Revue de direction : octobre 2012
5. Dépôt de dossier au COFRAC : octobre 2012

#### Le LA-RD

Le Laboratoire Associé s'est également engagé dans une démarche Qualité pour ses activités spécifiques qui sont réalisées au sein du service de Microbiologie de l'hôpital Robert Debré qui a également choisi comme référentiel, le GBEA. De plus, en raison de l'obligation faite aux laboratoires de biologie de respecter la norme NF EN ISO 15189, le service de Microbiologie ainsi que le Pôle de Biologie de l'hôpital Robert Debré sont entrés dans la démarche d'accréditation pour 2013. Des procédures spécifiques à l'activité du laboratoire associé ont été rédigées : procédures générales, procédures pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

## **1.4 Les locaux et équipements**

### **1.4.1 CNR-ECS (Institut Pasteur)**

Le CNR ECS, le CNR des Vibrions et du Choléra, le CNR et le CCOMS des *Salmonella* font partie de l'Unité d'Expertise et de Recherche des Bactéries Pathogènes Entériques dont les locaux se situent au 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biotop.

Les activités du CNR-ECS ont lieu dans les pièces suivantes :

- Pièce bureaux\* : directeur du CNR (pièce 4a), directeur adjoint (pièce 3a), secrétariat (pièce 03/04), et 3 techniciennes (pièce 5) avec un ordinateur par personne.
- Laboratoire P2 avec PSM (pièce 06/09)\*
- Une petite pièce climatisée pour les PCR et électrophorèses en agarose et en champ pulsé (pièce partagée avec les autres CNR et laboratoires de l'étage)

\* Commun aux autres CNR de BPE.

Pour réduire les coûts, le circuit des souches est commun pour tous les CNR de l'unité BPE (ouverture des paquets en P2+, enregistrement des informations épidémiologiques au secrétariat, local commun pour conserver les souches, pièce matériels et chambre froide communes).

#### **Matériel, équipement de la structure actuelle**

- Équipement habituel d'un laboratoire de bactériologie : enceintes climatiques (+4°C, 30°C, 37°C, réfrigérée de 4° à 30°C)
- Postes de sécurité microbiologique de type II (x 2)
- Matériel d'électrophorèse en agarose et d'hybridation, capture électronique d'images\*
- Thermocycleurs (x 5)\*
- Appareil d'électrophorèse en champ pulsé Biorad DRIII (x2)\*
- Système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan (I2A) avec logiciel d'épidémiologie\*
- Équipement informatique : 4 ordinateurs Macintosh en réseau protégé, sauvegardes des données assurées sur serveur, 3 PC\*
- Congélateurs à -80°C (x4) \*
- Laverie et autoclaves. \*

\* Partagé avec les autres CNR de l'Unité

#### **Moyens extérieurs à la structure :**

- Collaboration importante avec la Plateforme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique de l'Institut Pasteur (PF8) pour les différents projets de recherche impliquant du séquençage à haut débit (Illumina) et MLST.
- Structures transversales notamment (CIBU, Plate-forme génomique Puces à ADN, séquences, Coordination épidémiologique), mais aussi les structures disponibles sur le campus (animaleries, etc....) et nécessaires aux missions du CNR.
- Réseau informatique de l'IP.

- L'assistance d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé en routine au CNR depuis novembre 2009 pour enregistrer les analyses et éditer les résultats.

#### **1.4.2 Le LA-RD (Hôpital Robert Debré)**

Le Laboratoire Associé est situé dans le Service de Microbiologie de l'Hôpital Robert Debré. Il comprend :

- Une pièce pour l'étude des selles avec un poste de sécurité microbiologique pour l'isolement et l'identification des *E. coli* (local dédié au Laboratoire Associé).
- Une pièce pré PCR avec poste de sécurité PCR (locaux communs).
- Une pièce climatisée dédiée aux électrophorèses en agarose et au champ pulsé (locaux communs).
- Une chambre froide (locaux communs).
- Bureaux médicaux.

#### **Matériels et Equipements de la structure actuelle**

Matériel appartenant au laboratoire :

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

En commun :

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

#### **Moyens extérieurs à la structure**

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

## 2. ACTIVITES D'EXPERTISE

Actuellement, la seule connaissance du sérotype d'une souche de *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 technique du CNR

#### 2.1.1 Techniques du CNR-ECS

##### a. Techniques d'identification du genre, des espèces et des sous-espèces

###### *Bactériologie classique*

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

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose et du Glycérol. Production d'o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG), de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (indole) et bêta-glucuronidase. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

###### Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisées en routine

- La recherche par **PCR du gène *iudA*, codant pour la 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 *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 de l'Unité BPE.

## **b. Techniques d'identification des sérotypes de *E. coli* et *Shigella***

### Le sérotypage classique

#### **\* *Shigella***

Le **sérotypage complet** par agglutination permet d'identifier 20 sérotypes de *S. boydii*, 17 sérotypes de *S. dysenteriae* et 6 sérotypes de *S. flexneri*. Les souches de *S. sonnei* sont divisées en 5 biotypes en fonction des caractères biochimiques. Les sérums utilisés sont commercialisés par Eurobio ou Sifin, quelques sérums spécifiques sont fabriqués dans l'Unité BPE.

#### **\* *E. coli***

Le **sérotypage partiel** est effectué avec les antisérums O1, O2, O18, O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164 et H7. Il est très difficile d'obtenir des sérums spécifiques de bonne qualité pour le sérotypage des *E. coli*. Les sérums utilisés proviennent de différents fournisseurs (Eurobio, Sifin). Chaque sérum subit un contrôle qualité à réception.

### Le sérotypage moléculaire

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*). Pour les *E. coli stx+* et *Shigella*, le sérotypage moléculaire est utile quand les souches ne sont pas sérotypables (nouveaux sérotypes en l'absence d'antisérums spécifiques ou quand les souches sont autoagglutinables [rough]).

- **Le sérotypage moléculaire O des *E. coli* et *Shigella* par *rfb*-RFLP**, mis au point dans l'Unité BPE (Pr P.A.D. Grimont) consiste en une analyse des profils de restriction obtenus par amplification de la région génétique *rfb* (antigène O, environ 20kb) puis restriction enzymatique avec *MboI*. Les profils de restriction ainsi obtenus sont comparés à une base de données dans le logiciel BioNumerics contenant 250 profils déterminés pour 148 sérogroupes O de *E. coli* et 35 sérotypes de *Shigella*. Les antigènes O déterminés de façon moléculaire sont notés R (et non « O »).

- **Le sérotypage moléculaire de l'antigène H par séquençage du gène *fliC***. Il permet de déterminer le « H » moléculaire (nommé « F ») par comparaison à la base de données de l'Unité BPE qui comprend les séquences de 92 sérotypes de *E. coli* et près de 40 sérotypes de *Shigella*.

## **c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR**

La panoplie des gènes de pathogénicité présents chez *E. coli* est imposante. La détection par PCR (multiplex ou simplex) de tous ces gènes s'effectue sur souches isolées ou directement sur les selles. Les gènes suivants sont recherchés en priorité :

- Les gènes *stx* (*vt*) codant pour les Shiga-toxines ou Verotoxines chez les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ou EHEC) ou encore chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1).

Il nous est possible de sous-typer le gène *stx* en 6 variants par un système de PCR et restriction enzymatique.

- Le gène d'adhésion *eae* codant pour une adhésine « d'attachement et d'effacement aux cellules épithéliales, l'intimine responsable de la lésion ». Ce gène est reconnu comme facteur de pathogénicité important chez les STEC et les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC).

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

En fonction du contexte (suspicion d'épidémie liée à un des multiples pathovars entériques ou lors d'un tableau clinique sévère) plusieurs autres gènes de virulence peuvent être recherchés par PCR. Il s'agit des gènes de toxine *st* et *lt* des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des gènes *astA* et *aggR* des *E. coli* entéroaggrégants (EAgEC), des gènes codant pour les adhésines *PAP*, *SFA*, *AFA* chez des souches responsables de diarrhées ou uropathogènes (UPEC), des gènes *cnf1* et *aer* chez des souches responsables de septicémie.

#### **d. Techniques de sous-typage des *E. coli* et *Shigella***

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée PulseNet). Méthode de référence à l'heure actuelle pour le sous-typage.

#### **e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *E. coli* et *Shigella***

- L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et détermination de la CMI à tous les antibiotiques par la méthode E-test (BioMérieux),

- L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support).

#### **f. Sérodiagnostic lors des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU)**

Seule la recherche dans le sérum des patients d'anticorps anti-LPS (IgA et IgM) dirigés contre un panel de 23 sérogroupes de *E. coli* fréquemment associés à la survenue de SHU est effectuée. Le diagnostic se base sur la recherche d'anticorps anti-LPS car le taux d'anticorps anti-Shiga-toxine est trop faible pour être détectable.

La technique utilisée est celle du « **line-blot** » avec 8 LPS purifiés (O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157 de *E. coli*) ou 24 LPS (O1, O2, O4, O14, O26, O29, O55, O91, O103, O104, O105, O111, O113, O115, O118, O127, O128, O136, O145, O153, O157, O163, O164 de *E. coli* et O30 de *Salmonella*) est utilisée. La recherche est effectuée sur 2 sérums : le 1<sup>er</sup> prélevé le plus tôt possible après le début du SHU (J0) et le 2<sup>ème</sup> prélevé environ 15 jours après (J15). Cette méthode est très utile dans la surveillance des SHU quand la bactérie n'est plus retrouvée dans les selles.

### 2.1.2 Techniques du LA-RD

Elles sont, pour la plupart identiques, à celles du CNR –ECS :

#### a. Diagnostic/identification

- Mise en culture sur milieux spécifiques : Mac Conkey Sorbitol Cefixime Tellurite (BioMérieux), Milieu chromogène pour entérobactéries et milieu de Drigalski
- Agglutination par des antisérums (BioRad et Sifin)
- Identification biochimique sur galerie API20E (BioMérieux)
- PCR spécifique des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA*
- Groupage phylogénétique

#### b. Typage

- Sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145. Les sérotypes O104 et O121 ont été rajoutés à cette PCR multiplex
- RAPD, Rep -PCR
- PFGE
- Puces : 77 cibles et 11 sérotypes

#### c. Sensibilité aux anti-infectieux :

étude par méthode de diffusion en milieu gélosé et méthode du E-test pour la détermination de la sensibilité à l'azithromycine

### 2.1.3 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Lors d'investigations d'épidémies, la plupart des techniques exposées précédemment sont utilisables pour le suivi de l'épidémie. Pour *E. coli*, nous réalisons en priorité, le sérotypage (par agglutination ou moléculaire) et effectuons la recherche des gènes de virulence. Par la suite, l'empreinte génétique des souches est réalisée par PFGE.

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE 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.

### 2.1.4 Collection de souches

Au CNR-ECS, toutes les souches de *E. coli* et *Shigella* ont été conservées au laboratoire, sur milieu gélosé sans glucose, depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs dizaines de milliers de souches conservées avec leurs informations microbiologiques et cliniques (si disponible). Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances

aux antibiotiques. Les souches importantes sont en plus conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , parmi ces souches, on trouve :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *E. coli*.
- 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,
- les souches de *S. dysenteriae* de type 1.
- les souches de *Shigella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques.

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

Au LA-RD à l'hôpital Robert Debré, les souches sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une pièce dédiée. Plusieurs collections de souches humaines sont ainsi disponibles depuis 1987 :

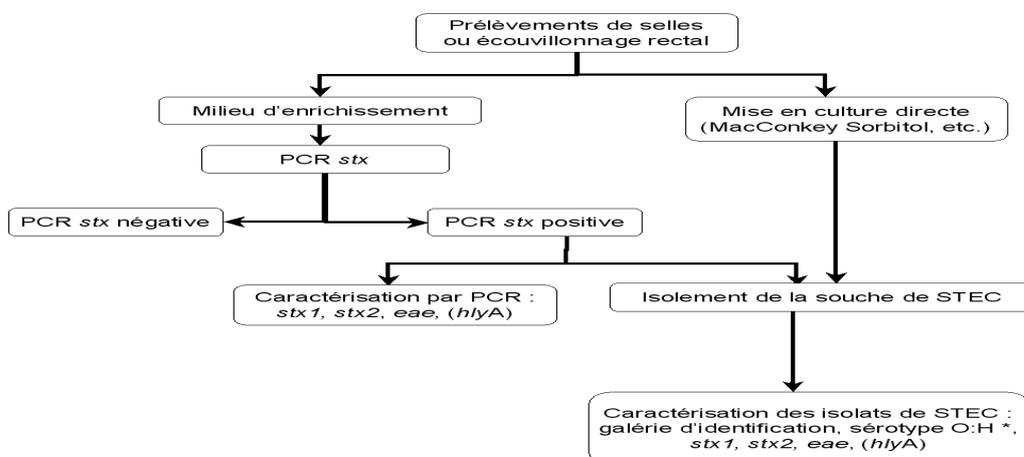
- Les souches de *E. coli* responsables de SHU de l'enfant.
- Les souches de *E. coli* responsables de méningites néonatales
- Les souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires de l'enfant.

### 2.1.5 Techniques recommandées par le CNR-ECS-LA :

Concernant le diagnostic des EHEC : un article a été rédigé en 2008 par l'InVS et le CNR-ECS-LA (E. Espié, P. Mariani-Kurkdjian, I. Filliol, V. Vaillant et H. de Valk. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France : Aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Revue Francophone des Laboratoires. Mars 2008, n°400, p59-65). Cet article, toujours d'actualité permet aux laboratoires d'avoir toutes les informations concernant la détection des souches STEC et particulièrement le schéma d'isolement décrit ci dessous (figure 1).

Concernant les *Shigella*, la caractérisation biochimique suivie de la séroagglutination reste la seule méthode diagnostique utilisable en laboratoire.

Figure 1: Procédures d'isolement des souches STEC :



## 2.2 Activités d'expertise pour l'année 2011

### 2.2.1 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ECS-LA en 2011

En 2011, un total de 1978 souches de *E. coli*, 998 prélèvements de selles, 611 sérums et 747 souches de *Shigella* ont été analysés au CNR-ECS-LA

La répartition des différents types de prélèvements, leur origine et leur nombre sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous :

**Tableau 1 :**

Activité	Type de prélèvement	CNR-IP	LA-RD	Total
<i>E. coli</i>	Selles	328	670	998
	Sérums	611	-	611
	<b>Souches humaines</b>			
	Selles	696	212	908
	Rectal/anal/Ecouvillon rectal	12		12
	Biopsies	30	23	53
	Liquide gastrique	7		
	LCR		20	20
	Liquide péricardique	2		2
	Sang	31	18	95
	Urines	44	12	56
	Pus	3		3
	Prélèvement vaginal	2		2
	Prélèvement néonatal		2	2
	Prélèvement urétral	2		2
	Liquide péritonéal	1	1	2
	Liquide articulaire	1		1
	Non précisé	18		18
	Pièces anatomiques post-mortem		7	7
	<b>Sous-total prélèvements humains</b>	<b>849</b>	<b>340</b>	<b>1189</b>
	<b>Autres origines</b>			
	Origine animale/alimentaire	3	45	48
	Origine industrielle	4		4
Etudes	112		112	
<b>Total</b>	<b>968</b>	<b>1010</b>	<b>1978</b>	
<i>Shigella</i>	Souches	747	-	747

L'activité globale pour E. coli en 2011, par rapport à 2010 a connu une augmentation de 37,6% qui se répartissait de la façon suivante :

- Souches : +27,6% (1978 en 2011 versus 1550 en 2010)
- Selles : +146% (998 prélèvements en 2011 versus 405 en 2010)
- Sérums : +45,1% (611 en 2011 versus 421 en 2010)

## 2.2.2 Bilan des activités concernant les EHEC

### a. Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou souches

Les symptômes donnant lieu à une recherche d'EHEC, lorsqu'ils étaient précisés, se répartissaient de la manière suivante :

**Tableau 2** : répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou un envoi de souche

Symptômes observés	Souches/selles	Sérums
Diarrhée glairo-sanglante ou diarrhée sanglante	639	30
SHU/ suspicion de SHU	264	188
Diarrhée/gastro-entérite aigue	390	26
Diarrhée de retour	39	29
Entourage de SHU	29	
Colite hémorragique	25	
Contrôle post azithromycine	15	
Diarrhée chronique	15	
Consommation aliment TIAC	13	
Microangiopathie thrombotique	13	
Inconnu	7	
Choc septique/toxinique	10	
Insuffisance rénale aigue	5	
Divers	4	
Pyélonéphrite	4	

### b. Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2011

Sur les 998 prélèvements de selles reçus, la recherche directe des gènes de pathogénicité par amplification génique *in vitro* a été positive dans 199 cas ce qui représente 19,9 % de la totalité des selles.

Les résultats de la PCR directe sur les selles ont été corrélés aux résultats obtenus après culture de celles-ci.

Pour 27 patients, les PCR directes étaient positives mais aucune souche n'a pu être isolée.

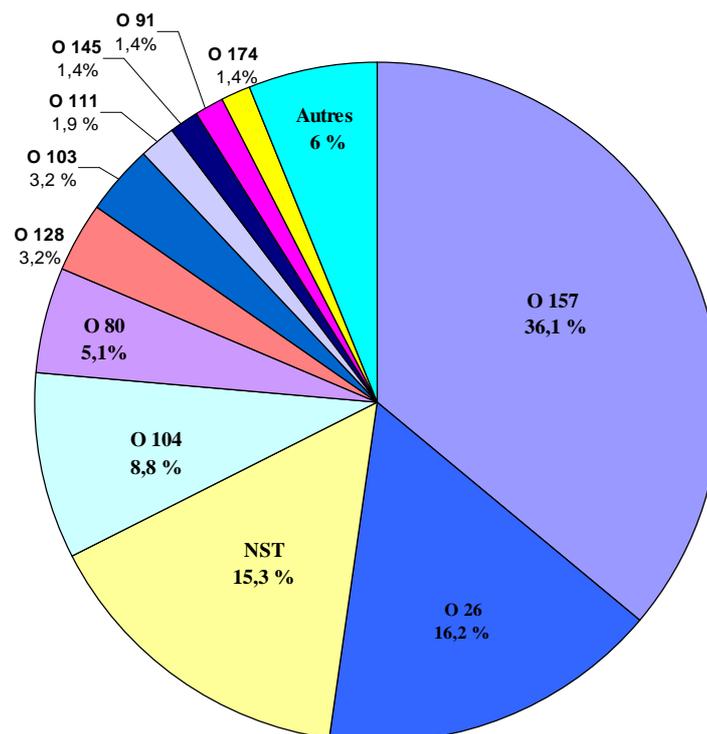
De plus, afin d'étudier la prévalence des EHEC dans la population d'enfants consultant aux urgences de l'hôpital pour une diarrhée glairo-sanglante, la recherche de STEC a été systématiquement réalisée par le LA-RD sur les selles aqueuses et les selles glairo-sanglantes soit, 564 selles sur les 1867 selles reçues dans le service de Microbiologie pendant cette période.

Trois souches ont été isolées chez des enfants présentant une diarrhée glairo-sanglante n'ayant pas évolué vers un SHU.

### c. Analyse des souches de *E. coli* d'origine humaine productrices de Shiga-toxines

La présence des gènes codant les Shiga-toxines ou verotoxines *Stx1*(VT1), *Stx2* (VT2) et variants a été recherchée dans tous les prélèvements et/ou souches reçus. Le gène *eae*, codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC, a également été recherché.

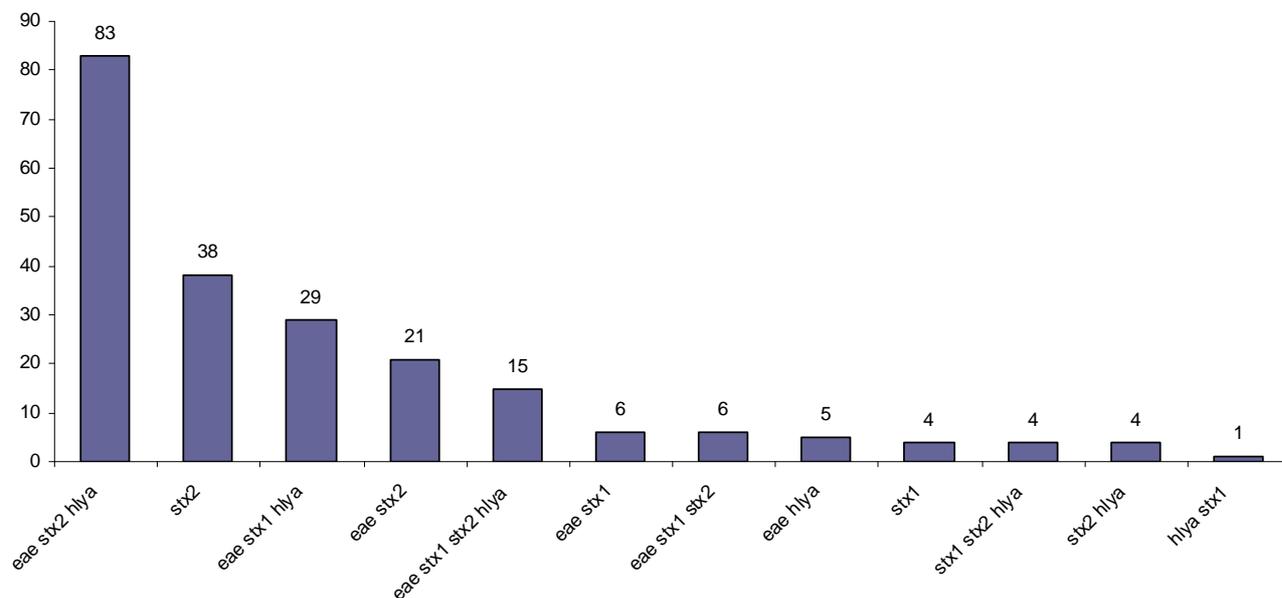
En ne considérant qu'une souche par patient, **216** souches STEC ont été mises en évidence. Le sérotype O157 reste le sérotype majoritairement isolé en France (36%). La prévalence des différents sérotypes est représentée dans la **figure 2** ci-dessous :



NST : non sérotypables (43 souches)

### Figure 2 : prévalence des différents sérotypes des souches d'EHEC isolés en 2011

L'analyse des profils de virulence montrent que le profil le plus souvent retrouvé est le profil *eae+stx2+hlyA*. La distribution des différents profils est indiquée dans la **figure 3** :



**Figure 3 : Analyse de la distribution des profils de virulence des souches EHEC en 2011**

La répartition des souches STEC en fonction du sérotype et du profil de virulence est représentée dans le **tableau 3**.

Le profil *eae+stx2+hlyA* est principalement retrouvé pour le serotype O157 (73% des souches)

**Tableau 3 : Répartition des souches STEC par sérotype et profil de virulence**

Profil de virulence	Autres sérotypes	O104	O111	O121	O128	O145	O157	O26	O177	O55	O91	O2	O18	O113	O148	O174	O80	O118	O103	Total
<i>eae hlyA</i>	2						1	1			1									5
<i>eae stx2</i>	4			1	5	2	5	2									2			21
<i>Eae stx1</i>			1					4		1										6
<i>eae stx1 hlyA</i>	2		2				1	20											4	29
<i>hlyA stx1</i>								1												1
<i>Stx1</i>	4																			4
<i>eae stx1 stx2 hlyA</i>							9	3										1	2	15
<i>eae stx1 stx2</i>			1				5													6
<i>stx1 stx2 hlyA</i>	3				1															4
<i>eae stx2 hlyA</i>	8			1		1	57	4	1				1				9 <sup>a</sup>		1	83
<i>stx2 hlyA</i>	4															1 <sup>a</sup>				4
<i>stx2</i>	9	19			1						2	2		1 <sup>a</sup>	1	2 <sup>a</sup>				38
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>78</b>	<b>35</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>216</b>

<sup>a</sup>: sérotype obtenu par sérotypage moléculaire

#### d. Analyse des variants des gène *stx* (LA-RD)

La mise en évidence des variants des gènes a été réalisée sur 114 souches isolées en 2011  
Le variant *stx2a* a été retrouvé dans 65 % des souches. Les résultats de la recherche des variants *stx* sont reportés dans le **tableau 4** ci-dessous :

Variants	NST	O104	O111	O121	O128	O145	O157	O26	O2	O18	O55	O80	O103
<i>stx1a</i>			1				6	7			1		1
<i>stx2a</i>	5	14		2			40	3	2	1		5	2
<i>stx2c</i>	3				1	1	1						
<i>stx2d</i>	2				1			1				6	1
<i>stx1a, stx2a</i>	1		1				4	1					

#### e. Analyse des prélèvements (selles et/ou souches) dans l'entourage de patients présentant un SHU (LA-RD)

La mise en évidence des STEC a été réalisée dans l'entourage de 19 cas de SHU soit 29 personnes prélevées. Seules les personnes vivant sous le même toit ont eu un prélèvement de selles. Les souches retrouvées (n=6) dans l'entourage présentaient le même profil de virulence que celle du cas de SHU de la même famille. Il s'agissait respectivement dans un cas, d'un parent et dans cinq cas de fratrie de patients présentant un SHU. Tous les cas contact ont reçu de l'azithromycine et aucun d'entre eux n'a évolué vers un SHU.

## f. Sérotypage moléculaire des souches STEC non sérotypables

Les résultats du sérotypage moléculaire de 43 souches de STEC isolées en 2011 sont présentés ci-dessous.

**Tableau 5** : résultats de sérotypage moléculaire des STEC non sérotypables (CNR-ECS)

Référence CNR-ECS	Référence LA-RD	Facteurs de virulence	Opéron O	<i>fliC</i>
2011-01043	-	stx1, stx2, VT, hlyA,	R174	F2
2011-04202		stx1, stx2, VT, hlyA,	NC1	F18
2011-10959		stx1, stx2, VT, hlyA,	NC2	F2
2011-00943		stx1, VT,	R117	en cours
2011-07129		stx1, VT,	R117	F7
2011-11661		stx1, VT,	R117	F7
2011-08058		stx1, VT, aer,	R117	F7
2011-02233		stx2, eae, VT, hlyA,	R121	F19
2011-04787		stx2, eae, VT, hlyA,	NC3	F2
2011-05896		stx2, eae, VT, hlyA,	R121	F19
2011-06743		stx2, eae, VT, hlyA,	NC3	F2
2011-11868		stx2, eae, VT, hlyA,	R80	F2
2011-04204		stx2, VT,	R148	F8
2011-06123		stx2, VT,	NC4	F14
2011-06133		stx2, VT,	NC5	F31
2011-07497		stx2, VT,	R113	F21
2011-10426		stx2, VT,	R59	F19
2011-11869		stx2, VT,	R174	F21
2011-02762		stx2, VT, hlyA,	R43	F2
2011-04205		stx2, VT, hlyA,	R174	F21
2011-11647		stx2, VT, hlyA,	R171	F25
Ec11-12226	32030	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12224	32196	stx2	R 174	F21
Ec11-12214	32239	stx2 hlyA	NC6	F16
Ec11-12225	32295	-	R 6a	F1
Ec11-12232	32466	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12235	32590	-	R5a/R71	F1
Ec11-12239	32482	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12237	32496	stx2	R 174	F21
Ec11-12230	32659	stx2 Bglu	R 113	F4/F17
Ec11-12227	32664	stx2 Bglu eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12238	32858	stx2 eae hlyA	NC7	F25
Ec11-12228	32877	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12213	33004	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12216	33069	stx2 eae	R 128	F2
Ec11-12215 <sup>a</sup>	33070	Stx2 eae	R128	F2
Ec11-12220	33094	stx1 stx2 eae hlyA	R5a / R71	NA
Ec11-12217 <sup>a</sup>	33127	Stx2 eae hlyA	R80	F2
Ec11-12218	33135	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12219	33150	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12221	33181	stx2 hlyA	NC8	F27
Ec11-12212	33161	stx2 eae hlyA	R 80	F2
Ec11-12229	32942	stx2 hlyA	NC9	F16

<sup>a</sup> : souches isolées chez le même patient ayant deux profils de virulence différents

NC1 à NC9 : profils non connus, NA : non amplifié

Pour 9 souches, l'identification du « O » par sérotypage moléculaire n'a pas été possible en raison de l'absence de profils similaires dans la base de données moléculaires. Les sérotypes les plus fréquemment retrouvés sont les sérotypes R80 (n=11) et R174 (n = 5) suivis du R117 (n=4) qui était le sérotype majoritaire en 2010.

### g. Sérodiagnostic des SHU (CNR-ECS)

Un total de 611 sérums, reçus de différents services pédiatriques et de laboratoires de biologie médicale participant au réseau de surveillance des SHU, ont été analysés au CNR-ECS. Parmi ces sérums, 608 (455 patients) de France métropolitaine, deux de Guyane parmi lesquels, un envoyé par le centre hospitalier Andrée Rosemon de Cayenne, l'autre envoyé via le laboratoire Cerba et un sérum de Mamoudzou (Mayotte). Les anticorps anti-LPS appartenant aux deux classes d'immunoglobulines IgA et IgM dirigés contre les 8 sérogroupes de *E. coli* les plus fréquemment responsables de SHU (O157, O26, O55, O91, O103, O111, O128 et O145) ont été recherchés. Cette recherche a été complétée par le séro groupe O104 dès l'apparition des premiers cas de l'épidémie à *E. coli* O104:H4.

Le CNR-ECS recommande deux prélèvements à 15 jours d'intervalle (J0 étant le jour du diagnostic du SHU). Pour les 139 patients pour lesquels, au moins deux sérums ont été prélevés :

- 34 ont présenté deux sérums ou plus positifs (24,5 %)
- 17 ont présenté un premier sérum positif et un deuxième négatif (12,2)
- 88 ont présenté deux sérums ou plus négatifs (63,3 %)

En considérant un sérum par patient (le positif en cas de discordance), le bilan des résultats obtenus est le suivant :

**Tableau 6: Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS**

	< 1 an		1-5 ans		6-15 ans		16-64 ans		> 65 ans		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<b>IgM + IgA O91</b>				1		1					<b>2</b>
<b>IgM + IgA O111</b>			2								<b>2</b>
<b>IgM + IgA O103</b>			4		1						<b>5</b>
<b>IgA O145</b>						1	1				<b>2</b>
<b>IgM + IgM O145</b>			1			1		3		1	<b>6</b>
<b>IgM + IgA O104</b>				2			1	6		1	<b>10</b>
<b>IgA O157</b>			1	1							<b>2</b>
<b>IgM O157</b>			1	1		1			1		<b>4</b>
<b>Ig M + IgA O157</b>	1	1	17	16	10	4	3	11		2	<b>65</b>
<b>IgM + IgA O26</b>				1							<b>1*</b>
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>26</b>	<b>21</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>98</b>

M= Masculin, F= Féminin, \* : sérum positif simultanément pour O157 et O26

98 sérums sur les 458 (21,4%) ont révélé la présence d'anticorps anti-LPS, avec des anticorps anti O157 pour 72,5 % des sérums positifs (71 patients).

L'année 2011 a été marquée par l'apparition d'un nouveau sérotype *E. coli* O104 responsable de l'épidémie survenue à Bègles en mai 2011. Le nombre de sérologies positives à ce sérotype représente 10,2% des sérologies positives totales.

#### **h. Comparaison des résultats obtenus à partir des sérums et des selles ou des souches chez un même patient**

Pour les patients pour lesquels, le CNR-ECS-LA a reçu un prélèvement de selles ou une souche isolée de *E. coli* et un sérum. La concordance des résultats entre, d'une part le diagnostic direct (recherche des gènes de virulence *stx* dans les selles ou les souches ainsi que leur sérotypage) et le diagnostic sérologique est résumée dans le tableau 7 ci-dessous :

**Tableau 7 : corrélations entre les résultats de sérologie et d'analyses des selles ou souches**

	O157	O103	O145	O111	O104	O91	O26	O80	NST	Total
Sérologie +/selles +	38	2			11					51
Sérologie +/selles -	21	3	4	2	2	1				33
Sérologie -/selles +	6	2	2	1	3		6	8	28	56
Sérologie -/selles -										97
Total										237

NST : non sérotypable

La sérologie ne permettant que la détection des sérotypes O26, O55, O91, O103, O104, O111, O128, O145 et O157, les résultats étaient concordants pour 51 patients.

Les discordances notées étaient les suivantes :

- Dans 33 cas, la sérologie était positive alors que la recherche des EHEC dans les selles était négative, ce qui peut s'expliquer d'une part par un prélèvement tardif des selles à distance de la diarrhée prodromique et d'autre part par l'administration d'un traitement antibiotique stérilisant les selles.

- Dans 56 cas, la sérologie était négative et la recherche d'EHEC dans les selles était positive. Sur les 56 cas, 28 souches étaient non sérotypables et ont fait l'objet d'un sérotypage moléculaire.

39 patients dont les selles étaient positives pour *stx*, n'ont pas bénéficié d'une sérologie *E. coli*

**Tableau 8 : répartition des souches EHEC isolées de patients n'ayant pas bénéficié d'une sérologie *E. coli***

Sérotype	O157	O103	O145	O111	O104	O91	O26	O80	NST	Total
Selles positives/absence de sérologie	21	1			7		10			39

## 2.2.3 Bilan des activités concernant les *E. coli* extra-intestinaux (LA-RD)

### a. Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E. coli* responsables de méningites

Le LA-RD a reçu 20 souches de *E. coli* isolées de LCR. 17 souches ont été isolées chez des enfants atteints de méningites. Quatre nouveau-nés étaient âgés de moins de 3 jours, 6 étaient âgés de 4 à 28 jours et 6 avaient plus d'un mois. Une souche a été isolée chez un enfant de deux ans, deux souches chez deux adultes et une chez un patient d'âge inconnu.

Les résultats de l'étude des facteurs de virulence sont présentés dans le **tableau 9** et permettent d'incrémenter la base de données française des méningites à *E. coli*.

**Tableau 9 : Facteurs de virulence des *E. coli* responsables de méningites (LA-RD)**

n° RDB	age (j) /PL	groupe phylogénétique	PCR nonaplex wzy	PCRK1	Phage K1	agg K1	Phage K5	ChuA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iroN
325	47 ans	D	neg		-	-		+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
326	9	B2	neg		+	+		+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
327	6	B21	O2	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	+	+
328	103	B21	O1	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	-	II	-	-	+
329	3	B2	neg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	III	+	+	+
330	5	B2	neg	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
331	11	B21	O18	+	+	+		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
332	61	B2	neg	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
333	21	B2	neg	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
334	40	B2	neg	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
335	11	D	neg	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336	?	D	O45	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
337	2 ans	B2	O6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II	+	-	+
338	3 mois	B21	O1	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	-	II	-	-	+
339	3	B21	O1	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
340	33	B21	O1	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
341	5 mois	D	O7	+	+	+		+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
342	2	D	neg	-	-	-		+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
343	78 ans	D	neg	-	-	-		+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
344	2	B21	neg	+	+	+		+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+

**b. Etude des facteurs de pathogénicité des souches de *E.coli* extra-intestinales responsables de pathologies autres que les méningites**

Le LA-RD a reçu 32 souches d'EXPEC non méningites isolées des prélèvements suivants

- hémocultures (n=18)
- urines (n= 12)
- placenta (n=1)
- liquide péritonéal (n=1)

Les caractéristiques de ces souches sont représentées ci-dessous dans le **tableau 10 ci-dessous** :

**Tableau 10 : Caractéristiques des souches de *E. coli* extra-intestinaux autres que ceux responsables de méningites**

n° RDB	Sexe	Age	origine du prélèvement	groupe phylogénétique	PCR nonaplex wzy	phage K1	aggl K1	ChuA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iroN
RDEx168	M	6 jours	hemoculture	B2			-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	II	+	-	+
RDEx169	F	1 jour	hemoculture	B2	neg		+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RDEx170	M	22 jours	hemoculture	B2			-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx177	F	84 ans	ecbu	B1			-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx178	M	5 jours	hemoculture	B1			-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx179	F	6 mois	ecbu	B1			-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx180	M	1 mois	ecbu	B2			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RDEx181	F	67 ans	hemoculture	A			-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx182	M		hemoculture	B2			-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II+III	+	-	+
RDEx183		11 jours	hemoculture	B21			+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
RDEx184	F		hemoculture	A			-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx185	F		ecbu	A			-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx186	F	1 jour	hemoculture	B2			-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	III	-	-	+
RDEx187		21 jours	hemoculture	B2			-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx188		40 jours	hemoculture	B2				+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx189	M	87 ans	hemoculture	B21	O18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
RDEx190	M	2 mois	ecbu	D			-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx191	M	2 mois	hemoculture	D			-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
RDEx192	M		ecbu	B2			-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
RDEx193	F	21 A	ecbu	A			-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RDEx194	M		hemoculture	B21	O18	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
RDEx195	M		hemoculture	B21			+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
RDEx196	M		ecbu	B21			+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
RDEx197	F		ecbu	B2			+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	III	+	-	+
RDEx198	M		hemoculture	A			-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx199	F	88 ans	hemoculture	B2			-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	II	-	-	-
RDEx200	F	13 ans	ecbu	B21			+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
RDEx201	F	1 jour	hemoculture	B2			+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
RDEx202	M	13 ans	liquide péritonéal	B1			-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RDEx203	M	7 jours	ecbu	B2			-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx204	F	27 jours	ecbu	B2			-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RDEx205	F	41 ans	placenta	B21			+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	II	-	-	-

## 2.2.4 Bilan des activités du CNR-ECS concernant les *Shigella*

Durant l'année 2011, le CNR-ESC a reçu et étudié 684 souches de *Shigella* envoyées comme appartenant au genre *Shigella* dont 679 souches d'origine humaine isolées chez 670 patients et 5 souches d'origine animale.

Sur les 679 souches d'origine humaine, 580 provenaient de France métropolitaine, 90 des DOM-TOM et 9 de l'étranger. Le nombre de souches de *Shigella* d'origine humaine isolées en France métropolitaine équivaut donc à 580 souches.

De plus, 226 fiches d'informations ont été envoyées au CNR-ECS pour signaler une infection à *Shigella*. Les 226 fiches concernaient 219 patients (7 fiches ayant été envoyées en deux exemplaires) et se répartissaient entre 218 fiches pour *Shigella sonnei* et une fiche pour *Shigella flexneri*)

En compilant les informations et souches et après élimination des doublons, des souches non humaines, de trois souches non cultivables et des souches adressées de l'étranger, un total de **792 souches de *Shigella* a été répertorié au CNR-ECS en 2011 dont 570 en France métropolitaine.**

### a. Analyse des 570 souches reçues de France métropolitaine en 2011

Les caractéristiques des 570 souches isolées chez 570 patients de France métropolitaine en 2011 sont résumées par sérotype dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 11 : *Shigella boydii* (36 souches pour 36 patients)**

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>	Epidémie <sup>b</sup>	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
1	6	12, 21, 44, 45, 56, 69		Afrique, Inde, Emirats Arabes Unis, Egypte
2	10	31, 44, 45, 58, 77, 78, 93	Familiale (2, 44, ?) Familiale (2,45, ?)	Maroc, Afrique, Sénégal, Togo
4	4	14,42,43,85		Togo, Bénin
8	2	21, 78		Inde
10	1	35		Pérou
12	1	95		
13	1	12		
14	6	56, 75, 76, 91, 92, 95		Burkina-Faso, Afrique
18	2	14, 92		Inde, Togo
19	2	75, 86		Cameroun
20	1	21		Soudan

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

**Tableau 12 : *Shigella dysenteriae* (16 cas pour 16 patients)**

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>	Epidémie <sup>b</sup>	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
2	6	06, 28, 44, 57, 92		Népal, Togo, Inde
3	5	16, 34, 59, 75, 94		Maroc, Congo
4	2	53, 72		
5	1	93		
12	1	77		
Sh 111	1	92		

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

**Tableau 13 : *Shigella flexneri* ( 237 souches pour 237 patients)**

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>	Epidémie <sup>b</sup>	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
1a	2	77, 78		
1b	45	13,14, 30, 31, 34, 35, 38, 39, 42, 49, 53, 54, 59, 62, 66, 67, 69, 75, 76, 78, 85, 87, 91, 92, 93, 94, 95	Familiale (03, 35, Congo) familiale ( ?, 78, ?) familiale ( ?, 91, ?)	Congo, Sénégal, Guinée, Algérie, Mali, Turquie, Népal, Afrique
2a	73	04, 12, 14, 17, 22, 28, 31, 33, 35, 44, 49, 51, 56, 57, 59, 61, 64, 66, 68, 69, 70, 75, 76, 78, 85, 86, 91, 92, 93, 94, 95,	Familiale ( ?, 44, Sénégal) Familiale ( ?; 91, Congo) Familiale ( ?, 75, ?)	Guadeloupe, Espagne, Europe, Sénégal (5), Afrique (2), Nigeria, RCA, Mauritanie, Congo, Algérie, Tunisie, Madagascar, Mali, Burkino-Faso (2), Soudan, Inde (5), Cambodge, Ethiopie, Cuba (2), République Dominicaine
2b	17	01, 13, 16, 29, 35, 49, 67, 69, 75, 77, 78, 88, 94, 95	Familiale ( ?, 16, Kenya) Familiale ( ?, 67, ?) Familiale (2, 75, ?)	Maroc (3), Sénégal, Cap Vert, Guinée, Kenya
3a	34	14, 27, 31, 34, 59, 66, 69, 74, 75, 76, 78, 80, 83, 84, 89, 91, 92, 93, 94	Familiale ( ?, 93, ?)	Sénégal, Togo, Tanzanie, Inde (3), USA, Canada, Roumanie
3b	2	31, 92		
4	13	13, 14, 26, 27, 31, 59, 60, 61, 69, 71, 75, 77	Familiale ( ?, 27, Madagascar)	Congo (2), Sénégal, Cameroun, Nigeria, Madagascar (2), Afrique, Inde (2), Pérou
4 variété Saigonensis	3	49,77,95		Nigeria, Inde
4c	5	49, 69, 89, 94		Congo, Mongolie
6 Boyd88	32	06, 16, 21, 28, 33, 44, 59, 62, 67, 69, 73, 75, 77, 78, 84, 85, 92, 93, 94, 95	Familiale ( ?, 21, ?) Familiale ( ?, 59, ?) Familiale (3, 78, Egypte)	Algérie (2), Maroc (2), Tunisie, Mali, Egypte (3), Bénin, Inde (6), La Réunion
6 Herfordshire	8	01, 54, 57, 58, 67, 69, 81, 86		Congo, Inde, Ouzbékistan, Thaïlande
6 Manchester	1	84		Thaïlande
X	1	75		
Y	1	91	Familiale ( ?, 91, Mali)	Mali

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

**Tableau 14 : *Shigella sonnei* (270 souches pour 267 patients)**

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>	Epidémie <sup>b</sup>	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
a	16	01, 13, 30, 31, 35, 42, 68, 75, 77, 83, 88,	Familiale (2, 31, ?)	Guadeloupe, Haïti (2), République Dominicaine (2), Mayotte (2)
e	2	98, 94		
g	163	01, 04, 06, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 20, 22, 24, 25, 30, 33, 34, 35, 37, 38, 42, 44, 46, 47, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 83, 85, 87, 91, 92, 93, 94, 95,	Familiale ( ?, 01, Inde) Familiale ( ?, 22, ?) Familiale ( ?, 33, ?) Familiale ( ?, 44, Egypte) Familiale ( ?, 46, ?) Familiale (2, 54, Espagne) Familiale ( ?, 69, Inde) Familiale ( ?, 75, Indonésie) Familiale ( ?, 91, Tunisie) Familiale ( ?, 91, ?) Familiale ( ?, 92, Egypte) Cas groupés ( ?, 69, Maroc) Cas groupés ( ?, 87, ?)	Algérie (2), Maroc (2), Tunisie Espagne (2) Sénégal, Egypte (9), Liban, Palestine, Syrie, Cameroun, Togo (2), Inde (7), Indonésie (3), Pakistan, Cambodge, Vietnam (3), Cuba, Pérou, Laos, Allemagne, Bulgarie, Etats Unis, Mayotte
<i>S. sonnei</i> (mannitol-)	35	01, 12, 14, 29, 31, 34, 35, 44, 45, 47, 53, 54, 60, 64, 69, 78, 80, 85, 91, 92, 93, 95	Familiale ( ?, 47, Maroc)	Maroc (12) Maghreb
<i>S. sonnei</i> (ONPG-)	54	06, 12, 13, 14, 20, 33, 38, 42, 43, 44, 54, 56, 59, 62, 68, 69, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95	Familiale ( ?, 75, ?) Familiale (2, 38, ?)	Algérie Tunisie Sénégal (05) Burkina-Faso Togo (2) Luxembourg

( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

Les deux dernières lignes du tableau concernent des souches de *S. sonnei* présentant des caractères biochimiques spécifiques (mannitol négatif et ONPG négatif). Il est intéressant de noter que les 35 souches de *S. sonnei* mannitol négatif ont toutes été isolées de patients de retour de la même région géographique.

**Tableau 15 : Sérotypes provisoires on non sérogroupables (11 souches pour 11 patients)**

Sérotipe	Nombre de cas	Département d'isolement	Epidémie	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
<i>S. flexneri</i> provisoire 1c	6	28, 42, 69, 75, 78		Pakistan
<i>S. dysenteriae</i> provisoire 97-10607 (96-204)	4	07, 147, 34, 64		Ghana
Non sérogroupable	1	78		Burkina Faso

**b. Souches reçues des DOM-TOM**

En 2011, le CNR-ECS a reçu des DOM-TOM, 90 souches de *Shigella flexneri* isolées chez 90 patients réparties comme suit :

**Tableau 16 : répartition des souches en provenance des DOM-TOM**

Sérotipe	Guadeloupe	Guyane française	Martinique	Réunion
<i>S. flexneri</i> 1 b		18		
<i>S. flexneri</i> 2a	1	39	1	1
<i>S. flexneri</i> 3a	3	2		
<i>S. flexneri</i> 3b		3	1	
<i>S. sonnei</i> g		19		
<i>S. flexneri</i> 6 Boyd88		2		
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>83</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

**c. Souches reçues de l'Etranger****Tableau 17 : répartition des 9 souches en provenance de l'Etranger**

Sérotipe	Principauté de Monaco	Belgique	Sénégal	Nouvelle Zélande
<i>S. boydii</i> 2			1	
<i>S. boydii</i> 11		1		
<i>S. flexneri</i> 3 a				1
<i>S. sonnei</i> g	1		5	
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>

**d. Bilan des feuilles d'informations reçues au CNR-IP (226 fiches pour 219 patients)**

Ces feuilles d'informations ont été établies pour répertorier les cas de *S. sonnei* au niveau de la France métropolitaine. Sur ces feuilles d'informations, en plus du sérotype, les trois cases ONPG, rhamnose et mannitol permettent de définir le biotype. Cependant pour l'année 2011, à l'exception d'une fiche mentionnant l'isolement d'une souche de *S. sonnei* de sérotype g, l'ensemble des fiches reçues ne comportaient pas le sérotype ni les résultats de fermentation des deux sucres, ce qui n'a pas permis de donner une répartition très précise des biotypes par département, cependant en tenant compte des résultats de fermentation du

mannitol et du résultat de l'ONPG, il est possible de subdiviser le séro groupe en deux groupes de biotype, le groupe comprenant les biotype a, e ou g (mannitol+, ONPG+) et le groupe comprenant les biotypes d ou f (mannitol +, ONPG-)

En 2011, Le CNR a reçu 226 fiches correspondant à 219 patients comportant une fiche d'information pour *Shigella flexneri* et 218 fiches pour *Shigella sonnei* répartis comme suit :

**Tableau 18** : résultats des feuilles d'information *Shigella*

Sérogroupe	Nombre de cas	Département d'isolement ( ) <sup>a</sup>	Epidémie <sup>b</sup>	Voyage, pays potentiel d'origine ( ) <sup>a</sup>
<i>flexneri</i>	1	59(2)	Familiale (2, 59)	-
<i>sonnei</i>	218	01(1), 03(1), 06(4), 13(3), 14(4), 21(2), 22(2), 23(1), 27(2), 28(1), 29(1), 30(2), 31(1), 32(1), 33(4), 34(2), 35(4), 38(6), 39(1), 40(4), 42(7), 44(7), 45(4), 49(4), 51(1), 53(1), 54(5), 55(2), 56(1), 59(11), 60(4), 62(3), 63(1), 67(9), 68(1), 69(19), 71(1), 72(3), 73(3), 74(1), 75(8), 76(4), 77(5), 78(8), 79(1), 80(2), 82(1), 83(2), 84(4), 85(1), 86(1), 87(3), 90(2), 91(10), 92(4), 93(13), 94(7), 95(5), 97(1)	Cas groupé (2, 77) Cas groupé ( ?, 74) Familiale (2, 69) Familiale (2, 59), Cas groupé ( ?, 78, retour Maroc) Cas groupé (10, 21, retour d'Inde) Familiale (2, 55) Familiale (7, 69) Familiale (4, 90, retour d'Equateur) Cas groupé ( ?, 68, retour du Maroc) Collective (2, 87)	Togo, Gabon, Congo, Burkina-Faso, Mali, Sénégal, Tunisie, Algérie, Maroc, Bénin, Mali, Madagascar, Egypte  Turquie, Allemagne, Grande Bretagne, Grèce, Portugal, Belgique, Népal, Inde, Malaisie, Ethiopie, Thaïlande, Equateur, Pérou, Mexique, Haiti, Ouzbekistan, Asie

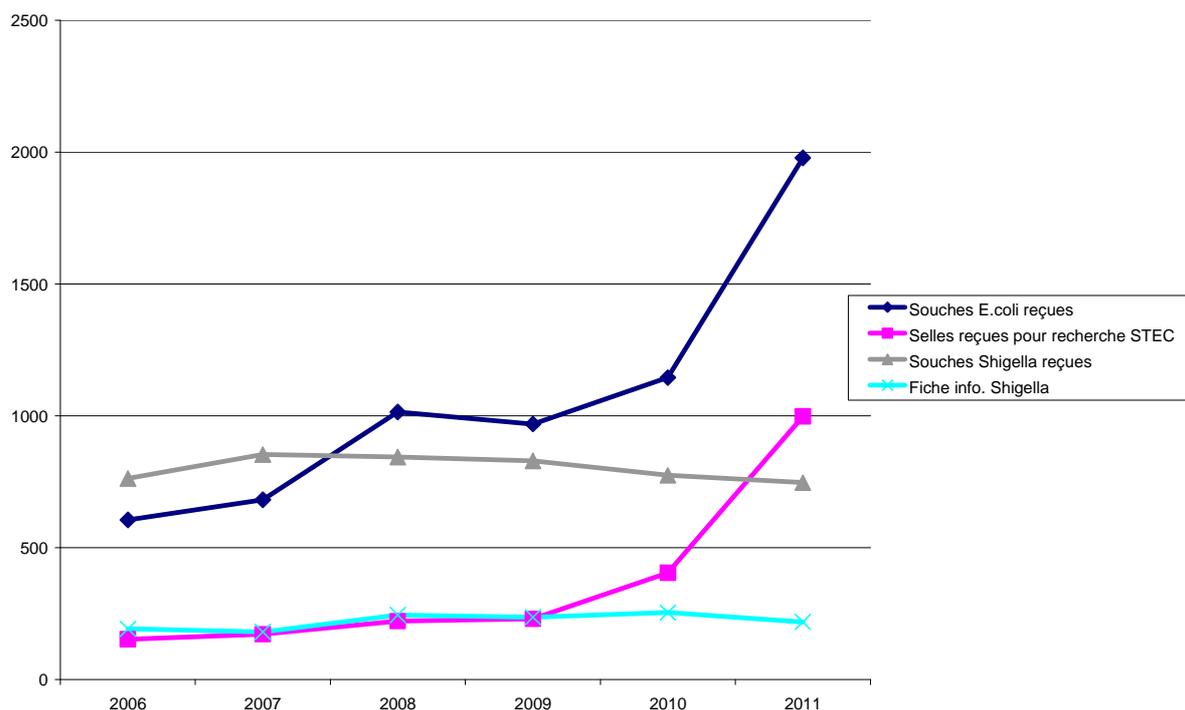
( )<sup>a</sup> : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

b : caractéristiques connues de l'épidémie (nombre de cas, département, voyage ou lien ou circonstance de la contamination)

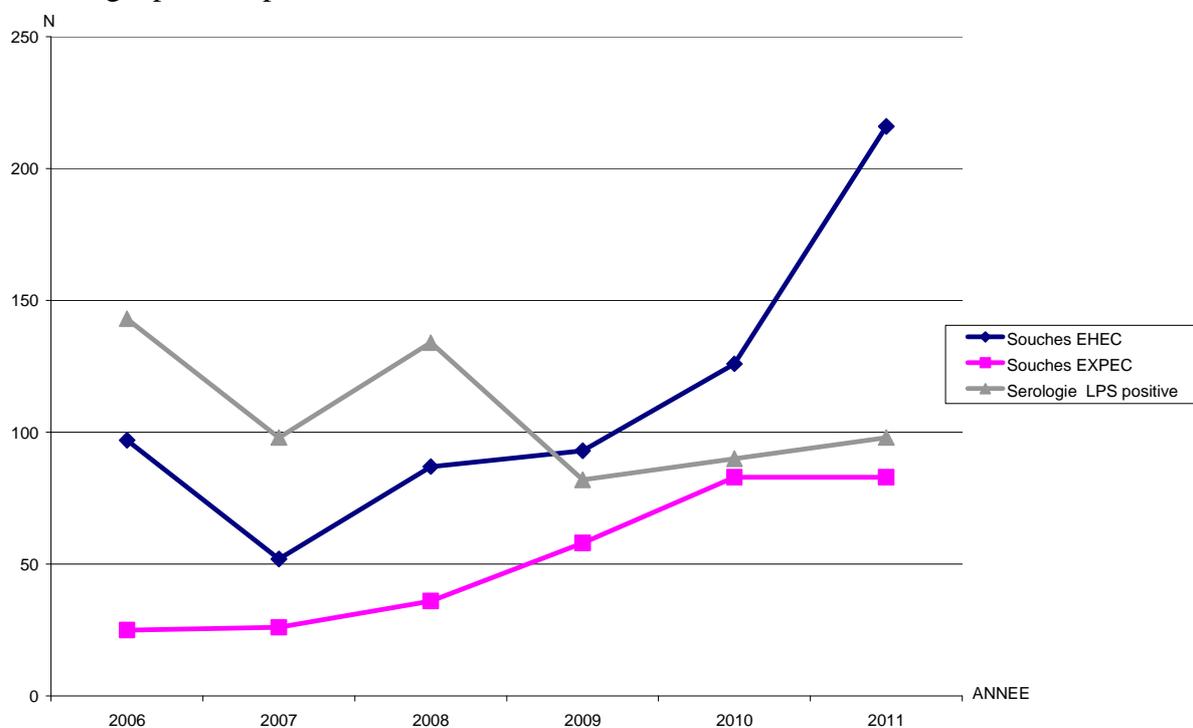
### 2.2.5 Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR ECS-LA

L'analyse de l'activité du CNR ECS-LA de 2006 à 2011, représentée dans le graphique ci-dessous montre clairement l'augmentation importante du nombre de prélèvements tous type confondus pour *E. coli* et la légère diminution du nombre de souches et/ou de fiches d'informations pour *Shigella*.

**Figure 4 : évolution de l'activité du CNR ECS-LA (2006 – 2011)**



**Figure 5 : Evolution des résultats d'isolement des souches EHEC, des EXPEC et du nombre de sérologie positive pour *E.coli***



### 3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

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

##### 3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ECS et le LA-RD collaborent afin d'échanger leurs 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-ECS et le LA-RD collaborent avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

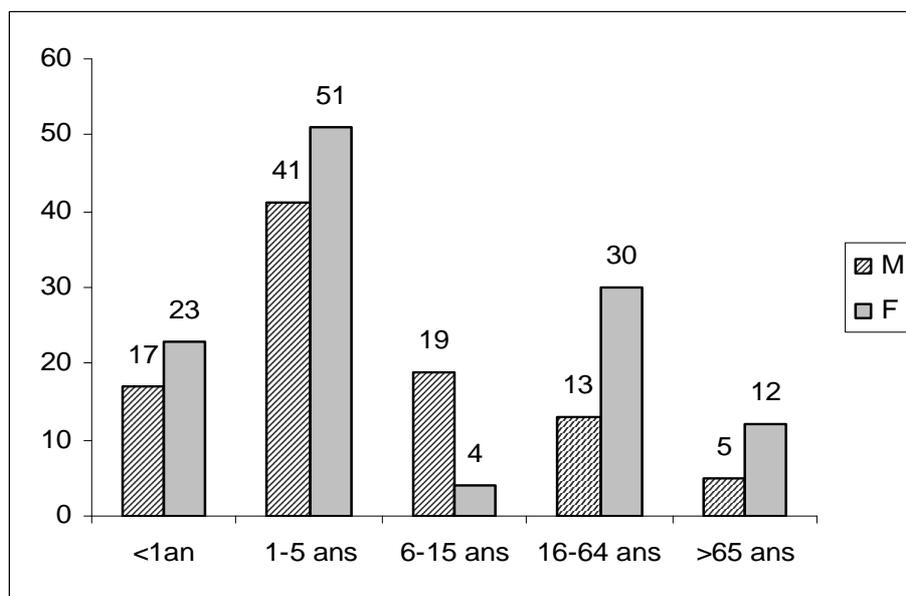
##### 3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

###### - Distribution des souches de *E. coli stx+*:

Tableau 19: Répartition des différents sérotypes de STEC par âge et par sexe des patients

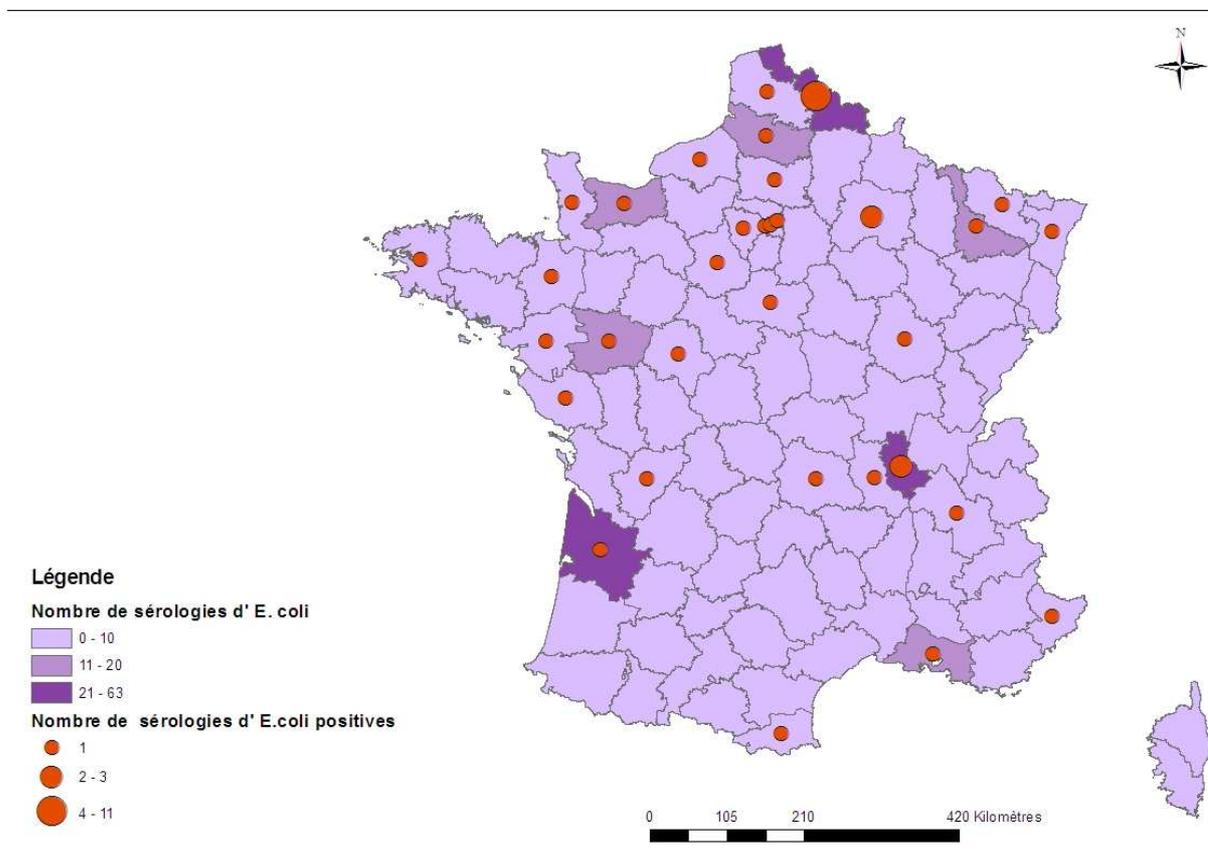
Sérotype	< 1 an		1 - 5 ans		6 - 15 ans		16 - 64 ans		> 65 ans		total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
NST	1	9	2	5	2	2	2	8	2	3	33
O2					2						2
O18		1									1
O26	6	4	7	11	1	1	1	2	1	1	35
O55				1							1
O80	3		3	5							11
O91							1	1			2
O103	0	1	2	0	1	0	1	2	0	0	7
O104		1		2	2		4	8		2	19
O111			3	1	1						5
O113								1			1
O118								1			1
O121	1		1								2
O128	2	1		3	1						7
O145	1	1	1								3
O148										1	1
O157	3	4	22	23	9	1	3	7	2	4	78
O174		1					1			1	3
O177						1					1
Total	17	23	41	51	19	4	13	30	5	12	216

**Figure 6 : Répartition par âge et par sexe des patients pour lesquels une souche STEC a été isolée**



**Répartition des analyses sérologiques :**

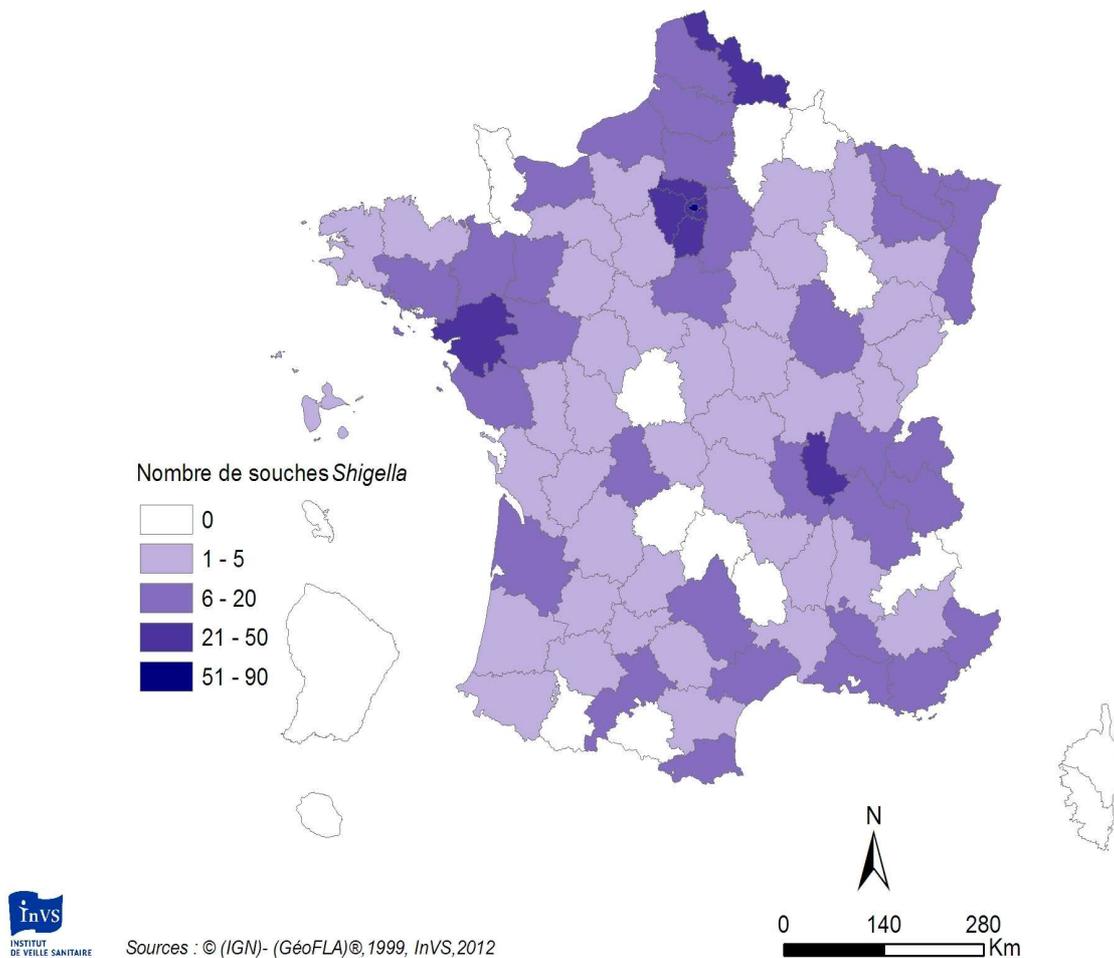
**Figure 7 : Répartition par département du nombre de sérologies *E. coli* et du nombre de sérologies positives en 2011 (département de domiciliation ou à défaut département du laboratoire expéditeur).**



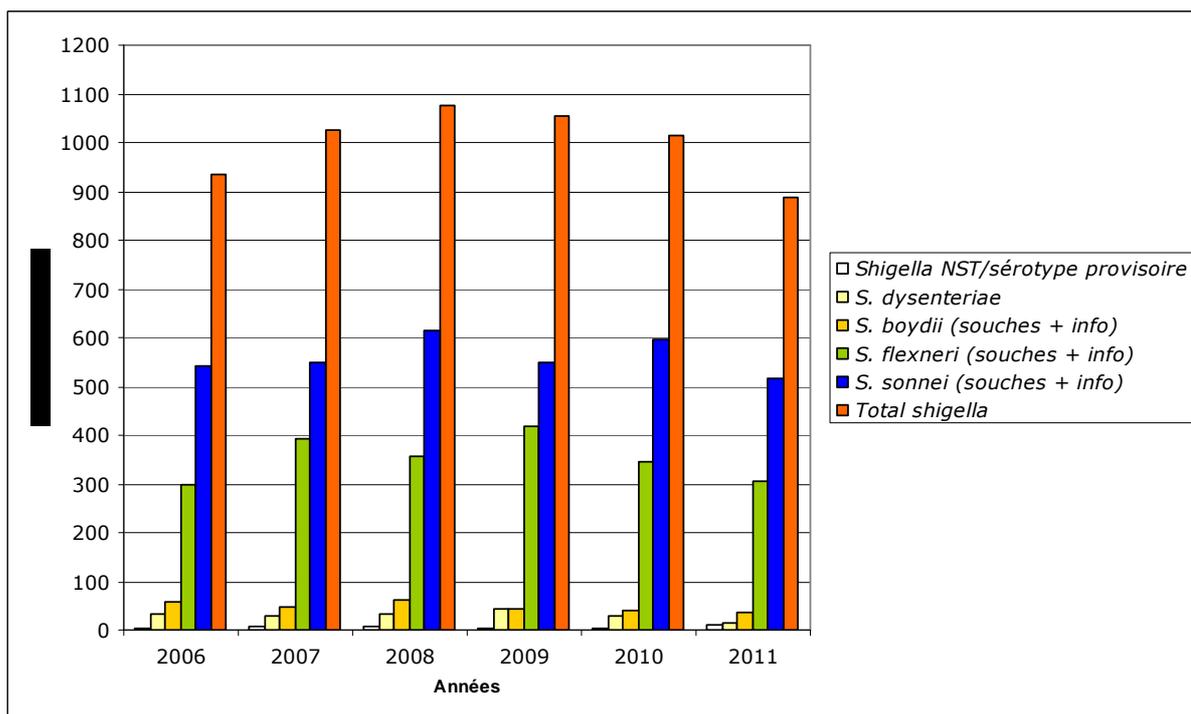
### - Distribution des souches de *Shigella* :

Des souches de *Shigella* d'origine humaine ou des fiches d'information ont été adressées par 83 départements de France métropolitaine et 4 DOM. Le détail de la répartition par département selon les sérotypes figure dans les tableaux numérotés de 11 à 15. Seuls 10 départements (08, 09, 15, 19, 36, 48, 50, 62, 65), n'ont pas déclaré d'isolements de *Shigella* (souches ou feuilles d'information) en 2011.

**Figure 8 : Répartition par département du nombre de souches de *Shigella* et d'information sur les *Shigella* reçues en 2011** (département de domiciliation du patient ou à défaut département du laboratoire expéditeur).



**Figure 9 : Distribution globale des sérotypes de *Shigella* reçues au CNR-ECS depuis 2006 :**



### 3.1.3 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ECS-LA accompagne chaque souche ou prélèvement reçus 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 :

- Signalement systématique de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.
- Dans le cadre de la surveillance des STEC, toute souche ou selle porteuse de gènes *stx* est immédiatement signalée à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par fax.
- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à l'InVS dès leur édition.
- Pour 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 rapidement l'apparition d'une résistance.

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

Le CNR répond également à des demandes d'informations émanant du Réseau européen de surveillance des *E. coli* entérohémorragiques (ECDC-FWD).

### **3.1.4 Collaboration avec des partenaires nationaux exerçant dans le domaine animal, alimentaire ou dans l'environnement**

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme les Ecoles Vétérinaires de Lyon (LNR *E. coli*) et de Maison-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.

Par ailleurs, dans le cadre de la collaboration avec l'ANSES, le CNR-ECS-LA a participé au groupe de travail de l'ANSES ayant émis un avis le 7 juillet 2011 relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de SHU observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées.

### **3.1.5 Collaboration avec des partenaires internationaux** (projets détaillés dans le paragraphe 6)

#### **- Réseau International des Instituts Pasteur**

- **Collaboration avec le Pr G. Dougan du Wellcome Trust Sanger Institute à Cambridge (RU) et le Dr J. Yu de l'Université de Strathclyde à Glasgow (RU).** "Etude de la structure de la population des *S. sonnei*"

- **Collaboration avec le Dr Kaiser Ali Talukder, de l'ICDDR, Dhaka, Bangladesh et le Dr N. Strockbine du CDC, Atlanta, USA.** Etude et description de souches de *Shigella* présentant de nouveaux sérotypes non reconnus par les sérums utilisés en agglutination classique.

- **Collaboration avec le Pr William Hanage (Harvard School of Public Health) et le Dr Deborah Hureg (Broad Institute of MIT & Harvard)** : Etude sur l'histoire évolutive de *Shigella dysenteriae* type 1.

- Génomique des souches de *E. coli* O104:H4

## **3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux**

### **3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches STEC (LA-RD)**

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 LA-RD a étudié la sensibilité des souches isolées en 2011, vis-à-vis des antibiotiques suivants :

- Bêta-lactamines : amoxicilline (AMX), cefixime (CFM), CRO (ceftriaxone)
- Triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT)
- Quinolones et fluoroquinolones : acide nalidixique (NAL), ciprofloxacine (CIP)

La prévalence exprimée en pourcentage est représentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 20** : % de la résistance aux antibiotiques des souches STEC du LA

	AMX	CFM	CRO	SXT	Nal	CIP
<b>O157 (n=52)</b>	5,8	0	0	2	0	0
<b>O104 (n=14)</b>	100	71,4	71,4	21,4	7,1	0
<b>O26 (n=11)</b>	7,1	7,1	7,1	0	0	0
<b>O80 (n=11)</b>	100	0	0	54,5	63,6	0
<b>Autres</b>	26,2	4,8	4,8	2,4	2,4	0

AMX : amoxicilline, CFM : céfamandole, CRO : ceftriaxone, SXT : cotrimoxazole, Nal : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine

En raison des fortes concentrations intraluminales de l'azithromycine, les CMI de l'azithromycine ont été déterminées vis-à-vis des souches isolées en 2011 par la méthode de l'E-Test (tableau 21)

**Tableau 21** : CMI à l'azithromycine des souches STEC isolées en 2011 au LA-RD

Azithromycine	CMI <sub>50</sub> (mg/L)	CMI <sub>90</sub> (mg/L)	Range (mg/L)
Sérotype O157:H7 (n=52)	4	8	3 - 8
Sérotypes non-O157 (n=78)	6	8	2 - 12

### 3.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches de *E.coli* responsables de pathologies extra-intestinales (LA-RD)

La sensibilité des souches aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline (AMX), cefixime (CFM), céfotaxime (CTX), gentamicine (GEN), acide nalidixique (Nal) et ciprofloxacine (CIP) a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM.

Parmi les souches isolées de patients atteints de méningites (n=10), neuf souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés et seule une souche présentait une beta-lactamase à spectre élargi.

Pour les souches isolées d'autres pathologies (n=48), la prévalence de la résistance aux antibiotiques testés, exprimée en % est détaillée dans le tableau 22.

**Tableau 22 :** Prévalence de la résistance des souches EXPEC non responsables de méningites isolée en 2011 au LA-RD exprimée en pourcentage (%)

	AMX	CFM	CRO/CTX	SXT	Nal	CIP	GEN
Méningites (n=20)	60	5	5	20	20	0	10
Hors méningites (n=32)	50	15,6	15,6	21,9	9,4	9,4	3,1

- n : nombre de souches testées

### 3.2.3 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella* (CNR-ECS)

#### a. Surveillance globale

Depuis 2006, un antibiogramme est réalisé sur toutes les souches de *Shigella* identifiées au CNR, à l'aide de 16 disques d'antibiotiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du CA-SFM. Dans certains cas, la méthode de l'E-test est utilisée pour déterminer les CMI. Pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G<sup>R</sup>), un antibiogramme complémentaire a été effectué ainsi que les CMI à CRO et CAZ par la méthode E-Test.

Des CMI sont également réalisées pour toutes les souches de *Shigella* résistantes à la ciprofloxacine.

Un antibiogramme a été réalisé en 2011 sur les souches de *Shigella* reçues au CNR-ECS. Les résultats de la résistance aux principaux antibiotiques de 561 souches humaines isolées en France métropolitaine, en 2011 sont présentés dans le **tableau 23**.

**Tableau 23 :** Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de *Shigella* en 2011 en France métropolitaine

Sérotype	Nb souches testées	AMX	CRO /CAZ	K	GM	NA	CIP	C	TE	SSS	TMP	SXT	AMX + SXT
<b>S. boydii</b>	35	20	0	0	0	11,4	0	11,4	60	71,4	65,7	51,4	17,1
<b>S. dysenteriae</b>	16	68,8	0	0	0	12,5	0	37,5	75	68,8	68,8	68,8	43,8
<b>S. flexneri</b>	237	67,5	0,8	1,3	0	11	8	58,2	81	67,9	71,7	64,6	47,3
<b>S. sonnei</b>	262	19,5	1,1	0,4	1,1	16,8	10,3	2,3	76	81,3	95,8	88,9	19,5
<b>Sérotype provisoire/NST</b>	11	81,8	0	0	0	18,2	9,1	54,5	90,9	81,8	81,8	81,8	63,6
<b>Total</b>	561	42,4	0,9	0,7	0,5	13,9	8,4	28,5	77,4	74,7	82,7	75,6	32,6

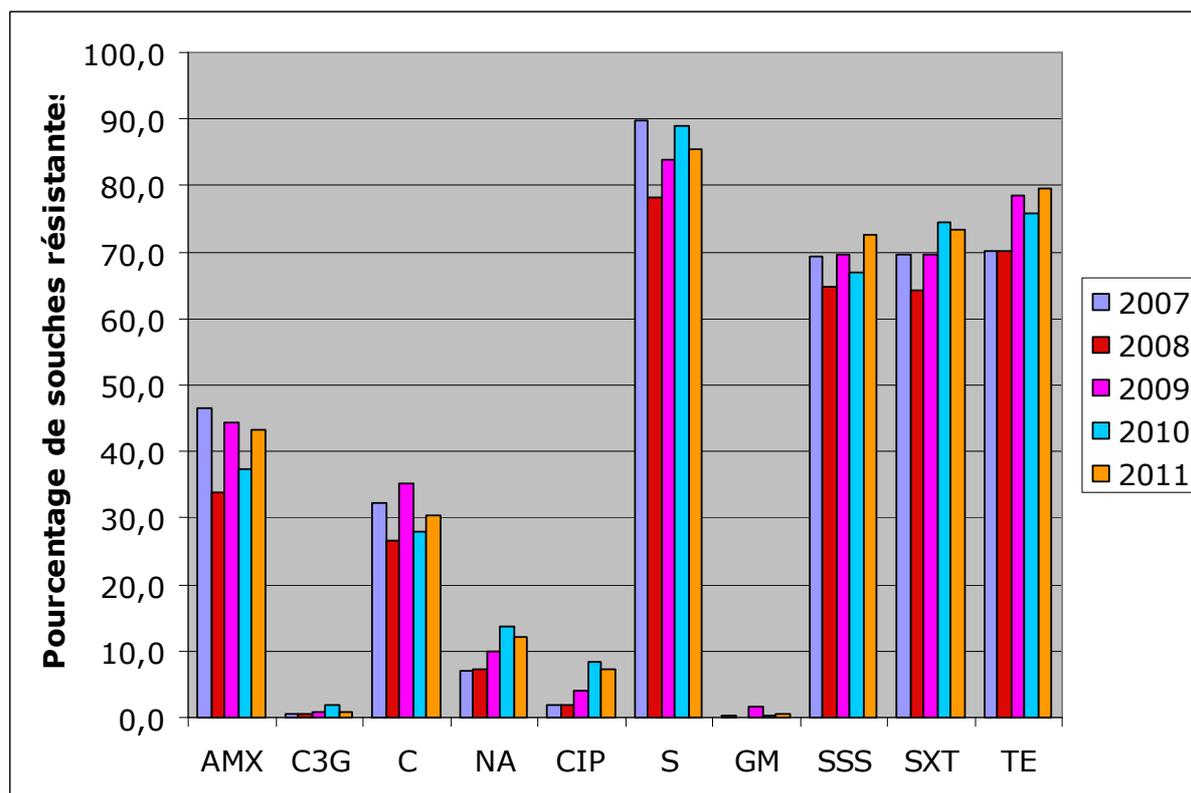
NST : non sérotypables

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.

**Tableau 24 : Evolution de la résistance aux antibiotiques chez *Shigella* spp en France métropolitaine et DOM-TOM**

Antibiotique testé	Pourcentage des souches résistantes en :						
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2006-2011
Amoxicilline	34,5	46,4	33,9	44,5	37,3	43,3	40
Ceftriaxone/ceftazidime	0,1	0,5	0,5	0,7	1,8	0,8	0,7
Chloramphénicol	25,6	32,2	26,7	35,1	27,9	30,5	29,7
Acide nalidixique	5,5	6,9	7,2	9,9	13,8	12	9,2
Ciprofloxacine	1,1	1,9	2,0	4,1	8,3	7,2	4,1
Streptomycine	83,7	89,7	78,2	84,0	88,9	85,4	85
Gentamicine	0,3	0,2	0,1	1,7	0,1	0,5	0,48
Sulfamides	70,6	69,3	64,9	69,7	67	72,7	69
Cotrimoxazole	70,2	69,6	64,3	69,7	74,6	73,3	70,3
Tétracyclines	72,5	70,2	70,1	78,6	75,9	79,5	74,5

**Figure 10 : Evolution des résistances aux antibiotiques de *Shigella* spp de 2007 à 2011**



On note l'augmentation progressive d'année en année de la résistance à l'amoxicilline, aux sulfamides, au chloramphénicol et au cotrimoxazole.

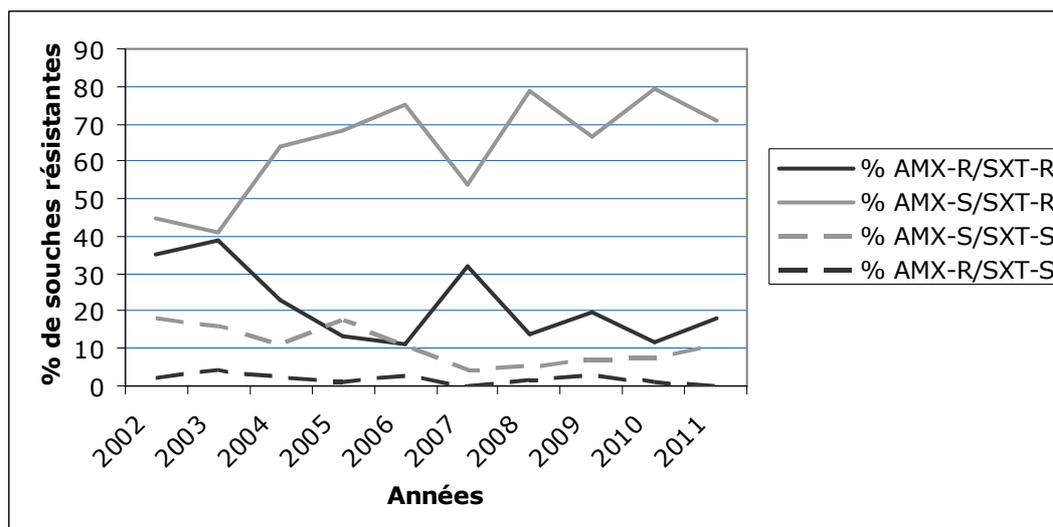
## b Surveillance de *Shigella sonnei*

Ce sérotype est particulièrement surveillé depuis l'apparition de souches résistantes simultanément à l'amoxicilline et au cotrimoxazole (AMX<sup>R</sup> SXT<sup>R</sup>) dans les années 2000 (2002, 2003) et plus récemment en 2007 suite à la survenue d'épidémies dans des écoles confessionnelles de l'Ile de France au cours desquelles, est mise en évidence une résistance de *Shigella sonnei* à l'azithromycine (CMI >256 mg/L). Depuis, un antibiogramme à l'AZM a été mis en place pour toutes les souches de *S. sonnei* AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup> en utilisant, à la fois, la méthode de diffusion (détermination du diamètre de la zone d'inhibition) et la méthode E. test (détermination des CMI).

Depuis 2007, aucune nouvelle épidémie avec des souches AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup>-AZM<sup>R</sup> n'a été détectée.

La figure ci-dessous montre l'évolution de la résistance à l'amoxicilline et au cotrimoxazole chez *S. sonnei* biotype g depuis 2002

**Figure 11** : Analyses des tendances des résistances à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez *Shigella sonnei* biotype g



Le nombre de *S. sonnei* résistantes à l'azithromycine (CMI>16mg/L) sur la période 2007-2011 est indiquée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 25 : Caractéristiques des souches de *S. sonnei* résistantes à l’azithromycine depuis 2007**

Année	Nb de souches	Sérotype	CMI AZM (mg/L)	Sensibilité AMX/SXT (nombre)
2007	1	<i>S. sonnei</i> g	18	
	19	<i>S. sonnei</i> g	24	RR(18), SR(1)
	19	<i>S. sonnei</i> g	32	RR(15), SR(2) SS(2)
	1	<i>S. sonnei</i> g	48	RR
	1	<i>S. sonnei</i> g	64	SR(1)
	45	<i>S. sonnei</i> g	>256	RR(45)
2008	0	<i>S. sonnei</i> g		
2009	1	<i>S. sonnei</i> a	>256	RR(1)
2010	2	<i>S. sonnei</i> g	>256	RR(2)
2011	4	<i>S. sonnei</i> g	32	RR(4)
			48	
			64	
			256	

### c. Résistances émergentes chez *Shigella* spp

Depuis 2005, le CNR-ECS a noté une augmentation du nombre de souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G<sup>R</sup>) par production d’une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) ainsi que du nombre de souches résistantes à haut niveau à la ciprofloxacine (CIP<sup>R</sup>, CMI > 1 mg/L). Ces souches essentiellement de sérogroupes *S. sonnei* et *S. flexneri* ont été acquises principalement lors d’un séjour en Inde ou de pays limitrophes.

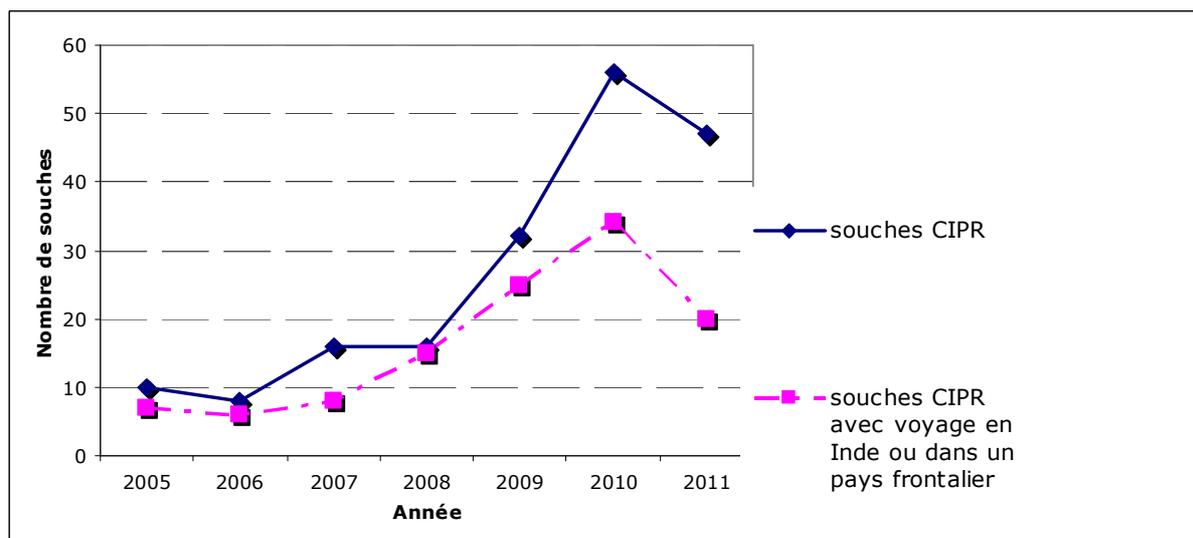
#### ➤ Résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

En 2011, 5 souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération par production d’une BLSE ont été isolées : deux souches de *Shigella flexneri* respectivement de sérotype 2a et 3a et 3 souches de *Shigella sonnei* g, toutes isolées en France métropolitaine. L’analyse des mécanismes de résistance (type de BLSE) est en cours.

#### ➤ Résistance de haut niveau à la ciprofloxacine

La résistance à haut niveau à la ciprofloxacine a considérablement augmenté entre 2006 (5,5%) et 2010 (13,8%) particulièrement chez les sérogroupes majoritaires *S. flexneri* et *S. sonnei*. En 2011, 47 (8,4%) souches résistantes à la ciprofloxacine ont été isolées, toutes de France métropolitaine parmi lesquelles, 20 isolées chez des patients de retour d’Inde ou de pays limitrophes.

**Figure 12** : Evolution du nombre de *Shigella* CIP<sup>R</sup> au CNR-ECS entre 2005 et 2011



### 3.3 Détection et investigation des cas

#### 3.3.1 Cas probables identifiés en France en lien avec l'épidémie de EHEC O104:H4 en Allemagne (mai-juin 2011)

Le 22 mai 2011, l'Allemagne a lancé une alerte européenne sur une augmentation importante de cas de SHU observé dans le nord du pays depuis début mai 2011. Au cours de cette épidémie, qui a duré 2 mois, 4320 infections, 852 SHU, et 82 décès ont été observés. La souche épidémique était une souche de *E. coli* de sérotype O104:H4 présentant à la fois des caractéristiques de pathovar EHEC (gène *stx2a*) et des caractéristiques de pathovar enteroaggrégant (*aggR+*). La souche était multirésistante aux antibiotiques par production d'une beta-lactamase à spectre élargi de type CT-X-M15.

Une alerte a donc été lancée en France. Entre le 21/05/2011 et le 03/06/2011, 10 cas de diarrhée sanglante chez des personnes ayant séjourné ou résidant en Allemagne dans les 15 jours précédant leurs symptômes ont été signalés par les ARS à l'InVS. Il s'agissait de 6 hommes et 4 femmes âgés en moyenne de 30 ans (extrêmes : 14-55 ans). Tous ont eu un lien direct avec l'Allemagne en mai 2011

- 1 touriste allemande en voyage en Corse
- 2 français résidant en Allemagne (Hambourg, Frankfort)
- 6 français ayant voyagé en Allemagne en mai 2011
- 1 personne résidant en Alsace ayant fait des courses en Allemagne

Aucun des cas n'a évolué vers un SHU.

L'investigation microbiologique réalisée au CNR-ECS-LA a mis en évidence pour deux cas, une souche de *E. coli* O104:H4 *stx2a+*, *aggR+*, BLSE de type CT-X-M15 chez la touriste allemande voyageant en Corse et chez un patient français de retour de Hambourg.

Les deux souches étaient génétiquement reliées et reliées à la souche allemande comme le montre l'électrophorèse en champ pulsé après digestion par l'enzyme *XbaI* (voir figure 13)

### 3.3.2 Epidémie de SHU et de diarrhée sanglante due à *E. coli* O104:H4 dans le sud-ouest de la France (juin 2011)

Le 22 juin 2011, deux hôpitaux de Bordeaux ont signalé à la Cellule interrégionale d'épidémiologie (Cire) Aquitaine 6 cas de diarrhée sanglante (DS) et 2 cas de SHU

Quinze cas épidémiques ont été identifiés au cours de cet épisode :

- 9 cas avec un SHU
- 4 cas avec une diarrhée sanglante
- 2 cas avec une diarrhée simple.

Onze patients ont été hospitalisés ; aucun n'est décédé.

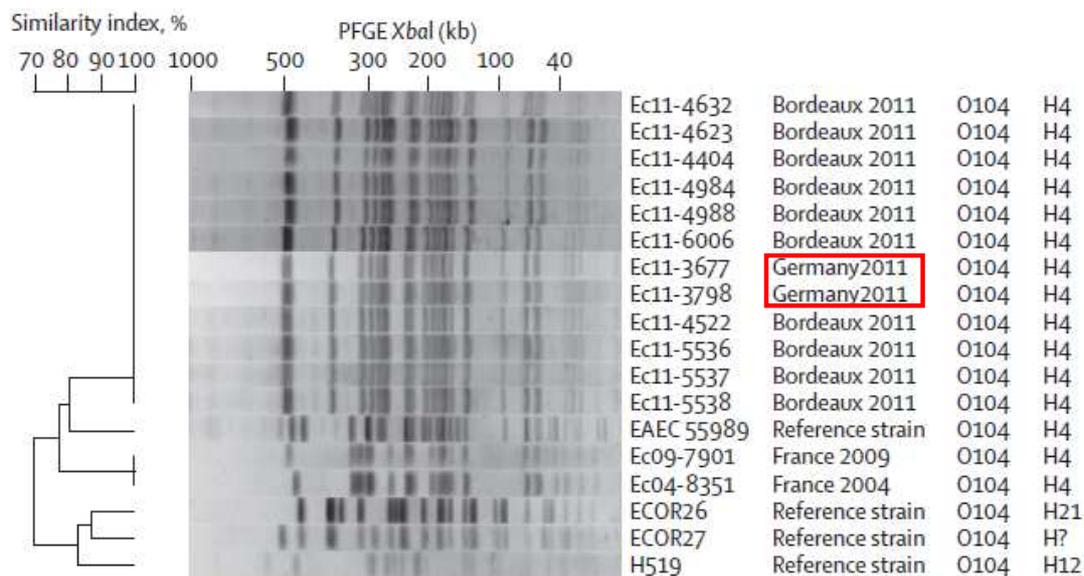
Les 15 cas sont 10 femmes et 5 hommes d'âge compris entre 3 et 64 ans (médiane : 37 ans).

Les dates de début des symptômes se distribuent entre le 11 et le 27 juin.

Ils résidaient tous à Bégles ou à proximité. Aucun n'avait voyagé en Allemagne

La confirmation d'une infection à EHEC a pu être obtenue pour 12 cas. Il s'agissait d'une souche de sérotype **O104:H4**, présentant les mêmes caractéristiques de virulence (*stx2a+*, *aggR+*) et de résistance aux antibiotiques (BLSE de type CT-X-M15) que la souche épidémique allemande. Les deux souches étaient génétiquement reliées comme le montre l'analyse en champ pulsé (enzyme *XbaI*) réalisée au CNR-ECS-LA (voir figure 13).

**Figure 13 :** Profils PFGE des cas de SHU et de diarrhées sanglantes à *E. coli* O104:H4 dans le sud ouest de la France (juin 2011)



Mariani-Kurkdjian et al, Lancet Infect Dis, 2011

### 3.3.3 Epidémie à *E. coli* O157:[H7] sorbitol positif dans le nord de la France en lien avec la consommation de viande hachée de bœuf

Le 14 juin 2011, le Département des Maladies Infectieuses (DMI) de l'InVS et la Cellule régionale de veille, alerte et gestion sanitaires (CRVAGS) de l'Agence Régionale de Santé (ARS) Nord Pas-de-Calais étaient informés par le Centre hospitalier régional universitaire de Lille (CHRU) et le service des urgences du Centre hospitalier (CH) de Douai, de cinq cas de SHU post-diarrhéique chez des jeunes enfants hospitalisés depuis le début du mois de juin 2011, résidant dans le département du Nord (59). Les cas, âgés de 20 mois à 8 ans, étaient domiciliés dans plusieurs villes, Douai (n=3), Valenciennes (n=1) et Dunkerque (n=1). Les dates de début des symptômes des enfants étaient groupées du 6 au 10 juin 2011 pour l'épisode diarrhéique prodromique avec un diagnostic de SHU posé entre le 10 et le 13 juin.

Les premières souches ont été isolées dans le service de Microbiologie du CHU de Lille (Pr Courcol et Pr Simonet) puis adressées au LA-RD.

Le CNR-ECS-LA a participé à l'investigation de cette épidémie en collaboration avec le LNR de Lyon qui a effectué l'analyse microbiologique des préparations à base de viande hachée réfrigérées suspectées.

La recherche d'anticorps sériques dirigés contre le lipopolysaccharide des sérogroupes de STEC a été effectuée pour 17 cas ; les sérologies étaient positives pour le séro groupe O157 (Tableau 26) pour les 16 cas.

Des analyses de selles ont été réalisées pour 15 cas dont 13 se sont révélées positives. Treize souches dont 11 STEC appartenant aux sérotypes O157 (n=10) et O177 (n=1) et deux souches d'*AEEC* (O157 et O26) ont été isolées (Tableau 22). De plus, une selle était positive en PCR pour STEC O157 sans qu'une souche n'ait pu être isolée (Tableau 26).

Un résultat positif en sérologie et dans les analyses de selles a été obtenu pour 11 cas. Toutes les souches du séro groupe O157 isolées des selles étaient immobiles et fermentaient le sorbitol, caractéristique très rare pour les souches O157 isolées en France. Le gène *fliC* codant la flagelline (antigène H) a été séquencé pour deux de ces souches (une de pulsotype C et une de pulsotype E) dans les deux cas, il s'agissait d'un allèle *fliC* H7.

Le sérotype majoritaire parmi les souches isolées était O157:[H7] (84%, 11/13). Une infection par deux sérogroupes de STEC a été mise en évidence chez deux cas (O157 et O177; O157 et O26). La recherche de facteurs de virulence des souches a mis en évidence un profil de virulence, *stx2 eae hlyA*, majoritaire (72%, 8/11) parmi les souches du séro groupe O157.

Les souches humaines et les souches isolées dans les aliments ont été comparées par électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN. L'analyse a mis en évidence 3 pulsotypes (profils PFGE) distincts parmi les souches cliniques : le pulsotype A correspondant aux souches appartenant au séro groupe O177, et les pulsotypes C et E parmi les souches de séro groupe O157. La fréquence des deux pulsotypes identifiés parmi les souches du séro groupe O157 était quasi équivalente (pulsotype C : 54% ; pulsotype E : 46%). En revanche, les souches ayant un même pulsotype n'avaient pas toutes le même profil de virulence (Tableau 26). Les pulsotypes C et E étaient spécifiques des souches de STEC O157 isolées chez les cas rattachés à cette épidémie, ces 2 pulsotypes n'ayant pas été identifiés parmi les autres souches de STEC O157 étudiées en 2011, hors contexte de cette épidémie. Ces profils étaient également retrouvés dans les souches alimentaires.

**Tableau 26 :** Résultats des analyses humaines de la recherche d'infection à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines et consommation de l'aliment incriminé, France, juin-juillet 2011 (n=18).

N° cas	Consommation de viande hachée de bœuf <sup>a</sup>	Enseigne d'achat	Marque de produit	Résultat sérologie	Souche de STEC/AEEC <sup>b</sup> isolée	Profil PFGE <sup>c</sup>	Fermentation de sorbitol <sup>d</sup>	Souche mobile
1	Oui (steak haché)	X	A	O157	O177:[H25] <sup>e</sup> <i>stx2 eae hlyA</i>	A	Oui	Non
2	Oui (burger aux oignons)	X	A	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae</i>	C	Oui	Non
3	Non	/	/	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	C	Oui	Non
4	Non <sup>f</sup>	/	/	Négatif	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	C	Oui	Non
5	Non <sup>g</sup>	/	/	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	C	Oui	Non
6	Non	/	/	Analyse non-faite	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	C	Oui	Non
7	Oui (steak haché) Possible (produit inconnu)	Y (steak haché) ; X (produit inconnu),	B pour Y ; Inconnue pour X	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	C	Oui	Non
8	Oui (steak haché)	X	A	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	E	Oui	Non
9	Oui (steak haché)	X	A	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	E	Oui	Non
10	Oui (steak haché et boulettes de viande)	X	Inconnue (steak haché) ; A (boulettes)	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae hlyA</i>	E	Oui	Non
11	Oui (steak haché)	X	A	O157	O157:[H7] <i>stx2 eae</i>	E	Oui	Non
12	Oui (steak haché)	X	A	O157	O157:[H7] <i>eae hlyA O26 eae</i>	E (O157) I (O26)	Oui Oui	Non /
13	Oui (steak haché)	X	A	O157	O157 <i>stx2 eae hlyA</i> (PCR sur selles uniquement)	/	/	/
14	Oui (steak haché)	X	A	O157	Négatif	/	/	/
15	Oui (steak haché)	X	A	O157	Négatif	/	/	/
16	Oui (steak pour hamburger)	X	Inconnue	O157	Analyse non réalisée	/	/	/
17	Oui (boulettes et filet américain)	V (boulettes), W (filet américain)	Inconnue	O157	Analyse non réalisée	/	/	/
18	Oui (steak haché)	Z	C	O157	Analyse non réalisée	/	/	/

**Légende :**

<sup>a</sup> : Consommation d'une préparation à base de viande hachée de bœuf dans les 7 jours précédant le début de signes

<sup>b</sup> : STEC: *E. coli* producteurs de Shiga-toxines; AEEC : « Attaching and effacing *E. coli* »

<sup>c</sup> PFGE : analyse d'électrophorèse en champ pulsé (*XbaI*). Les profils PFGE (pulsotypes) nommés par la même lettre diffèrent par 3 bandes au maximum et appartiennent donc à un même sous-groupe clonal (selon l'article consensus relatif à l'interprétation des résultats obtenus par PFGE)

Les 3 pulsotypes isolées de l'aliment incriminé et isolés chez les cas, et donc classées comme pulsotypes épidémiques sont les A, C et E.

<sup>d</sup> Caractéristique phénotypique des STEC O157 utilisé pour distinguer les O157:H7 classiques (non-fermenteurs de sorbitol) des O157:H7 atypiques (fermenteurs de sorbitol).

<sup>e</sup> [HX] : souche non-mobile; (non-expression de l'antigène flagellaire « H ») dont l'antigène H a été déterminé par PCR (typage du gène *fliC*) et noté comme [H7], [H25]. L'antigène H d'une souche mobile de STEC est noté comme HX.

<sup>f</sup> Cas secondaire. Un autre enfant atteint d'une diarrhée dans le foyer avait consommé un burger aux oignons de l'enseigne X (marque A).

<sup>g</sup> Cas secondaire. Aucune consommation rapportée de produit à base de viande hachée de l'enseigne X pour les deux cas du foyer.

Les investigations épidémiologiques, microbiologiques et de traçabilité ont montré que cette épidémie était liée à la consommation de viande hachée de bœuf (steak haché et burger). Cette épidémie, la deuxième survenue en France en lien avec la consommation steaks hachés de bœuf, la première a eu lieu en octobre 2005.

Par ailleurs, des analyses microbiologiques ont été réalisées par le LNR sur différents lots de steaks hachés incriminés (retrouvés et/ou potentiellement consommés aux domiciles des cas humains) et ont permis d'isoler des souches appartenant à trois sérotypes différents de STEC/AEEC (O157:[H7], O177:[H25], O103:[H2]) et deux souches de STEC non-sérotypables, toutes ces souches étaient immobiles et appartenaient à sept pulsotypes différents (A, C, E, K, L, M, N). Toutes les souches du sérotype O157 fermentaient le sorbitol. Trois des pulsotypes, A, C, E, étaient communs aux souches isolées chez des cas et dans les préparations à base de viande hachée surgelée prélevées dans les congélateurs des familles des cas.

### **3.3.4 Epidémie de SHU dans le Finistère (été 2011)**

Quatre cas de SHU regroupés dans le temps sont survenus pendant l'été 2011 dans le Finistère.

Deux enfants ont eu une sérologie positive en O157 mais sans souche retrouvée. Un enfant a eu une sérologie négative, sans souche retrouvée. Une seule souche de *E. coli* O157:H7 a été isolée pour un cas de SHU. Tous ces enfants vivent dans un environnement rural et aucun lien épidémiologique n'a été retrouvé.

### **3.3.5 Cas groupés de SHU à *E. coli* O104:H4 chez des touristes français de retour de Turquie (septembre 2011)**

Le 30 septembre 2011, le CHU de Caen informe l'ARS de deux cas de SHU chez des patients de retour d'un voyage organisé en Turquie entre le 4 et le 17 septembre. Le 4 octobre, 6 autres cas de diarrhées sanglantes et/ou de diarrhées sanglantes chez des patients de ce même groupe sont identifiés.

Des prélèvements de selles et de sérums des deux cas de SHU ont été envoyés au CNR-ECS, les analyses effectuées ont permis d'isoler dans un cas sur deux, une souche de *E. coli* O104:H4 présentant le même profil de virulence que la souche de *E. coli* O104:H4 de l'épidémie allemande et de celle de Bordeaux (stx2+ eae- hlyA- AggR+). Par ailleurs, elle présentait, à l'exception de la bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) absente, le même phénotype de résistance que les deux souches épidémiques sus-citées, à savoir (résistance à l'ampicilline, streptomycine, sulfamides, triméthoprime, cotrimoxazole, tétracycline, acide

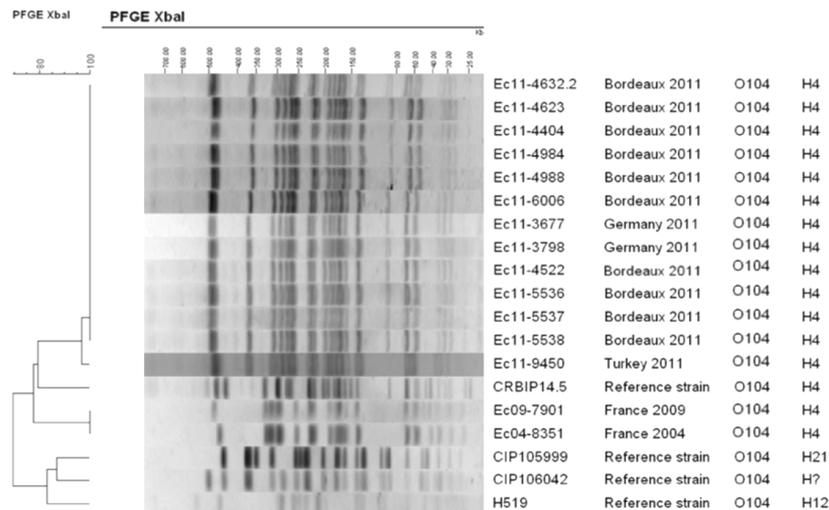
nalidixique et sensibilité au céfotaxime, ceftazidime, imipeneme, kanamycine, gentamicine, chloramphénicol et ciprofloxacine).

La recherche de STEC dans le prélèvement du deuxième cas de SHU s'est révélée négative par contre la sérologie *E. coli* était positive pour les deux cas.

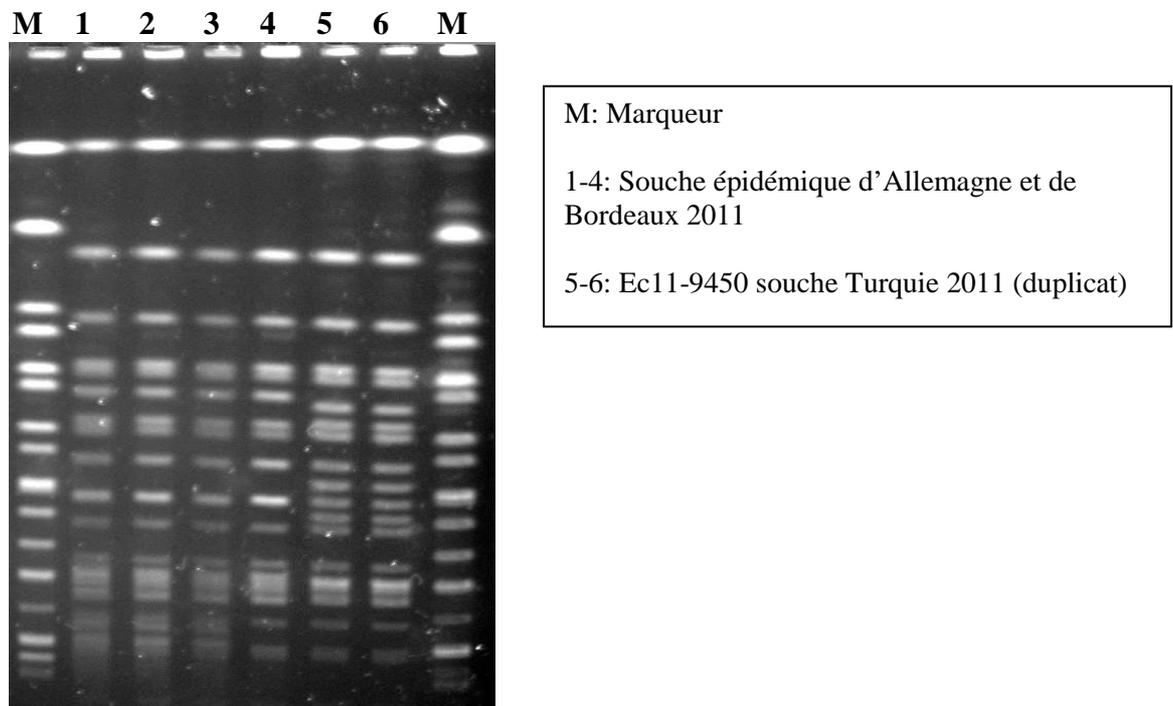
Dans un deuxième temps, le CNR a analysé la souche isolée par électrophorèse en champ pulsé en parallèle avec les souches épidémiques (Allemagne et Bordeaux), les résultats de cette analyse (voir figures 14 et 15), montrent que la souche est proche des deux souches épidémiques mais pas identique et diffère par deux bandes après utilisation de *Xba*I et trois bandes après utilisation de *Not*I. Elle est également différente des deux cas sporadiques d'infections à *E. coli* O104:H4 *stx*2 *aggR* et *agg3A* positifs, isolées en France en 2004 et 2009.

Il n'a pas été possible d'identifier la source de contamination de ces deux cas de SHU.

**Figure 14 :** Profils PFGE *Xba* I des cas de SHU à *E. coli* O104:H4 survenus chez des touristes français de retour de Turquie et comparaison avec les cas épidémiques à *E. coli* O104:H4 d'Allemagne et de Bordeaux de juin 2011 et les cas sporadiques survenus en France en 2004 et 2009



**Figure 15** : Profils PFGE *Not* I des cas de SHU à *E. coli* O104:H4 survenus chez des touristes français de retour de Turquie et comparaison avec les cas épidémiques à *E. coli* O104:H4 d'Allemagne et de Bordeaux de juin 2011

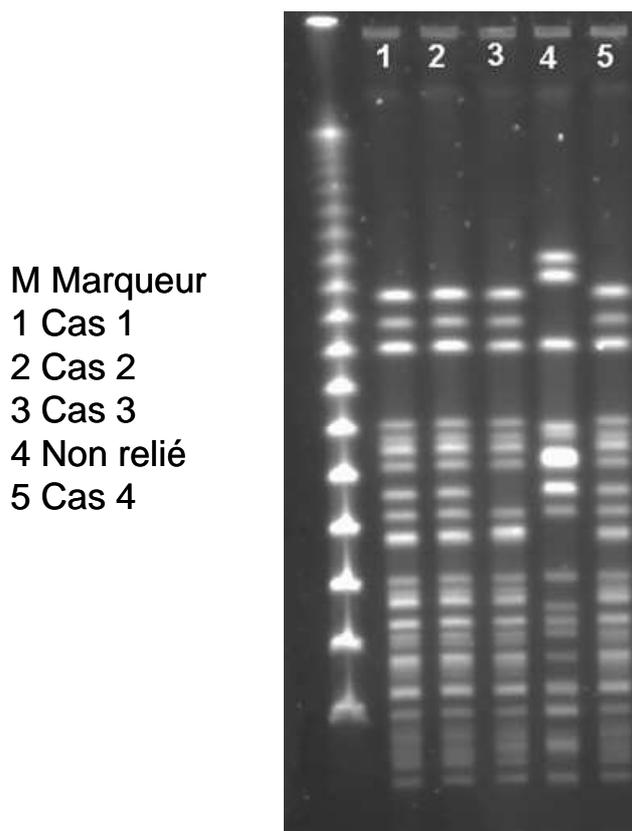


### 3.3.6 Cas groupés de diarrhées sanglantes à Strasbourg – septembre 2011

A la demande de l'InVS, le LA-RD a investigué 5 cas de diarrhée dont 3 sanglantes chez des enfants de 2 familles résidant à Strasbourg.

Pour quatre enfants sur 5, une souche de *E. coli* O157 *eae+* *stx2+* *hlyA+* a été isolée.

Les souches étaient génétiquement reliées (analyse par PFGE après digestion par *Xba*I) voir figure 16.



**Figure 16 :** Profil PFGE *Xba* I des cas de diarrhées sanglantes à *E. coli* O157 survenues chez des enfants à Strasbourg, septembre 2011

L'interrogatoire a déterminé qu'une autre hypothèse de transmission de personne à personne au sein des 2 familles était l'hypothèse la plus probable.

### 3.3.7 Regroupement temporo-spatial de SHU à Caen – Été 2011

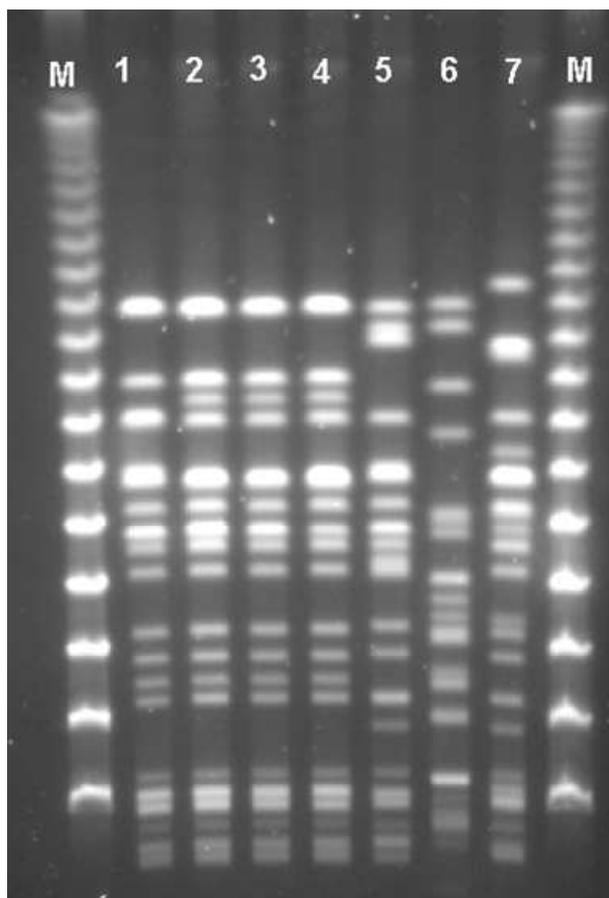
A la demande de l'InVS, le LA-RD a investigué un regroupement temporo-spatial de cas de SHU autour de Caen du 21 juillet au 15 septembre 2011.

Il s'agissait de 6 cas de SHU et d'un cas de DGS dans l'entourage. Pour 3 des cas de SHU, aucune souche n'a été retrouvée mais la sérologie était positive pour O157.

Pour 3 cas de SHU et pour la sœur d'un des patients, une souche de O157 *eae+stx2+* a été isolée. L'analyse en champ pulsé montre que les souches étaient génétiquement reliées (voir figure 17)

Cependant, l'enquête épidémiologique n'a pas retrouvé pas de lien entre les cas.

- 1 O157 - Cas 1 - SHU
- 2 O157 - SHU
- 3 O157 - SHU
- 4 O157 - Sœur SHU
- 5 O 18 non relié
- 6 O 157 non relié
- 7 M Marqueur



**Figure 17** : Profil PFGE *XbaI* des cas groupés de SHU à *E. coli* O157 survenus à Caen (été 2011)

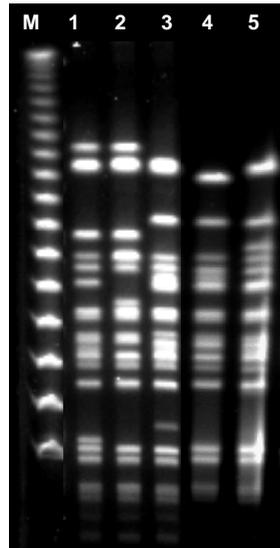
### 3.3.8 Cas sporadiques de SHU liés à *E. coli* O104:H4 survenus après l'épidémie de Bègles

Quatre cas de SHU à *E. coli* O104:H4 sont survenus chez des enfants entre août et décembre 2011. Les caractéristiques des patients et des souches figurent dans le **tableau 27** suivant :

**Tableau 27** : Cas sporadiques de SHU liés à *E. coli* O104:H4 survenus après l'épidémie de Bègles

Date	département	N°souche	sexe	âge	clinique	<i>eae</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>hlyA</i>	variant	autres
24/08/2011	25	33006	M	13	SHU	-	-	+	-	Stx2a	AggR+
06/09/2011	44	33162	M	16	SHU	-	-	+	-	Stx2a	AggR+
08/11/2011	13	33345	F	5	SHU	-	-	+	-	Stx2a	AggR+
09/11/2011	94	33439	F	5	SHU	-	-	+	-	Stx2a	AggR+

- Aucun lien épidémiologique n'a été retrouvé entre les patients.
- Les souches ont été comparées entre elles et comparées à la souche épidémique O104:H4 par électrophorèse en champ pulsé après digestion par *XbaI* (voir figure 18)



1. Cas sporadique 33006
2. Cas sporadique 33162
3. **Souche épidémique**
4. Cas sporadique 33345
5. Cas sporadique 33439

**Figure 18 :** Cas sporadiques de SHU liés à *E. coli* O104:H4 survenus après l'épidémie de Bègles

Les souches étaient génétiquement proches mais pas identiques à la souche épidémique allemande (voir figure 18 ci-dessus). Une étude par séquençage complet est en cours d'analyse.

### 3.3.9 Autres types d'investigations

#### ➤ Etude du portage fécal communautaire d'Entérobactéries productrices de BLSE chez l'enfant (LA-RD)

L'étude de la prévalence et les facteurs de risque de portage communautaire d'Entérobactéries productrices de BLSE a été étudié chez 411 enfants sains âgés de 6 à 24 mois.

Au total, 4,6% des enfants portaient une souche d'entérobactérie (18 *E. coli* et 1 *K. pneumoniae*) productrices de BLSE. CTX-M-1 et CTX-M-15 représentaient les BLSE prédominantes.

L'étude de la diversité génétique des souches de *E. coli* par la méthode REP-PCR a montré que les souches étaient génétiquement non reliées.

L'exposition à une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération était significativement associée au portage de BLSE ( $p = 0,004$ )

#### ➤ Epidémie de gastroentérite aigüe dans un EPHAD dans l'Aisne (02)

L'ARS de Picardie a signalé une épidémie de gastroentérite aigüe dans un EPHAD dans l'Aisne (02). Entre le 03/05 et le 05/05/2011, 42 sur 89 résidents ont été malades avec des vomissements et de la diarrhée mais sans diarrhée sanglante

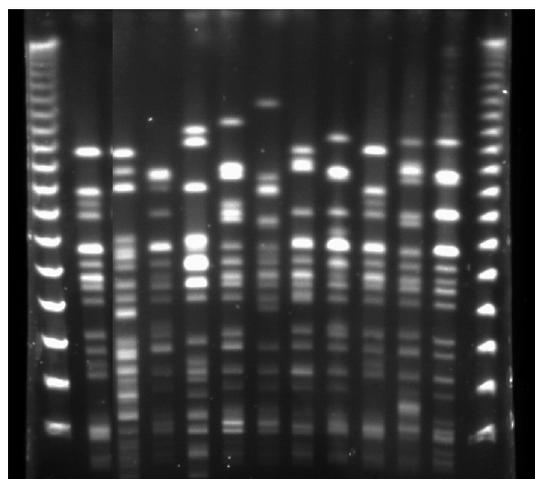
Une coproculture envoyée à un laboratoire privé à Laon a isolé 6 souches de *E. coli* O157. Le LA-RD a reçu les souches isolées et a infirmé l'identification. La technique utilisée par le laboratoire en termes d'identification n'était pas conforme. Un contact a été établi avec le biologiste.

➤ **Epidémie de diarrhée sanglante en Lorraine : faux positifs test Rida Quick commercialisé par r-biopharm**

A la demande de l'InVs, le LA-RD a investigué 15 cas de diarrhées sanglantes testées par le test Rida Quick (test immunochromatographique permettant de dépister les Shiga-toxines). Les selles et les souches ont été reçues par le LA-RD. La recherche des gènes des Shiga-toxines était négative et infirme le résultat obtenu par le test rapide sur les selles. Il s'agit donc d'un faux positif du test direct. La coproculture a en fait révélé la présence de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium dans les selles de ces enfants. Ce test peut en effet présenter des réactions croisées avec d'autres micro-organismes.

➤ **Analyse des souches de *E. coli* O157 de l'année 2011 par électrophorèse en champ pulsé**

Le LA-RD poursuit son activité de typage par PFGE dans le cadre du plan quinquennal et poursuit une évaluation comparative de deux méthodes d'analyse globale du génome des souches EHEC. La comparaison avec les souches des années précédentes est en cours. En 2011, 48 souches de *E. coli* O157 ont été analysées en champ pulsé après digestion par *Xba*I. Cette comparaison montre 21 profils différents. La figure ci-dessous montre un exemple de la diversité de certains profils de O157.



**Figure 19** : Diversité des profils PFGE de souches de *E. coli* O157:H7

### **3.4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens**

Participation au réseau ECDC-FWD pour la surveillance européenne des infections à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines et des *Shigella*

#### 4. ALERTE

Celle-ci s'effectue auprès de l'InVS auquel, le CNR signale systématiquement :

- tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.
- toute souche ou selle positive pour les gènes stx à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par fax.
- tout résultat positif de sérologie *E. coli* ainsi que tout résultat positif comme négatif de sérologie *E.coli* concernant des enfants de moins de 15 ans et transmission des résultats par fax à l'InVS.

Concernant les *Shigella*, la surveillance se fait également en signalant à l'InVS, tout cas groupé, toute épidémie de cas à *Shigella* diagnostiquée au laboratoire, par l'intermédiaire des fiches de renseignement reçues au CNR pour *Shigella sonnei* et le signalement de la même façon des épidémies potentielles.

Le CNR signale au Réseau Européen de surveillance des *E. coli* entérohémorragiques (ECDC-FWD) de souches ayant le même sérotype que certaines souches épidémiques signalées en Europe.

#### 5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

##### 5.1 Enseignement / formation

- Cours de Bactériologie médicale de l'Institut Pasteur le 23 mars 2011 : Le genre *Shigella*. (Muriel Macé).
- 12<sup>ème</sup> réunion technique couvoir, Laboratoire Bio Chêne Vert, Châteaubourg (35), le 08 novembre 2011 : Méthodes de typage des *E. coli* (M. Gouali)
- Participation à l'enseignement universitaire sur les *E. coli* intestinaux et extraintestinaux (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian): DCEM1, DES de Biologie, DIU de Pathologie infectieuse pédiatrique (organisé par le Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique), Hôpital Saint Vincent de Paul Paris (3 heures par an), Internes de Pédiatrie et de Biologie au sein de l'hôpital Robert Debré
- Participation à l'enseignement du cours de Bactériologie médicale à l'Institut Pasteur
- 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 techniques de laboratoire (E. Bingen et P. Mariani-Kurkdjian)
- Formation continue des biologistes à la faculté de Pharmacie Paris V (Bioforma)
- Participation **à l'enseignement de la Recherche** pour la formation de stagiaires et la préparation de DEA et de thèses d'université.
- Information du grand public avec 70-100 interviews (presse écrite, radiophonique et télévisée) données par les cadres du CNR-ECS-LA.
- Conférence destiné au grand public dans le cadre de Pasteurdon : les crises sanitaires à *E. coli* en 2011 (FX WEILL)

**Stagiaires** : le CNR-ECS reçoit de nombreux stagiaires étrangers, dont certains du réseau international des Instituts Pasteurs, 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.

#### Liste des stagiaires du LA-RD en 2011

- Damien DUPONT - Identification d'une région plasmidique conservée (CVP) et étude de son rôle dans la virulence d'une souche de *Escherichia coli* appartenant au groupe phylogénétique B1, isolée d'une méningite néonatale Master M2-Paris XI - 2011

- Maryline CHOMTON - Evaluation de la phagothérapie dans des modèles de sepsis et de méningite à *Escherichia coli* producteurs de bêta-lactamase à spectre élargi ; Master M2 - Paris XI - 2011

## **5.2 Information et conseil aux biologistes et praticiens**

La plupart des informations concernant le CNR-ECS-LA (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 dont voici le lien :

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-escherichia-coli-et-shigelles/identite-et-coordonnees>

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

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

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

Par ailleurs, dès la survenue des premiers cas liés à *E. coli* O104:H4, le CNR-ECS-LA a mis en place une fiche d'informations téléchargeable sur le site du CNR, permettant aux biologistes d'être informés des caractéristiques de la souche épidémique de *E.coli* O104:H4, du dispositif mis en place par l'ARS pour détecter le plus rapidement possible les cas en rapport avec l'épidémie allemande et rappelant les modalités de prélèvements, de transport et d'envoi des prélèvements de selles et/ou de souches au CNR-ECS-LA.

## **5.3 Diffusion des données de surveillance à l'InVS**

Les résultats obtenus concernant la surveillance du SHU des enfants de moins de 15 ans (selles, souches et sérologie) SHU sont communiqués dès signature à l'InVS par téléphone ou par fax.

Les épidémies potentielles détectées sont signalées par téléphone à l'InVS afin de vérifier si l'épidémie est connue et s'informer de l'enquête éventuellement en cours à leur niveau.

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

#### **5.4 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 sérotypage moléculaire, MLST 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 diagnostic, de prévention et de traitement.

En 2011, le CNR-ECS-LA a poursuivi son activité au sein du groupe de travail de l'ANSES (ex AFSSA) GT-EHEC créé en 2010 suite à la saisine de l'AFSSA par la DGS et la DGAL d'une demande d'avis relatif à la révision de la définition des EHEC majeurs typiques, à l'appréciation quantitative des risques liés à ces bactéries à différentes étapes de la chaîne alimentaire, selon les différents modes de consommation des steaks hachés et à la prise en compte du danger lié aux *E. coli* entéropathogènes (EPEC) dans les aliments.

Un premier avis de l'ANSES a été rendu le 27 mai 2010 pour répondre à la première question relative à la révision de la définition des EHEC pathogènes. Le second avis de l'ANSES finalisant les réponses aux questions a été présenté aux autorités le 14 mars 2011.

Le 11 juillet 2011, Mr Xavier Bertrand, Ministre du Travail, de l'Emploi et de la Santé et le Dr Jean-Yves Grall, Directeur Général de la Santé accompagnés par le Professeur Alice Dautry, Directrice Générale de l'Institut Pasteur ont visité le CNR-ECS. L'implication du CNR lors des épidémies de l'été 2011 a été récompensée. Une lettre de félicitations du Ministre du Travail, de l'Emploi et de la Santé a été envoyée au CNR-ECS.

## **6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR-ECS-LA**

### **6.1 *E. coli***

#### ***E. coli* extra intestinaux (laboratoire associé (LA-RD))**

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

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

### **6.2 *Shigella***

#### **a. Génétique et génomique évolutive de *Shigella***

##### **\* Etude de la structure des populations de *S. sonnei***

Ce projet a été initié par le Pr Gordon Dougan du Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge (Royaume Uni) afin d'étudier par séquençage complet (méthodologie Illumina) une collection représentative mondiale de 132 souches de *S. sonnei*.

Le CNR a participé de façon majeure à cette étude en sélectionnant dans sa collection 54 souches acquises entre 1943 et 2007 sur différents continents à l'aide de méthodes classique (biotypage) ou moderne (MLVA [Filliol-Toutain et al. Emerg Infect Dis 2011] ou CRISPR) de sous-typage et en assurant l'analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Cette étude a mis en évidence que la population de *S. sonnei* a moins de 500 ans et qu'elle serait originaire d'Europe d'où ont été isolées 4 lignées génétiques. La lignée III (correspondant au biotype « g ») est actuellement en expansion, notamment en Asie, et ce depuis l'acquisition d'un intégron de classe II au cours des années 1960-1970. Les données issues des méthodes de sous-typage classique étaient corrélées à celles issues du séquençage complet (Holt et al. Out of Europe : The recent global dissemination of *Shigella sonnei*. Nature Genetics en révision).

Une analyse par séquençage est en cours pour suivre les populations de *S. sonnei* circulant parmi les écoles confessionnelles en Amérique du Nord, en Europe et en Israël.

##### **\* Étude de l'évolution génomique de *S. dysenteriae* de type 1**

*Shigella dysenteriae* de type 1 (Sd1) ou Bacille de Shiga est une bactérie entéropathogène très importante en Santé Publique car elle a un potentiel épidémiogène (responsable de grandes épidémies dans les pays en voie de développement et est parfois importée en France chez des voyageurs), elle possède comme facteur de virulence la Shiga-toxine, elle est multi-résistante aux antibiotiques, (iv) et c'est un agent infectieux potentiel pour le bioterrorisme.

Le CNR a initié une étude de génétique des populations de cet agent pathogène à partir d'une collection de plus de 100 souches issues du CNR-IP, du CDC d'Atlanta et de l'ICDDR, Dhaka, Bangladesh, collection représentant la plus grande biodiversité possible (souches isolées de 1918 à nos jours sur les différents continents). Toutes ces souches ont été caractérisées par les méthodes traditionnelles et par PFGE, méthode de sous-typage souvent prise en défaut du fait de nombreuses séquences d'insertion mobiles dans le génome de Sd1.

L'analyse de la sensibilité aux antibiotiques de cette collection a permis d'identifier les 1ères souches multirésistantes lors de la grande épidémie d'Amérique centrale en 1969-1972. Cette résistance à la streptomycine, aux sulfamides, au chloramphénicol et à la tétracycline était médiée par un plasmide de type incB. De 1972 à 1981, plusieurs autres plasmides, de types incX ou incII, entraînant une résistance additionnelle aux aminopénicillines et au cotrimoxazole ont été identifiés. Nous avons mis en évidence qu'au cours des années 1980 à partir de l'Inde, la très grande majorité des souches avait acquis dans le chromosome un îlot de pathogénicité (le PAI) comportant une région de multirésistance aux antibiotiques (le SRL).

Pour connaître les relations entre les différentes populations bactériennes circulant à l'heure actuelle ou au cours des dernières décennies, notamment leur dynamique au regard des stratégies antibiotiques, il est nécessaire de pouvoir disposer d'une méthode de sous-typage informative sur le plan phylogénétique. Une analyse préliminaire par la méthode de référence de génétique des populations bactériennes, le MLST, sur 38 souches n'avait montré la présence que de deux séquençotypes, ST146 et ST260 (ne différant que par une mutation ponctuelle [ou Single Nucleotide Polymorphism, SNP] dans le gène *fumC*). Nous avons donc initié une étude de séquençage par la méthode Illumina/Solexa sur 107 souches représentatives. L'analyse bioinformatique à la recherche de SNPs informatifs et de marqueurs évolutifs (prophages, îlots génomiques) est en cours. Six plasmides de grande taille sont également en cours de séquençage par une approche 454 pour comprendre la genèse du SRL-PAI.

#### **\* Etude de la structure des populations de *S. flexneri***

Ce projet a été initié par le Pr Nicholas Thomson du Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge (Royaume Uni) afin d'étudier par séquençage complet (méthodologie Illumina) une collection représentative mondiale de 300-500 souches de *S. flexneri*

Le CNR a participé de façon majeure à cette étude en sélectionnant dans sa collection 113 souches acquises entre 1918 et 2009 sur différents continents et en assurant l'analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques. L'analyse génomique est actuellement en cours.

### **b.Méthodes de typage des souches de *Shigella***

#### **\* Caractérisation des séquences du gène *fliC* chez *Shigella*:**

Les souches de *Shigella* étant immobiles, le gène de la flagelline est considéré comme cryptique. Il existe une corrélation entre les allèles de *fliC* et le sérotype des *Shigella*. Ceci a été démontré au CNR-ECS par analyse des profils de restriction de *fliC* (Roney et al. J Clin Microbiol. 2001).

En 2009, le CNR a continué à compléter sa base de séquences *fliC* avec 158 souches représentatives des différents sérotypes de *Shigella*. L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence la présence de séquences d'insertion (IS) chez différents sérotypes (*S. boydii* 7,

16 & 17; *S. dysenteriae* 1, 9, 11 et 13). Après suppression des IS, des clusters de séquences *fliC* ont été mis en évidence :

- cluster 1 : *S. boydii* 1-4, 6, 8, 10, 14, 18-20 ; *S. dysenteriae* 3-7, 9, 11-15, sérotypes provisoires 93-119 et 97-10607 ; *S. flexneri* 6.
- cluster 2 : *S. boydii* 5, 7, 9, 11-12 sérotype provisoire E1621-54; *S. flexneri* 1-5
- cluster 3 : *S. boydii* 15-17
- cluster 4 : *S. sonnei* des différents biotypes.

Certain sérotypes ont des séquences *fliC* spécifiques: *S. boydii* 13; *S. dysenteriae* 1, 8, 10.

Certain stéréotypes n'ont pu être amplifiés par PCR malgré différents essais avec différentes amorces : *S. dysenteriae* 2, sérotype provisoire BEDP 02-5104, et quelques *S. boydii* 12. L'explication la plus probable est que le gène *fliC* ou une région du gène soit délété pour ces sérotypes de *Shigella*.

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

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

Un locus CRISPR avait été mise en évidence chez *E. coli* par Jensen et al, en 2002 (Mol. Microbiology). Nous avons évalué sa présence dans les génomes publiés de *E. coli* et *Shigella*. Deux loci CRISPR (1 et 2) ont été mis en évidence. Depuis 2009, le CNR a amplifié et séquencé 125 souches représentatives des différents sérotypes de *Shigella* pour le locus 1 et 29 souches pour le locus 2. L'analyse des résultats obtenus sur le locus 1 de 125 souches a permis de définir 2 importants clusters présentant une identité parfaite dans la composition en espaceurs du locus 1 :

- cluster 1 : *S. boydii* 1-5, 6-8, 1, 14, 18-20 ; *S. dysenteriae* 3-6, 9, 11-13, 15 sérotypes provisoires 97-10607 ; *S. flexneri* 6.
- cluster 2 : *S. boydii* 12, sérotype provisoire E1621-54, *S. flexneri* 1-5.

#### **\* Construction d'une base de données de « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) pour les différents sérotypes de *Shigella***

Le CNR est en train de développer une base de données MLST en suivant le protocole du «University College Cork» (<http://mlst.ucc.ie/>) utilisant 7 gènes de ménage :

*adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase), *recA* (ATP/GTP binding motif)

Le séquençage de souches de *Shigella* de différents sérotypes a débuté en 2009, et se poursuivra en 2012 afin d'obtenir une base représentative de tous les profils MLST (séquencotype, ST) des *Shigella*. A l'heure actuelle, plus de 200 souches ont été typées.

## 7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2011

### 7.1 Publications nationales

Gault G, Weill FX, P, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King NL, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Macé C, Bingen E, Noël H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigné E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P.

Épidémie de syndrome hémolytique et urémique et de diarrhée sanglante due à *Escherichia coli* O104:H4 dans le sud-ouest de la France, juin 2011. *BEHWeb* N°3 / 22 juillet 2011

### 7.2 Publications internationales

- Taneja N, Nato F, Darteville S, Sire JM, Garin B, Thi Phuong LN, Diep TT, Shako JC, Bimet F, Filliol I, Muyembe JJ, Ungeheuer MN, Ottone C, Sansonetti P, Germani Y. Dipstick test for rapid diagnosis of *Shigella dysenteriae* 1 in bacterial cultures and its potential use on stool samples. *PLoS One*. 2011;6(10):e24830.
- Badri S, Fassouane A, Filliol I, Hassar M, Cohen N. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat marketed in Casablanca (Morocco). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2011 Mar 1;57 Suppl:OL1476-7.
- Filliol-Toutain I, Chiou CS, Mammina C, Gerner-Smidt P, Thong KL, Phung DC, Pichel M, Ranjbar R, Sow AG, Cooper K, Ribot E, Binsztein N, Liang SY. Global Distribution of *Shigella sonnei* Clones. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1910-2.
- Gault G, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-Da Silva N, King L, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Mace M, Bingen E, Noel H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigne E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Euro Surveill*. 2011 Jun 30;16(26).
- Monecke S, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Weill FX, Balière C, Slickers P, Ehricht R. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Dec;77(24):8784-6.  
Presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* ST678/O104:H4 in France prior to 2011.
- Aldabe B, Delmas Y, Gault G, Vendrely B, Llanas B, Charron M, Castor C, Ong N, Weill F, Mariani-Kurkdjian P, Terrier F, Desjardin M, Simoes J, Le Bihan B, Combe C, Rolland P. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O104:H4, south-western France, June 2011. *Euro Surveill*. 2011 Aug 4;16(31).
- Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis*. 2011 Oct;11(10):732-3

- Loron G, Olivier P, See H, Le Saché N, Angulo L, Biran V, Brunnelle N, Besson-Lescure B, Kitzis MD, Pansiot J, **Bingen E**, Gressens P, Baud O, **Bonacorsi S**. Ciprofloxacin prevents myelination delay in neonatal rats subjected to *E. coli* sepsis. **Ann Neurol**. 2011 Feb ; 69(2) : 341-51
- Mahjoub-Messai F, Bidet P, Caro V, Diancourt L, Biran V, Aujard Y, **Bingen E**, **Bonacorsi S**. *Escherichia coli* isolates causing bacteremia via gut translocation and urinary tract infection in young infants exhibit different virulence genotypes. **J Infect Dis**. 2011 Jun 15; 203:1844-9.
- Le Sache N, Baud O, Pansiot J, Pham H, Biran V, Brunel-Meunier N, Bidet P, Kitzis MD, Gressens P, **Bingen E**, Charriaut-Marlangue C, and **Bonacorsi S**. Moxifloxacin combined with cefotaxime compared to cefotaxime gentamicin combination on prevention of white matter damage associated with *Escherichia coli* sepsis in neonatal rats. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011;55:3567-9.
- Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, **Bingen E**, **Bonacorsi S**. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by O25b:H4-ST131 *E. coli* strain producing CTX-M-15. **Antimicrob Agent Chemother** 2012 Apr 9.

### 7.3 Communications internationales

- King LA, Gault G, **Weill FX**, **Mariani-Kurkdjian P**, Loukiadis E, **Bingen E**, **Macé M**, Thevenot D, Rolland P, De Valk H. Outbreak of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. VTEC 2012, Amsterdam, mai 2012 (Poster).
- Loukiadis E, **Mariani-Kurkdjian P**, Ganet S., Balière C, Neto M, Gleizal A, Gaillot O, Spinali S, **Weill FX**, **Bingen E**, Beutin L, Thevenot-Segentet D. First isolation of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in minced beef responsible for hemolytic and uremic syndrome in France in 2011 VTEC 2012, Amsterdam, may 2012 (Poster).

## 8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013

### 8.1 Apporter une expertise microbiologique

#### 8.1.1 Infections à *E. coli* entéro-hémorragiques

- **Diagnostic des infections à *E. coli* entéro-hémorragiques**

Dans le cadre du diagnostic des infections à EHEC, le CNR-ECS-LA :

Réaliser une identification biochimique du genre *Escherichia* et dans le cas de souches difficilement identifiables biochimiquement, la PCR du gène *uid* et/ou le séquençage du gène *rpoB* permettant de confirmer l'identité de la souche en déterminant le genre ou l'espèce grâce à sa banque de données pour toutes les entérobactéries.

Puis le CNR-ECS-LA effectuera de façon systématique :

- l'agglutination des souches d'origine intestinale avec les antisérums :

O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164

- la recherche par PCR des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae* et *hlyA* sur souches bactériennes d'origine intestinale et dans les selles d'adultes.

- la recherche d'anticorps anti-LPS (IgA et IgM) des principaux sérotypes d'EHEC O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157 et O104) dans le sérum par la méthode de line-blot.

Les gènes de virulence des autres pathovars de *E. coli* seront recherchés après entente préalable et en connaissance du contexte clinique ou épidémiologique.

Le CNR-ECS réalisera un sérotypage moléculaire par la méthode *rfb*-RFLP et le séquençage du gène de flagelline *fliC* dans le cas de souches non-sérotypables.

Toujours, dans un but diagnostique, le LA-RD réalisera :

- la recherche par PCR des gènes de virulence dans les selles d'enfants et sur les souches isolées de selles d'enfants qui lui sont adressées.

- la recherche des variants des gènes de virulence.

- le sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145.

- **Développement de nouvelles méthodes de diagnostic des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et en particulier des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) pouvant être utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale.**

Du fait de l'hétérogénéité génétique des STEC, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode simple et standardisée pour leur identification dans les laboratoires d'analyses. Une collaboration scientifique avec l'équipe d'Eric Oswald (CHU de Toulouse, USC INRA,

U1043 INSERM et Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) va être initiée durant le mandat 2012-2016. Un des aspects de cette collaboration sera de réfléchir à de nouvelles approches diagnostiques compatibles avec une application dans les laboratoires de biologie médicale.

Le laboratoire associé va également évaluer l'utilisation de puces ADN commercialisées comprenant 77 cibles et 11 sérotypes O et H.

- **Elaboration, mise à disposition, diffusion de guides techniques relatifs au diagnostic de ces infections destinés aux laboratoires de biologie médicale**

Le CNR-ECS-LA va poursuivre le travail d'information des laboratoires et de formation de stagiaires déjà entrepris. Dès qu'une méthode sera validée dans les 2 laboratoires, elle sera mise à disposition des laboratoires intéressés ainsi que cela a été fait pour la technique de PCR sur les selles qui a été transférée à différents centres hospitaliers (Besançon, Rennes, Lyon, Pontoise, Nancy). Des revues sur le diagnostic des EHEC seront écrites dans les journaux francophones à forte audience parmi les biologistes comme l'article de référence sur les EHEC publié dans la Revue Francophone des laboratoires en 2008.

### **8.1.2 *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (LA-RD)**

- **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**

- Génotypage de *E. coli* responsables de méningite néonatale (ECMN)

Les souches seront caractérisées par leur appartenance à un groupe phylogénétique par leur empreinte de virulence et par leur antigène somatique.

- Le groupe phylogénétique sera déterminé par une PCR multiplex permettant de distinguer les 4 principaux groupes (A, B1, B2, D)

- Les empreintes de virulence comporteront la recherche par PCR de 10 gènes de virulence suivants :

- Adhésines : pfimbriae (*papC*, *papGII*, *papGIII*), Sfimbriae (*sfa/foc*)
- Toxines : hémolysines (*hlyC*), cytotoxique nécrotisant (*cnf1*)
- Systèmes de capitation du fer : yersiniabactine (*fyuA*), aerobactine (*iucC*), salmochéline (*iroN*)
- Invasives : invasive brain endothelial cell (*ibeA*)

La PCR multiplex de groupage a été mise au point dans le LA-RD et constitue actuellement l'une des méthodes de référence utilisée dans le Monde (Clermont et al, 2000). De plus, nous avons mis au point une PCR multiplex permettant la recherche de l'ensemble des facteurs sus-cités en seulement 2 PCR.

Les sérogroupes les plus fréquents sont recherchés par une PCR multiplex mise au point dans le laboratoire. 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 en temps réel chaque souche à un groupe clonal. Ce résultat confronté aux données cliniques de chaque patient.

Rétrospectivement, les souches seront de plus, caractérisées par la technique MLST (Bidet et al, J Infec Dis 2007). La combinaison du ST et du sérotype O permet d'identifier au sein des souches responsables de pathologies extra-intestinales, 49 sous-types, certains étant plus particulièrement associés aux souches responsables d'urosepsis (STc27 (O2), STc27(6) ou à des méningites. Ces caractérisations standardisées permettent de comparer les souches sur le plan international (Mahjoub-Mesai et al, JID 2011).

Le laboratoire associé 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 PFGE. Ces investigations bénéficieront de l'expérience du laboratoire depuis une quinzaine d'années dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire ce qui a permis de constituer une banque de profils type.

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

Le LA-RD apportera une expertise pour l'aide au diagnostic des méningites néonatales décapitées par une antibiothérapie par la réalisation de PCR spécifiques 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, Infection and Immunity, 2004)

- **Etude et suivi de la résistance des souches aux antibiotiques en lien avec le CNR de la résistances 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 être ainsi déterminée. La présence de BLSE sera caractérisée sur le plan moléculaire à l'aide d'une PCR multiplex (Dallenne et al, J. Antimicrob Chemother 2010). Les souches présentant des résistances particulières seront adressées au CNR de la résistance aux antibiotiques.

### **8.1.3 Infections à *Shigella***

- **Contribuer au développement de méthodes de typage**

Une base de données moléculaire *rfb*-RFLP, séquences *fliC*, CRISPR et MLST sur Bionumerics sera complétée pour tous les sérotypes de *Shigella* (souches de référence et souches cliniques représentatives). Les données MLST seront soumises sur le site MLST de l'University College Cork, Irlande. Les souches de nouveaux sérotypes ou non-sérotypables seront également étudiées par cette approche. Les nouveaux sérotypes et les sérotypes provisoires seront décrits dans des publications internationales.

- **Identifier et typer les souches**

Nous allons poursuivre l'identification et le typage (par la méthode la plus adaptée) de toutes les souches adressées au CNR-ECS que ce soit dans le cadre de la surveillance ou dans le cadre d'investigations. Notre capacité annuelle est de 10-15000 souches pour le sérotypage, 2000-3000 pour l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques, 1000 souches par an pour le MLVA et 500 souches pour le PFGE. Toutes les souches seront conservées indéfiniment en tube gélosé dans une pièce climatisée dédiée à la collection. Les souches précieuses ou fragiles c'est-à-dire les souches de *S. dysenteriae* de type 1, les souches ayant fait l'objet d'un séquençage complet, d'une analyse MLST ou CRISPR, les souches de référence des nouveaux sérotypes ou des nouveaux CRISPOL types possédant des résistances particulières aux antibiotiques seront conservées à -80°C dans l'unité BPE. La mise à disposition des souches se fera après accord des responsables du CNR dans le cadre d'un MTA (Material Transfer Agreement).

- **Suivre l'évolution de la résistance des *Shigella* aux antibiotiques à étudier les mécanismes de résistance, en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques,**

Nous allons poursuivre l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide de méthodes standardisées (antibiogrammes suivant le CA-SFM et si nécessaire CMI par la technique des E-Tests) pour toutes les souches de *Shigella*.

La recherche de la résistance à l'azithromycine à l'aide d'un disque sera effectuée pour toutes les souches de *Shigella sonnei* AMX<sup>R</sup>-SXT<sup>R</sup>

## **8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS)**

- **En transmettant à l'InVS, en temps réel, les résultats concernant les infections à EHEC,**

Le CNR et le Laboratoire associé continueront de transmettre quotidiennement à l'InVS par fax et par courrier tous les foyers de cas groupés à un même groupe de EHEC (épidémies familiales, hospitalières, scolaires, crèches, toxi-infections alimentaires collectives, infections collectives) signalées au CNR-ECS-LA par les laboratoires correspondants. Tous les phénomènes d'importance seront communiqués sans attendre par téléphone.

- **En participant à l'investigation des cas groupés (typage de souches, comparaison des souches isolées chez les malades et dans d'autres sources,..)**

Le CNR-ECS-LA va poursuivre sa participation à l'investigation des cas groupés en collaboration avec l'InVS.

Les souches EHEC d'origine humaine ou non seront étudiées de la façon suivante par :

\* **RAPD** par le LA-RD qui effectue cette méthode de façon courante dans le cadre d'investigations d'infections nosocomiales et à la demande de services extérieurs dans le cadre d'investigations d'épidémies.

### \* Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Le CNR-ECS réalisera la méthode PFGE standardisée (protocole PulseNet) avec l'enzyme *XbaI* (ou un second si nécessaire) dans un délai d'une semaine. Chaque série de 18 souches nécessitant 3-4 jours de manipulation. Les profils seront intégrés à la base de données BioNumériques du CNR. Les images TIFF ou les fichiers xml pourront être échangés avec d'autres laboratoires nationaux ou internationaux.

Le LA-RD réalise le PFGE dans le cadre d'investigations d'infections nosocomiales et a utilisé cette méthode pour étudier la diversité génétique des souches françaises de *E. coli* O157:H7 (Bidet et al. J Med Microbiol 2005). Le LA-RD va poursuivre son activité de typage par PFGE dans le cadre du plan quinquennal comme cela a été réalisé précédemment. Le laboratoire associé a acquis une expérience en matière de comparaison des souches (Bonacorsi et al. Int J Med Microbiol 2009) et à ce titre, a obtenu, l'appel d'offre pour l'innovation technologique de l'APHP en 2009 et est coordonnateur de ce projet : évaluation médico-économique d'une méthode semi-automatique rapide de typage moléculaire bactérien dans le but de distinguer les cas épidémiques des cas sporadiques.

Le LA-RD poursuivra une évaluation comparative de deux méthodes d'analyse globale du génome des souches EHEC : l'analyse par PFGE et la spectroscopie Raman. Si la comparaison est satisfaisante, cette dernière méthode sera utilisée par le LA-RD en raison de la rapidité de sa réponse (moins de 10 mn).

#### ➤ Sérotypage moléculaire

Le CNR-ECS réalisera le sérotypage moléculaire des *E. coli* non sérotypables par la méthode *rfb*-RFLP et le séquençage du gène de flagelline *fliC*.

Le LA-RD réalisera le sérotypage par PCR multiplex, permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145.

- **En développant la capacité du CNR-ECS, lors de la survenue d'épidémies, à typer rapidement par une méthode, la plus discriminante possible (adaptée en fonction du sérotype en cause) les souches incriminées afin de différencier les cas épidémiques et non épidémiques et de comparer des souches isolées chez les malades et dans d'autres sources en particulier alimentaire.**

Le CNR-ECS-LA va poursuivre son expertise microbiologique lors d'investigations d'épidémies en collaboration avec l'InVS (pour le choix des souches épidémiques ou non épidémiques), l'ENV-Lyon (LNR) et l'ANSES-Maison Alfort (pour analyser en parallèle les souches représentatives d'origine alimentaire). Il mettra en œuvre, le plus rapidement possible, la méthode la plus appropriée (MLST, MLVA, PFGE, CRISPR, autres techniques...) et les résultats seront comparés aux souches épidémiques ou pas de la collection du laboratoire.

- **En suivant les tendances évolutives temporelles des différentes espèces de *Shigella* en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire,**

Le réseau du CNR date des années 50, c'est un réseau stable (environ 1400-1500 laboratoires), il possède une bonne couverture géographique et est relativement exhaustif. La dernière enquête CNR-AFSSAPS dans le cadre du contrôle national de qualité a montré que le CNR avait connaissance de 54% des isollements de *Shigella*. La mise en place du site web-Voozadoo opérationnel dans quelques semaines permettra de remplacer les fiches d'informations et raccourcira ainsi les délais d'information du CNR concernant l'isolement des souches de *Shigella*.

- **En collaborant avec les structures en charge de la surveillance des STEC chez l'animal dans les aliments et dans l'environnement (échanges de souches...)**

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme l'Ecole Vétérinaire de Lyon (Dr Thevenot et Dr Loukiadis) et de Maison-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.

- **En contribuant aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.**

Le CNR-ECS participe depuis plusieurs années au réseau européen de surveillance Enter-Net devenu ECDC-FWD qui est chargé de la surveillance internationale des infections gastro-intestinales humaines (*E. coli* entérohémorragiques). Le CNR-ECS-LA participe chaque année à des contrôles qualité externes internationaux sur le « sérotypage, détection de gènes de virulence et PFGE de souches STEC ou *E. coli* » organisés par ce réseau. Par ailleurs, le CNR-ECS-LA transmet ses données trimestriellement via l'InVS à ce réseau européen et répond aux demandes d'informations qui lui sont adressées par l'ECDC-FWD ou par d'autres réseaux comme l'EFSA.

**Dans le cadre des infections à *E. coli* extra-intestinaux,**

- **Développer un réseau national 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 (léthalité, séquelles neurologiques...)**

Le Pr E. Bingen est coordinateur 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 de 259 services de pédiatrie et 168 services de bactériologie répartis dans toute la France.

La constitution d'un répertoire de données grâce au réseau constitué par l'observatoire des méningites bactériennes de l'enfant représente une opportunité unique d'établir sur le plan

national de la caractérisation des méningites à *E. coli* sur le plan clinique, pronostic et thérapeutique en relation avec la virulence des souches. A notre connaissance, il n'existe aucune étude récente de ce type sur un nombre significatif de patients. Par ailleurs, au cours de ces dernières années, de nombreux facteurs ont modifié le devenir de ces nouveau-nés : les progrès dans la prise en charge des prématurés mais aussi l'augmentation des naissances prématurées et du degré de prématurité, l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance et l'utilisation des nouvelles fluoroquinolones pour la prévention des localisations parenchymateuses cérébrales. Tous ces éléments nécessitent un suivi de l'évolution des caractéristiques cliniques de ces infections.

Grâce à ce réseau, le recueil exhaustif des données cliniques auprès de chaque service de pédiatrie permettra de mieux caractériser la méningite à *E. coli*, notamment sur les antécédents familiaux, le déroulement de la grossesse, de l'accouchement et des suites de couches, l'examen clinique à la naissance et le terme de l'enfant, les antécédents personnels, le tableau clinique au moment de la prise en charge de la méningite, l'évolution avec en particulier, l'apparition de complications et localisations parenchymateuses. Le bilan infectieux réalisé sera détaillé ainsi que l'antibiogramme de chaque souche. Enfin, la prise en charge thérapeutique sera étudiée en particulier avec le type, la dose et la durée des antibiotiques.

Parallèlement à la caractérisation clinique, la caractérisation génétique des souches de *E. coli* sera réalisée au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Robert Debré.

Notre approche intégrée clinique et moléculaire permet une meilleure prise en charge clinique des méningites néonatales tant sur le plan préventif que sur le plan curatif.

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

Grâce au réseau de l'Observatoire national des méningites, le LA-RD signalera à l'InVS, toute augmentation significative de cas liés à un clone ainsi que la survenue de formes cliniques particulières ou de souches inhabituelles.

### **8.3 Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel**

Le CNR-ECS-LA poursuivra sa collaboration quotidienne avec l'InVS en signalant et en participant activement à l'investigation de tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles...), survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles,

## 9. COLLABORATION AVEC LA PF8

**La collaboration avec la plateforme Génotypage des Pathogènes et Santé Publique PF8** est essentielle au CNR-ECS et ceci a différents niveaux :

- **CNR-ECS (IP) :**

- Diagnostic différentiel *E. coli-Shigella* et autres bactéries : dans le cas de souches ayant des propriétés biochimiques ne permettant pas une identification formelle, nous réalisons une PCR *rpoB* et le séquençage réalisé par la PF8 permet de déterminer ou non l'appartenance à la famille *E. coli* et *Shigella*.
- Le sérotypage moléculaire de l'antigène H de toutes les souches d'*E. coli* non agglutinables *stx+* est réalisé par séquençage du gène *fliC* à la PF8. Les séquences obtenues sont comparées à la base de données du CNR.
- Dans le cadre de plusieurs projets de recherche la PF8 est un élément essentiel au CNR puisqu'elle assure les missions suivantes :
  - Caractérisation des gènes de résistances aux antibiotiques de *Shigella* par séquençage des différents gènes responsables de la résistance.
  - Mises en place d'une base de séquences MLST et CRISPR pour les différents sérotypes de *Shigella*
  - Séquençage des génomes de *S. dysenteriae* 1 et analyse bioinformatique des gènes contenant des SNPs informatifs

- **Laboratoire associé au CNR-ECS (RD) :**

Dans le cadre de l'appel à projet du DIM Maladies infectieuses, Parasitaires et nosocomiales émergentes (Ile de France), la plateforme PF8 de l'Institut Pasteur coordonnera un projet de séquençage consistant à étudier la microévolution de clones virulents d'*E. coli* O157:H7 et K1 auquel le laboratoire RD participera.