



# CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Laboratoire associé au CNR  
*Clostridium difficile*



Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales  
Hôpital St Antoine, Paris

\*  
\* \*

## RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2019 Année d'exercice 2018

CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme  
Nadine DELARUE, Laure DIANCOURT, Julie GERMOND, Malika GOUALI, Christelle MAZUET, Jean SAUTEREAU

Laboratoire associé *Clostridium difficile*  
Frédéric BARBUT, Cécile GATEAU, Jeanne COUTURIER

## SOMMAIRE

Résumé analytique (version française) .....	6
Résumé analytique (version anglaise).....	7
<u>LIVRE I RAPPORT ANNUEL DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME.....</u>	<u>9</u>
1- MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME.....	9
2- ACTIVITES D'EXPERTISE .....	9
<b>2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2018 .....</b>	<b>10</b>
<b>2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses.....</b>	<b>10</b>
<b>2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....</b>	<b>10</b>
<b>2-4 Collections de matériel biologique .....</b>	<b>10</b>
<b>2-5 Activités d'expertise .....</b>	<b>10</b>
2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis <i>Clostridium difficile</i> ) .....	10
2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme .....	11
<b>2-6 Activités de séquençage génomique (WGS, NGS...).....</b>	<b>12</b>
2-6-1 Accès aux plateformes de séquençage de l'Institut Pasteur .....	12
2-6-2 Accès à une expertise bio-informatique .....	13
2-6-3 Appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique.....	13
2-6-4 Stockage et dépôt des données brutes .....	13
3- ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....	14
<b>3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....</b>	<b>14</b>
3-1-1 Surveillance du botulisme.....	14
3-1-1-1 Réseau de partenaires.....	14
3-1-1-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du botulisme.....	14
3-1-1-3 Botulisme agro-alimentaire et environnemental .....	16
3-1-1-4 Botulisme animal.....	17
3-1-2 Surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis <i>Clostridium difficile</i> ).....	18
3-1-2-1 Souches d'origine humaine.....	18
3-1-2-2 Investigations de TIAC à <i>Clostridium perfringens</i> .....	20
3-1-2-3 Souches d'origine vétérinaire.....	21
3-1-2-4 Souches d'origine alimentaire.....	22
<b>3-2 Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (<i>hormis Clostridium difficile</i>) .....</b>	<b>22</b>
<b>3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....</b>	<b>24</b>
<b>3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisées.....</b>	<b>24</b>
4- ALERTE.....	25
5- ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....	26
<b>5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....</b>	<b>26</b>
5-1-1 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé.....	26
5-1-2 Activités de conseils aux professionnels de santé .....	26
<b>5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires .....</b>	<b>26</b>
6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	27
<b>6-1 Travaux de recherche .....</b>	<b>27</b>
6-1-1 Travaux de recherche sur la toxine botulique et <i>C. botulinum</i> .....	27

6-1-2	Développement d'outils et investigation autour des foyers de botulisme animal	28
6-1-3	Investigation autour d'une suspicion d'épizootie suite à une entérotoxémie à <i>Clostridium septicum</i> .....	29
<b>6-2</b>	<b>Publications et communications 2018</b> .....	<b>29</b>
6-2-1-1	Publications nationales.....	29
6-2-1-2	Publications dans des revues internationales à comité de lecture.....	29
6-2-1-3	Congrès, workshops, séminaires.....	29
7-	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	30
8-	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019.....	31
8-1-1	Bactériologie anaérobie.....	31
8-1-1-1	Expertise en bactériologie anaérobie.....	31
8-1-1-2	Botulisme humain.....	33
8-1-1-3	Botulisme animal.....	33
9-	TABLEAUX.....	36
10-	ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	46
<b>10-1</b>	<b>Missions et objectifs majeurs</b> .....	<b>46</b>
<b>10-2</b>	<b>Equipe</b> .....	<b>46</b>
<b>10-3</b>	<b>Locaux et équipements</b> .....	<b>46</b>
10-3-1	Locaux.....	46
10-3-2	Équipements.....	48
<b>10-4</b>	<b>Collections de matériel biologique</b> .....	<b>48</b>
<b>10-5</b>	<b>Démarche qualité</b> .....	<b>49</b>
11-	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....	51
<b>11-1</b>	<b>Liste des techniques de référence</b> .....	<b>51</b>
<b>11-2</b>	<b>Collection de souches et sérums de référence</b> .....	<b>52</b>
12-	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS.....	53
<b>12-1</b>	<b>Permanence du CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme</b> .....	<b>53</b>
<b>12-2</b>	<b>Autorisation MOT</b> .....	<b>53</b>
<b>12-3</b>	<b>Autorisations d'exercer la biologie médicale</b> .....	<b>53</b>
<b>12-4</b>	<b>Résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo</b> .....	<b>53</b>
<b>12-5</b>	<b>Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N</b> .....	<b>53</b>
<b>12-6</b>	<b>Autres remarques à destination du comité des CNR</b> .....	<b>54</b>
 <u>LIVRE II RAPPORT ANNUEL DU LABORATOIRE ASSOCIE <i>Clostridium difficile</i>.....</u>		 <u>56</u>
1-	MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE.....	56
2-	ACTIVITES D'EXPERTISE.....	56
<b>2-1</b>	<b>Evolution des techniques au cours de l'année 2018</b> .....	<b>57</b>
<b>2-2</b>	<b>Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse</b> .....	<b>57</b>
<b>2-3</b>	<b>Techniques transférées vers d'autres laboratoires</b> .....	<b>57</b>
<b>2-4</b>	<b>Collections de matériel biologique</b> .....	<b>57</b>
<b>2-5</b>	<b>Activités d'expertise</b> .....	<b>57</b>
<b>2-6</b>	<b>Activités de séquençage</b> .....	<b>58</b>
3-	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	58
<b>3-1</b>	<b>Description du réseau partenaire</b> .....	<b>59</b>
<b>3-2</b>	<b>Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections</b> .....	<b>60</b>

<b>3-3</b>	<b>Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....</b>	<b>65</b>
<b>3-4</b>	<b>Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....</b>	<b>66</b>
3-4-1	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France	66
3-4-2	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens	67
3-4-3	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	67
4-	ALERTE.....	69
5-	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....	69
<b>5-1</b>	<b>Conseil et expertise aux professionnels de santé.....</b>	<b>69</b>
5-1-1	Enseignements.....	69
5-1-2	Activités de Formations continues.....	70
5-1-3	Stagiaires accueillis .....	70
5-1-4	Liste des guides élaborés .....	70
5-1-5	Modalités et cibles de diffusion.....	71
<b>5-2</b>	<b>Conseil et expertise aux autorités sanitaires .....</b>	<b>71</b>
<b>5-3</b>	<b>Conseil et expertise pour d'autres cibles .....</b>	<b>71</b>
6-	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS.....	72
<b>6-1</b>	<b>Activités de recherche .....</b>	<b>72</b>
6-1-1	Etude SERODIFF : réponse immunitaire vis-à-vis de <i>C. difficile</i> .....	72
6-1-2	Etude EVADE : évaluation <i>in situ</i> de l'activité sporicide de l'Anioxyfloor .....	72
6-1-3	PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de <i>C. difficile</i> isolées dans une population de prématurés.....	73
6-1-4	Etude DAFNE : Observatoire de l'utilisation de la fidaxomicine en France .....	74
6-1-5	Etude QALIFF : Qualité de vie des patients infectés par <i>C. difficile</i> .....	75
6-1-6	Etude DCDiff : Surmortalité liée aux infections à <i>C. difficile</i> .....	75
6-1-7	Microbiological support to European surveillance of <i>Clostridium difficile</i> infections (2016-2018).....	76
6-1-8	Prévalence des souches de <i>Clostridium difficile</i> productrices de toxine binaire en France.....	76
<b>6-2</b>	<b>Liste des publications et communications .....</b>	<b>77</b>
6-2-1	Publications nationales.....	77
6-2-2	Publications internationales .....	77
6-2-3	Communications nationales .....	78
6-2-4	Communications internationales.....	79
6-2-5	Conférences sur invitations .....	79
6-2-6	Chapitres de livres.....	80
7-	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	80
8-	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2019-2020 .....	81
<b>8-1</b>	<b>Détermination des CMI d'inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de <i>C. difficile</i> et détermination du support génétique de la résistance. ....</b>	<b>81</b>
<b>8-2</b>	<b>Apport du whole genome sequencing (WGS) dans l'épidémiologie des infections à <i>Clostridium difficile</i>. ....</b>	<b>81</b>
<b>8-3</b>	<b>COMBACTE-CDI .....</b>	<b>82</b>
<b>8-4</b>	<b>DIFALIBO.....</b>	<b>83</b>
<b>8-5</b>	<b><i>Clostridium difficile</i> chez les enfants prématurés : relations avec le microbiote intestinal.....</b>	<b>83</b>
<b>8-6</b>	<b>Comparaison du QuickChek GDH et du Quick Chek complete.....</b>	<b>84</b>

<b>8-7</b>	<b>CoNOTOX =Etude des propriétés de souches non toxigènes de <i>Clostridium difficile</i></b> .....	<b>84</b>
9-	ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE.....	86
<b>9-1</b>	<b>Missions et objectifs majeurs du laboratoire associé</b> .....	<b>86</b>
<b>9-2</b>	<b>Organisation du laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i></b> .....	<b>86</b>
<b>9-3</b>	<b>Locaux et équipements du laboratoire associé</b> .....	<b>86</b>
9-3-1	Locaux .....	86
9-3-2	Equipements .....	87
9-3-3	Collections de matériel biologique .....	88
<b>9-4</b>	<b>Démarche qualité</b> .....	<b>88</b>
10-	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE ASSOCIE .....	89
<b>10-1</b>	<b>Liste des techniques de référence</b> .....	<b>89</b>
<b>10-2</b>	<b>Liste des techniques recommandées</b> .....	<b>89</b>
11-	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS .....	90
<b>11-1</b>	<b>Permanence du laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i></b> .....	<b>90</b>
<b>11-2</b>	<b>Autorisation MOT</b> .....	<b>90</b>
<b>11-3</b>	<b>Autorisations d'exercer la biologie médicale</b> .....	<b>90</b>
<b>11-4</b>	<b>Résultats de recherches non encore publiés ou en préparation</b> .....	<b>90</b>
<b>11-5</b>	<b>Difficultés rencontrées par le laboratoire associé</b> .....	<b>90</b>

DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET Christelle MAZUET.....

DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET Frédéric BARBUT.....

## RESUME ANALYTIQUE (VERSION FRANÇAISE)

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

En 2018, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 129 échantillons de sérum, 83 selles et 21 échantillons alimentaires. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 7 foyers confirmés (et 4 foyers suspects) de botulisme impliquant 11 cas (et 4 cas suspects) ont été identifiés. 9 patients ont été hospitalisés dont 6 en service de réanimation. Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (6 foyers confirmés sur 7, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 3 foyers suspects bien que non confirmés). Un foyer (1 cas) de botulisme infantile de type B a également été identifié. Une forte suspicion clinique et biologique d'un foyer (1 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection de Botox à visée esthétique n'a pas pu être confirmée. Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (4 foyers sur 6) et la source potentielle ou avérée de contamination un aliment de préparation familiale. Le foyer (1 cas) le plus grave était de type A, lié à la consommation d'une conserve familiale de lentilles massivement contaminée (80 000 doses létales souris/g). Le type de botulisme d'un des foyers alimentaires n'a pas pu être déterminé.

En 2018, 192 souches de bactéries anaérobies ont été enregistrées par le CNR. Les 143 souches d'origine humaine identifiées se répartissent en 47 genres différents, 74 espèces nommées et 14 souches représentant de nouvelles espèces potentielles. Le séquençage NGS (next-generation sequencing) a été utilisé à l'occasion d'investigations de 3 TIAC à *Clostridium perfringens* survenues cette année. La comparaison génétique des différentes souches de *C. perfringens* entérotoxigènes isolées des aliments suspects et/ou des selles des patients a largement contribué à l'investigation clinique, alimentaire et épidémiologique de ces foyers.

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

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

Au cours de l'année 2018, 343 prélèvements ont été reçus par le laboratoire associé. Parmi ces prélèvements, 319 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxigènes ; 4% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 2 autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 014/020/077 (24%) et le 002 (6%).

L'année 2018 a été marquée par une diminution du nombre de souches 027 épidémiques reçues par le CNR. Seules 7 souches épidémiques ont été caractérisées. Elles provenaient de 6 départements. Cette diminution peut en partie être expliquée par l'utilisation de plus en plus importante par les laboratoires du test GeneXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive des souches 027.

## RÉSUMÉ ANALYTIQUE (VERSION ANGLAISE)

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

In 2018, the CNR proceeded to the biological diagnosis of human botulism from 129 serum samples, 83 stools and 21 food samples. The number of outbreaks and cases of botulism observed in France this year is fairly "standard": 7 confirmed outbreaks (and 4 suspicious ones) of botulism involving 11 cases (and 4 suspected cases) have been identified. 9 patients were hospitalized including 6 in intensive care unit. Food-borne botulism remains the most common form (6 confirmed outbreaks out of 7, and strong suspicion of a food origin for 3 suspected but unconfirmed outbreaks). One outbreak (1 case) of infant botulism type B has also been identified. A strong clinical and biological suspicion of an outbreak (1 case) of iatrogenic botulism type A following cosmetic Botox injection could not be confirmed. As often in France, most of the food-borne outbreaks were of type B (4 out of 6 outbreaks) and the potential or known source of contamination was a home-prepared food. The most severe outbreak (1 case) was of type A, related to the consumption of a massively contaminated family can of lentils (80 000 mouse lethal doses / g). The type of botulism of one of the food outbreaks could not be determined.

In 2018, 192 strains of anaerobic bacteria were registered by NRC. The 143 strains of human origin identified fall into 47 different genera, 74 named species and 14 strains representing potential new species. NGS (next-generation sequencing) was used during investigations of 3 *Clostridium perfringens* food-poisoning outbreaks that occurred this year. Genetic comparison of different strains of enterotoxigenic *C. perfringens* isolated from suspect foods and / or stools of patients has significantly contributed to the clinical, alimentary and epidemiological investigation of these outbreaks.

Although anaerobic bacteria remain generally sensitive to antibiotic treatments, the monitoring of the resistance evolution carried out by the CNR confirms that some species (particularly *Bacteroides* of the *fragilis* group) are becoming more and more resistant, particularly to beta-lactam antibiotics including carbapenems.

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

In 2018, 343 samples were received by the National Reference Laboratory. Among these samples, 319 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 4% were identified as PCR-ribotype 027. The 2 other predominant PCR-ribotypes were 014/020/077 (24%) and 002 (6%).

This year was marked by a decrease in the number of epidemic 027 strains received by the NRL. Only 7 epidemic strains from 6 departments have been characterized. This decrease can be partly explained by the increasing use of the GeneXpert assay for *C. difficile* (Cepheid) which allows a presumptive identification of 027 strains.

## LIVRE I

# CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME

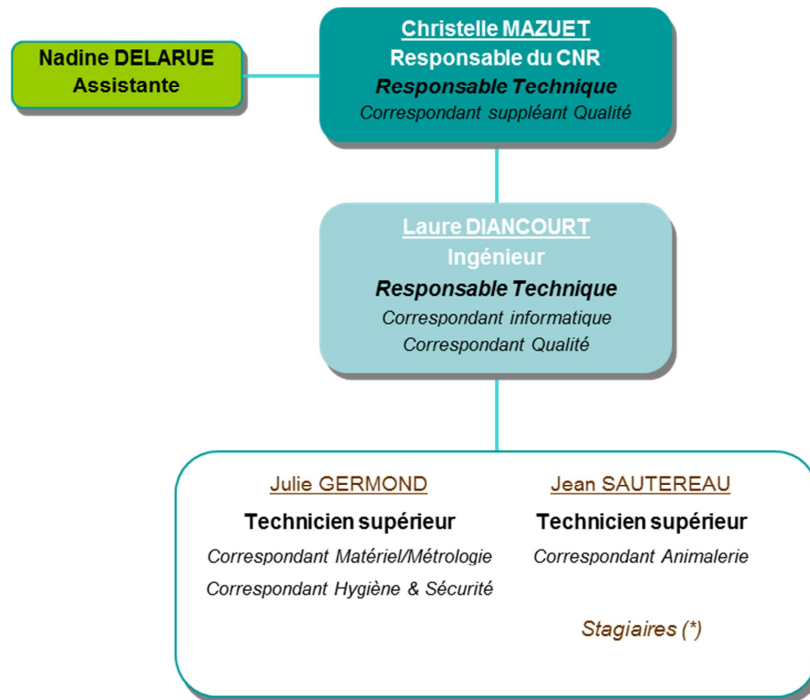




## 1-MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME

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

*Organigramme 2018 du CNR*



**MOT** : les personnes dont le nom est souligné sont habilitées MOT

(\*) manipulation de MOT (après autorisation délivrée par l'ANSM) sous le contrôle du détenteur de l'autorisation MOT et selon le thème du travail.

NB : En 2018, le CNR a fonctionné sans responsable adjoint.

## 2-ACTIVITES D'EXPERTISE

### *Éléments clefs de l'année 2018 en termes de production d'expertise*

- Un possible cas (à confirmer) de botulisme humain de type C ?
- Une suspicion forte d'un cas de botulisme iatrogène
- Une suspicion d'un foyer de botulisme à la Réunion réorienté en TIAC à *Bacillus cereus*
- 3 investigations de TIAC à *Clostridium perfringens* dans des unités militaires
- Détection de botulisme de type C/D **et E** chez un cygne
- Investigation d'une épizootie de cervidés suite à une entérotoxémie à *C. septicum*

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

## 2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2018

Suite à la décision institutionnelle du détachement du CNR de l'unité « Toxines bactériennes », à son rattachement au laboratoire de « Pathogénèse des bactéries anaérobies » en mai 2018 et à la réorganisation des espaces de travail, équipements et projets, le CNR n'a pas été en mesure de faire évoluer ses techniques cette année. En particulier, il ne nous a pas été possible d'évaluer ou développer les techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection et l'identification des toxines botuliques.

Le séquençage du génome complet (sur les plateformes internes P2M et Biomics) est de plus en plus utilisé pour l'identification et le typage des bactéries anaérobies en remplacement des techniques de PCR classique et de séquençage Sanger. Le CNR fait cependant fréquemment face à des difficultés techniques liées à la grande diversité des bactéries anaérobies (au moins 40 genres différents, Gram + et Gram -, faible GC pourcent) ne permettant pas la mise au point d'un unique protocole.

## 2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Sans objet

## 2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

## 2-4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**

## 2-5 Activités d'expertise

### 2-5-1 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridium difficile*)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés en 2018 sont donnés dans le tableau suivant :

ORIGINE	Nombre de souches analysées (nombre de prélèvements reçus)
Humaine	128 (159)
Vétérinaire	4 (33)
Alimentaire	1 (14)
Environnementale	0
Autres (collections, EIL...)	11
TOTAL	144 (217)

Soit une diminution de 40% de **souches isolées** envoyées par les laboratoires de biologie médicale par rapport à l'année précédente qui est le reflet :

- de fluctuations annuelles ;
- du transfert de l'activité « *Clostridium difficile* » vers le laboratoire associé depuis avril 2017 (début du nouveau mandat) ;

- du recours au Maldi-Tof des laboratoires de ville et hospitaliers pour l'identification des souches de bactéries anaérobies.

En 2018, le CNR a par contre été très sollicité en première intention pour orienter, identifier et isoler des germes anaérobies à partir de **prélèvements primaires** humains, vétérinaires ou alimentaires dans le cadre de TIAC, d'épizootie ou de suspicion de tétanos : 73 prélèvements de ce type reçus en 2018 (vs 16 en 2017).

Si cette tendance se confirme en 2019, elle serait un marqueur de modification des besoins des laboratoires auquel le CNR devra s'adapter pour répondre au mieux à la demande des cliniciens, vétérinaires et autorités de santé en terme de diagnostic biologique des pathologies à bactéries anaérobies strictes ou facultatives.

Le CNR s'est fixé pour objectif de rendre les résultats d'identification, de toxinotypage et/ou d'antibiogramme des souches humaines dans un délai maximum de 15 jours. Pour 2018, le détail du délai de rendu de résultats écrits figure dans le tableau ci-dessous.

Délais de rendu de résultats écrits:  
SOUCHES HUMAINES

	Identification et/ou toxinotypage	Antibiogramme +/- Identification
Réponse en 0-7 jours:	54 (51%)	15 (37%)
Réponse en 8-14 jours:	41 (39%)	22 (54%)
Réponse en 15-21 jours:	10 (9,5%)	3 (7%)
Réponse > 21 jours:	0	1 (2%)

TIAC à *C.perfringens* (n=5)  
(WGS + MLST)

1- *Propionibacterium acnes* reçu en juillet

## 2-5-2 Activités d'expertise pour le botulisme

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2018 est le suivant:

Botulisme humain		
	sérums (recherche de toxine botulique)	129
	selles (recherche de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i> )	83
	sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	15
Echantillons agro-alimentaires		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	21
	autres	22
Echantillons environnementaux		
	en relation avec une suspicion de botulisme humain	0
	autres	21
Botulisme animal		
	échantillons biologiques	190

Echantillons d'aliment pour animaux		
	échantillons	154
<b>TOTAL</b>		<b>635</b>

Le CNR s'est fixé pour objectif de rendre les résultats écrits de diagnostic de botulisme humain dans un délai maximum de 4 jours pour la recherche de toxine botulique (sérum, selles, aliments) et de 7 jours pour la recherche de *Clostridium botulinum* (selles, aliments). Dans les faits, les résultats sont communiqués en temps réel (le plus souvent en moins de 24h) par Fax/Téléphone et/ou mail aux cliniciens : de façon systématique lorsque le diagnostic biologique de botulisme est confirmé ainsi que pour tous les patients hospitalisés en réanimation.

## 2-6 Activités de séquençage génomique (WGS, NGS...)

### 2-6-1 Accès aux plateformes de séquençage de l'Institut Pasteur

L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

En 2018, le CNR a ainsi séquencé le génome complet d'une soixantaine de souches de bactéries anaérobies, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (ie séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie). A terme l'objectif est de séquencer de cette façon l'intégralité des souches de bactéries anaérobies reçues au CNR et de s'affranchir ainsi des techniques fastidieuses et chronophages de PCR classiques pour l'identification et le toxinotypage. Nous faisons cependant face pour le moment à un nombre non négligeable d'échecs de séquençage pour le genre *Clostridium* qui pourrait être dû à la technologie employée pour la préparation des banques.

**Cas particulier du séquençage des Microorganismes et Toxines (MOT) : *Clostridium botulinum***, étant classé dans la liste I des MOT soumis à réglementation, le séquençage de son génome ne peut être réalisé que sur une plate-forme dont les locaux, l'activité sur le MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. C'était le cas de la Plate-Forme 1 – Génomique du pôle Biomics de l'Institut Pasteur et pour *Clostridium botulinum*. La technologie utilisée était également de type Illumina avec accès à différentes machines : MiSeq, NextSeq 500, HiSeq. Les librairies été réalisées avec le kit TruSeq PCRfree (Illumina). Cette collaboration comprenait également l'analyse bio-informatique : extractions du gène de la neurotoxine, des gènes des protéines associées aux complexes botuliques ainsi que des gènes de maison permettant d'établir le profil MLST de la souche et d'analyser sa variabilité génétique.

En 2018, cette plateforme ayant emménagé dans de nouveaux locaux avec de nouveaux personnels, l'autorisation de l'ANSM n'était plus valable. Le CNR n'a donc pas pu séquencer les génomes des souches de *Clostridium botulinum* isolées des cas de botulisme 2018. Il n'est, semble-t-il, pas envisagé que la nouvelle structure dénommée « OMICS » dépose un dossier auprès de l'ANSM pour

obtenir l'autorisation de séquencer des MOT. Une solution devrait être trouvée en 2019 auprès du pôle de génotypage de la CIBU.

### 2-6-2 Accès à une expertise bio-informatique

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNRs, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNRs et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié.

Le CNR utilise la suite CLC Genomics Workbench et le logiciel BioNumerics v7.6 pour l'analyse des séquences et la recherche des gènes d'intérêt. Des outils maison sont également utilisés pour réaliser certaines recherches (récupération des gènes codant pour les ARN 16S, 5S et 23S ; réorganisation des contigs le long d'un génome de référence).

### 2-6-3 Appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique

Depuis 2014, tous les génomes des souches de *Clostridium botulinum* isolées des prélèvements biologiques, alimentaires ou environnementaux sont systématiquement entièrement séquencés pour chaque foyer de botulisme humain à des fins d'investigations de l'épidémie. D'autres souches de *Clostridium botulinum* issues de foyers plus anciens ou d'autres sources sont également séquencées à des fins épidémiologiques et de surveillance/connaissance des souches circulant en France.

En 2018, aucune souche de *Clostridium botulinum* n'a cependant pu être séquencée (cf. 2-6-1).

Nous avons également régulièrement recours au séquençage génomique de souches de *Clostridium perfringens* dans le cadre d'investigations de TIAC ou cette année de *Clostridium septicum* isolées de prélèvements de cerfs dans le cadre d'une suspicion d'épizootie suite à une entérotoxémie.

### 2-6-4 Stockage et dépôt des données brutes

Les données brutes ainsi que les assemblages sont stockés dans un répertoire sécurisé géré par la DSI de l'Institut Pasteur. Elles sont déposées, avec les métadonnées associées, sur le site du NCBI lorsque celles-ci font l'objet ou partie d'une publication.

### 3-ACTIVITES DE SURVEILLANCE

#### 3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

##### 3-1-1 Surveillance du botulisme

###### **Éléments clefs de l'année 2018 en termes de surveillance du botulisme**

Forte suspicion d'un cas de botulisme iatrogène de type A  
 Suspicion de botulisme humain de type C à confirmer  
 Suspicion d'un foyer de botulisme à la Réunion réorienté en TIAC à *Bacillus cereus*  
 Investigations de plus en plus fréquentes de TIAC à *Clostridium perfringens*.

##### 3-1-1-1 Réseau de partenaires

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

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

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

##### 3-1-1-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du botulisme

###### ◆ Analyse des cas de botulisme humain en 2018

En 2018, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 129 échantillons de sérum, 83 selles et 21 échantillons alimentaires. Le nombre de foyers et de cas de botulisme observés en France cette année est assez classique : 7 foyers confirmés (et 4 foyers suspects) de botulisme impliquant 11 cas (et 4 cas suspects) ont été identifiés. 9 patients ont été hospitalisés dont 6 en service de réanimation.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente (6 foyers confirmés sur 7, et forte suspicion d'une origine alimentaire pour 3 foyers suspects bien que non confirmés).

Un foyer (1 cas) de botulisme infantile a également été identifié.

Une forte suspicion clinique et biologique d'un foyer (1 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection de Botox à visée esthétique n'a pas pu être confirmée.

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

Année	Foyers (cas) déclarés
2018	7 (11)
2017	3 (4)
2016	11 (20)

Année	Foyers (cas) déclarés
2015	14 (22)
2014	4 (11)
2013	11 (19)
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)
2009	25 (10)
2008	6 (9)

Comme régulièrement en France, les foyers d'origine alimentaire étaient majoritairement de type B (4 foyers sur 6) et la source potentielle ou avérée de contamination un aliment de préparation familiale. Le foyer (1 cas) le plus grave était de type A. Le type de botulisme d'un des foyers alimentaires n'a pas pu être déterminé.

#### Description détaillée des foyers alimentaires (Tableau 7-Chapitre 9)

- un foyer (1 cas) pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans les selles du patient à un titre élevé (entre 200 et 2000 doses létales souris/g). La recherche de toxine botulique dans le sérum et de *Clostridium botulinum* dans les selles étaient négative. La consommation d'un bocal de soupe, sans précision sur les ingrédients, de préparation familiale serait à l'origine de ce cas. L'analyse des 3 bocaux de la même date de préparation était négative.

- un foyer (2 cas) avec détection de *Clostridium botulinum* de type B dans les selles d'un des patients. Une souche de *C. botulinum* de type B a également été isolée. La consommation de conserves familiales de haricots verts pourrait être à l'origine de ces cas, sans preuve biologique, le CNR n'ayant pas reçu d'aliments à analyser pour ce foyer.

- un foyer (4 cas) avec détection de toxine botulique dont le type n'a pas pu être déterminé faute de volume suffisant de sérum. La consommation de conserves familiales de ratatouille pourrait être à l'origine de ces cas ; l'analyse de deux bocaux de la même date de préparation s'est révélée négative.

- le foyer (1 cas) le plus grave était de type A et lié à la consommation d'une conserve familiale de lentilles massivement contaminée (80 000 doses létales souris/g). Un titre également extrêmement élevé en toxine botulique de type A (100 DL/ml) a été détecté dans le sérum du patient. Une souche de *Clostridium botulinum* de type A(B) a été isolée à partir du plat de lentilles consommé.

- un foyer (1 cas) pour lequel la présence de toxine botulique de type B a été mise en évidence dans le sérum du patient. L'aliment fortement suspecté d'être à l'origine de ce cas est un plat traditionnel égyptien à base de mullet mariné (Fessek). Il n'y avait pas de restes disponibles pour analyse.

- un foyer (1 cas) pour lequel la présence de *Clostridium botulinum* de type B a été détectée dans les selles. La notion de consommation de jambon et de conserves de truffes au cours d'un repas pris au restaurant en Croatie a été rapportée ; 7 autres convives ayant partagé ce repas étaient cependant asymptomatiques et aucun autre cas de botulisme avec exposition en Croatie ou consommation de truffes n'a été signalé par nos homologues européens suite au message Epis de SpF sur la plateforme de l'ECDC.

- Le botulisme a été suspecté cliniquement dans 4 foyers (4 cas), mais n'a pas été clairement confirmé par la recherche de toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* dans les sérums et/ou les prélèvements de selles et alimentaires. Un cassoulet toulousain d'origine commerciale dans un cas et une viande d'oie maison pour un autre ont été considérés comme potentielle source contaminante. Un troisième foyer/cas très suspect mérite notre attention ; il s'agit d'un patient hospitalisé en

réanimation/ventilation dans un état grave pour lequel la recherche de toxine botulique dans le sérum et les selles étaient négative mais pour lequel une souche de ***Clostridium botulinum* de type C** a été isolée à partir des selles. L'analyse de 9 aliments retrouvés dans le réfrigérateur de la personne a par ailleurs révélé la présence (fortuite ?) de *Clostridium botulinum* de type B à un faible niveau dans un morceau de jambon cru familial, en l'absence de toxine botulique préformée. Enfin, et pour la première fois en France, une forte suspicion clinique et biologique d'un foyer (1 cas) de botulisme iatrogène de type A consécutive à l'injection de Botox à visée esthétique n'a pas pu être confirmée.

Le cas de botulisme infantile concernait un nourrisson masculin de 3 mois. Une toxine botulique de type B a été détectée dans les selles à deux reprises à des taux élevés (2 000 et 200 doses létales par gramme de selles) et deux souches de *C. botulinum* ont été isolées. La notion de travaux de construction à proximité du domicile ayant été évoquée par la famille, une potentielle origine environnementale de ce cas peut être suspectée. L'origine de ce cas, comme la plupart des cas de botulisme infantile, reste cependant inexpliquée. Des investigations environnementales autour des cas de botulisme infantile seraient utiles et précieuses.

#### **Diagnostic différentiel des affections avec un tableau de paralysie flasque et/ou de trouble dysautonomique**

Le botulisme est de plus en plus pris en compte dans le diagnostic différentiel des paralysies flasques incluant les neuropathies auto-immunes comme le syndrome de Guillain Barré ou de Miller-Fisher, la myasthénie, ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC). L'élimination d'un éventuel botulisme lors d'un tableau clinique de paralysie flasque ou de troubles dysautonomiques, tels que défaut d'accommodation ou sécheresse de la bouche, est la première motivation de demande d'analyse de botulisme.

En 2018, 18 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Lambert-Eaton), de polyradiculonévrites chroniques, de myasthénies ou de sepsis. A la suite de nos résultats négatifs en identification de botulisme et évoquant une autre origine des paralysies et diminution des sécrétions (origine auto-immune ou autre), les analyses complémentaires menées par les laboratoires demandeurs ont permis de confirmer un diagnostic autre. Les demandes d'analyse de botulisme qui nous sont adressées dans le cadre d'une recherche de causes de mort inexpliquées de nourrissons demeurent fréquentes (10 en 2018, 9 en 2017 vs 2 en 2016). Ces analyses se sont toutes révélées négatives (Tableau 6 – chapitre 9).

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

La toxine botulique, essentiellement le type A, est largement utilisée dans le traitement de certaines affections neurologiques comme les dystonies. Certains sujets deviennent non-répondeurs à la toxine botulique par développement d'anticorps neutralisants (Tableau 11 – chapitre 9).

Un total de 15 échantillons de sérum a été analysé en 2018, et la présence d'anticorps neutralisants a été détectée dans 2 d'entre eux vis-à-vis de la toxine botulique A et aucun vis-à-vis de la toxine botulique B.

#### **3-1-1-3 *Botulisme agro-alimentaire et environnemental***

Des échantillons d'aliments nous sont adressés dans le cadre de foyers avérés ou suspects de botulisme humain. Ces échantillons nous sont envoyés par les agents chargés des enquêtes d'hygiène alimentaire pour le compte des Agences Régionales de Santé et Directions Départementales de la Protection des Populations ou parfois sur réquisition de la Préfecture de Police ou du Tribunal lors d'enquête judiciaire. Occasionnellement, nous recevons des échantillons alimentaires ou



environnementaux de la part d'industriels pour des contrôles de fabrication ou d'enquêtes sur le botulisme animal. Les résultats sont présentés aux Tableaux 9 et 10 – chapitre 9

#### 3-1-1-4 *Botulisme animal*

Le diagnostic du botulisme animal est de plus en plus réalisé par les laboratoires vétérinaires départementaux ou régionaux ainsi que par le Laboratoire National de Référence (LNR) du botulisme aviaire de Ploufragan (ANSES) avec lequel nous collaborons étroitement. Les demandes d'analyse de botulisme animal que nous recevons proviennent de laboratoires vétérinaires départementaux ou privés et concernent essentiellement des confirmations d'examens réalisés en première intention, de typage de botulisme ou d'analyses de foyers et de cas litigieux. Notre rôle consiste principalement en une activité d'expertise basée sur des confirmations ou infirmations de premières analyses et de typage de botulisme. Les analyses concernant le botulisme animal sont résumées au Tableau 12 – chapitre 9

**Botulisme bovin.** Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2018, un total de 54 échantillons représentant 16 foyers ont été analysés principalement des échantillons de contenu intestinal, du fait que la recherche de toxine botulique dans le sérum des bovins n'est pas fiable. Le botulisme a été confirmé dans 7 foyers. Il s'agit majoritairement (6 foyers sur 7) de botulisme de type mosaïque D/C ; un foyer de type C/D, plus classiquement associé à la faune aviaire, a été identifié cette année.

**Botulisme des oiseaux sauvages.** Chaque année en France et dans toute l'Europe occidentale, les oiseaux sauvages, en particulier les canards et autres oiseaux aquatiques, paient un lourd tribut au botulisme, essentiellement en saison chaude et sèche. En 2018, un total de 110 échantillons représentant 28 foyers ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 21 foyers. Cette année encore les souches de *Clostridium botulinum* des oiseaux sauvages correspondent toutes au type mosaïque C/D, c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D (Tableau 12). Les souches de *C. botulinum* mosaïque C/D sont distinctes de celles de type D/C retrouvées chez les bovins. Une contamination croisée entre les deux espèces ou une source environnementale commune aux deux espèces semble donc peu probable.

Un fait marquant en 2018 est le nombre important de foyers confirmés et la détection d'une double contamination à *Clostridium botulinum* de type **C/D et E** chez un cygne retrouvé mort dans le Loiret. La même observation a été faite de façon concomitante par le LNR du botulisme aviaire chez deux autres espèces sauvages (canard et cigogne) dans deux autres régions françaises. Des investigations sont en cours dans nos deux laboratoires pour isoler les deux types de souches dans ces trois foyers, les comparer entre elles et avec les autres souches de même type.

**Botulisme des oiseaux d'élevage.** Le botulisme est également fréquent dans les élevages industriels de volailles (poulets, dindes, canards...). Outre les pertes économiques, parfois très importantes en élevage, le botulisme aviaire représente un risque de santé humaine. Le CNR n'intervient maintenant que très rarement pour le diagnostic des oiseaux d'élevage, celui-ci étant assuré par le LNR. En 2018, 6 échantillons provenant de 4 élevages ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 1 élevage. Le type C/D de botulisme chez les oiseaux d'élevage est identique à celui retrouvé chez les oiseaux sauvages (Tableau 12). On peut s'interroger sur une transmission possible du botulisme entre oiseaux sauvages et oiseaux d'élevage. Mais, l'apparition du botulisme des oiseaux sauvages est très saisonnière, majoritairement en période chaude, été et début d'automne, alors que le botulisme survient de façon plus continue au cours de l'année dans les élevages de volailles.

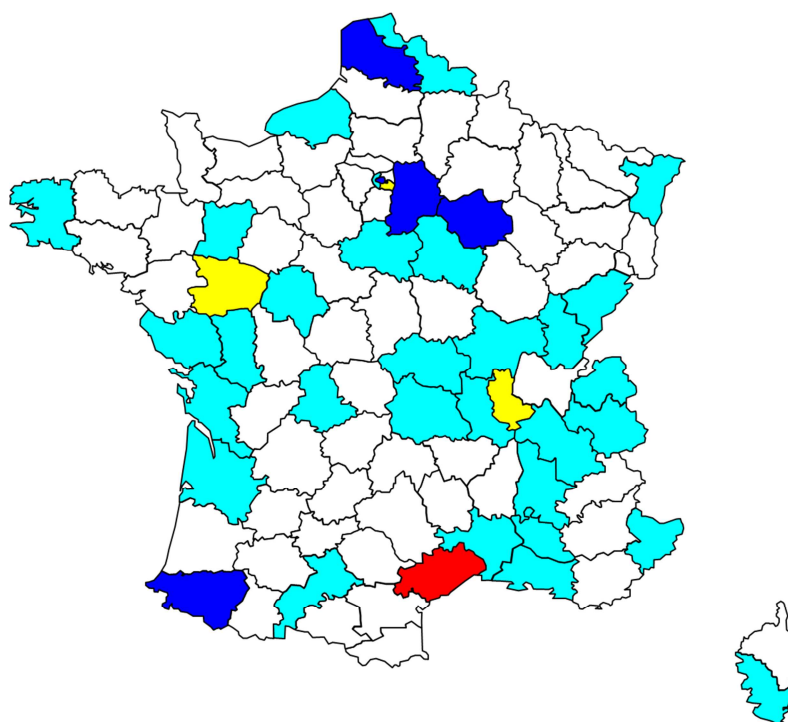
### 3-1-2 Surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis *Clostridium difficile*)

**Éléments clefs de l'année 2018 en termes de surveillance des infections à bactéries anaérobies (hormis *Clostridium difficile*)**

Investigations de TIAC à *Clostridium perfringens*  
40,5% des souches analysées en provenance d'un unique laboratoire

#### 3-1-2-1 Souches d'origine humaine

L'origine géographique des demandes d'identification de souches d'origine humaine parvenues au CNR en 2018 est présentée ci-dessous.



de 1 à 5 souches
de 5 à 10 souches
de 10 à 20 souches
> 20 souches

Trente-deux départements métropolitains ont envoyé 143 souches d'origine humaine au CNR parmi lesquelles 59 souches (40,5 % du total) par les laboratoires de l'Hérault. Les départements ultra-marins envoient également des souches régulièrement pour identification (3 souches envoyées par les DROM et COM).

Suite au transfert depuis avril 2017 des souches de *C. difficile* au laboratoire associé, Le CNR ne reçoit plus de souches de *C. difficile*. En 2018, il en a reçu une seule pour identification.

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

	Infections non CD		
	Hommes	Femmes	Total
N	88	50	138*
Sex ratio H/F			0,64
Age			
moyenne	47	58,7	51
médiane	46	63,5	52,5
intervalle	0-93	0-86	0-93

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

\* Le sexe de 5 patients n'était pas renseigné

Respect des conditions pré-analytiques (norme EN ISO15189) : envoi de la feuille de renseignements clinico-épidémiologiques par les LBM.  
 Depuis 2010, les laboratoires correspondants du CNR remplissent très régulièrement les feuilles de renseignements devant accompagner les souches. Les informations administratives et épidémiologiques sont disponibles pour la quasi totalité des souches. Lorsque la souche n'est pas accompagnée de la feuille de renseignements, une fiche de **non-conformité** est ouverte par le CNR puis une demande est faite par téléphone ou mail auprès du LBM pour l'envoi de cette feuille. A réception de la feuille de renseignements, la fiche de non-conformité est clôturée.

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

LOCALISATION	FREQUENCE
Coproculture	28
Hémoculture	27
Infections intra-abdominales	14
Urologie / néphrologie	12
Infections cutanées	9
Infections ORL	5
Infections ostéo-articulaires	5
Stomatologie	3
Gynécologie	2
Sperme	2
Infections péri-rectales et périnéales	2
Infections post-opératoires	2
Abcès, pus, plaies	15
Divers (dont 10 souches)	17
<b>TOTAL</b>	<b>143</b>

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement de coprocultures (28), d'hémocultures (26), d'infections intra-abdominales (14) et urinaires (12), suivies par les infections cutanées (9), ORL (5) et ostéo-articulaires (5). Le reste des souches provenaient de différentes localisations : stomatologie, gynécologie, sperme, infections péri-rectales et péri-anales, infections post-opératoires.

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté : 40/146 souches soit 28%.

Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* / *Parabacteroides* / *Prevotella* (30 souches), les coques à Gram + (*Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Gemella*, *Paraeggerthela*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*...) (8 souches) , bacilles Gram + non sporulés (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Nogibacterium*, *Lactobacillus*, *Eggerthela*) (18 souches), *Fusobacterium* (4 souches) et les coques à Gram négatif (*Negativococcus*, *Veillonella*, *Anaeroglobus*, *Barnsiella*...) (10 souches.) – cf Tableau 2 (chapitre 9)

Au total les 143 souches identifiées se sont réparties en 47 genres différents de bactéries anaérobies.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 2 chapitre 9. Parmi les *Clostridium*, la plupart étaient des souches envoyées pour toxinotypage, caractérisation de la pathogénicité et/ou identification.

#### Apport du séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

L'augmentation exponentielle du nombre d'espèces bactériennes décrites depuis quelques années impose de plus en plus souvent le recours à l'identification par séquençage de l'ADNr 16S. C'est plus particulièrement le cas dans le groupe des bactéries anaérobies facultatives *Actinomyces* et *Bifidobacterium*, et également chez des bactéries d'origine environnementale retrouvées dans les plaies etc... (*Clostridium*...).

L'identification bactérienne a beaucoup évolué ces dernières années grâce notamment à la technique MALDI-TOF MS qui est maintenant largement répandue au niveau des plates-formes techniques des hôpitaux et des regroupements de LBM privés. Cette technique en termes de coût et de rapidité présente un grand intérêt pour la prise en charge du patient. Plusieurs fabricants se partagent le marché et la performance des matériels qui opèrent cette technique dépend de la qualité des bases de données de profils MALDI.

Pour chaque espèce, plus le nombre de souches incluses dans ces bases est important plus la diversité de l'espèce est explorée et plus le diagnostic sera performant. Des souches peuvent ne pas être identifiées par cette technique (ci-après « échec MALDI-TOF ») soit parce que le nombre de souches pour l'espèce est insuffisant dans la base, soit parce que l'entrée dans la base n'existe pas (nouvelle espèce ou espèce non incluse).

Le CNR reçoit de plus en plus de souches étiquetées « échec MALDI-TOF » pour une identification précise notamment par séquençage de l'ARNr 16S.

### 3-1-2-2 *Investigations de TIAC à Clostridium perfringens*

Le CNR a participé activement à l'investigation microbiologique de différentes TIAC à *Clostridium perfringens* entérotoxigène grâce au développement d'une PCR temps réel ciblée sur les gènes des toxines alpha et entérotoxine qui peut être mise en œuvre dès réception des selles ou aliments, et permet une orientation rapide. Dans un second temps, les souches des selles des patients et/ou des aliments sont isolées et leurs génomes séquencés et comparés.

Les éléments majeurs des investigations de ce type en 2018 sont résumés ci-dessous :

**Foyer A :**

- 200 malades.
- Plat à risque : chili con carne
- La courbe épidémique évoque une intoxication rapide (premiers malades 1h00 après le repas), assez peu compatible avec la pathogénie classique de *C.perfringens* (ingestion des bactéries puis production d'entérotoxine dans le tube digestif – 6 heures d'incubation).
- Signal positif d'entérotoxine (CPE) détectée par ELISA dans certaines selles.
- Peu de patients avec bactérie dans les selles.
- Culture des repas témoins négative.
- 3 mois d'enquête, d'investigations et d'analyses concluent à une intoxication à la phytohémagglutinine (PHA) des haricots rouges insuffisamment cuits et révèlent une réaction croisée entre CPE et PHA dans le test ELISA commercialisé qui explique les résultats faussement positifs pour CPE dans les selles des patients, et nous a conduit au début de l'enquête sur une mauvaise piste quant à l'agent à incriminer.

**Foyer B :**

- 60 malades
- Plat suspect : sauce bolognaise des spaghettis
- 6 souches de *Clostridium perfringens* isolées des selles des patients et 8 souches de la sauce bolognaise sont entérotoxine positive et toutes identiques (NGS).

**Foyer C :**

- Pas de précision sur le nombre de malades
- Pas de plat témoin (défaut de procédure)
- 7 souches de *Clostridium perfringens* isolées des selles des patients sont entérotoxine positive et toutes identiques (NGS).

**Les souches des foyers B et C sont différentes**3-1-2-3 *Souches d'origine vétérinaire*

Les 40 souches anaérobies strictes d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées et analysées font toutes partie du genre *Clostridium* :

ESPECE	NOMBRE
<i>Clostridium septicum</i>	17
<i>Clostridium perfringens</i>	14
<i>Clostridium botulinum</i>	6
<i>Clostridium haemolyticum</i>	3
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>

L'année 2018 a été marquée par la survenue inhabituelle de mortalité de cerfs survenue dans au moins quatre départements (Ariège, Hautes-Pyrénées, Savoie, Marne), rapportée par le réseau SAGIR.

Le CNR a été sollicité pour investiguer cette épizootie de cervidés dont les caractéristiques étaient les suivantes : il s'agissait d'un processus morbide aigu ou suraigu, avec de possibles troubles neurologiques, sur animaux débilisés. Il s'agit d'un épisode monospécifique, multi-âge, très agrégé dans l'espace, agrégé dans le temps (depuis décembre 2017). L'agent causal est possiblement à l'origine d'une prise de boisson importante donc en faveur d'une hyperthermie ou polydipsie.

Concomitamment, des cas similaires ont été détectés en parc zoologique sur des cervidés (ex forte mortalité de daims dans le Maine et Loire).

Le CNR a reçu 16 prélèvements de foie/rate/moelle osseuse de cerfs/daims/biches et mis en évidence la présence de *Clostridium septicum* sur plusieurs organes et sur cadavres très frais.

7 souches de *Clostridium septicum* ont été isolées, toxintypées et séquencées.

Six souches sont des *Clostridium botulinum* que nous avons isolées à partir de contenus intestinaux d'animaux atteints de botulisme.

Par ailleurs, le CNR a reçu 14/40 souches de *Clostridium perfringens* d'origine vétérinaire. Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par génotypage.

Le typage des souches toxinogènes de *Clostridium* en particulier de *C. perfringens* est réalisé par PCR à partir des séquences des gènes de toxines connus. Les nouveaux gènes de toxines comme les gènes des toxines Beta2 et delta qui ont été identifiés et caractérisés dans notre laboratoire, ainsi que les gènes des toxines NetB, NetF et TpeL plus récemment identifiés, sont inclus dans le toxintypage de routine.

Les types toxiques de *C. perfringens* responsables d'affections chez les animaux sont généralement différents de ceux rencontrés chez l'homme. Mais les animaux peuvent être porteurs de types de *C. perfringens* potentiellement pathogènes pour l'homme, comme les souches entérotoxigènes à l'origine des toxi-infections alimentaires. La surveillance de telles souches dans les élevages est un moyen de prévenir les risques.

#### 3-1-2-4 *Souches d'origine alimentaire*

En 2018, le CNR a identifié 12 souches d'origine alimentaire isolées par le CNR à partir de prélèvements alimentaires dont 8 souches en lien avec une TIAC à *Clostridium perfringens* entérotoxigène

ESPECE	NOMBRE
<i>Clostridium perfringens</i> *	8
<i>Clostridium botulinum</i> **	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1

\* : en lien avec un foyer de TIAC à *C. perfringens*

\*\* : en lien avec un foyer de botulisme

### 3-2 *Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (hormis Clostridium difficile)*

Les laboratoires ne nous demandent que rarement la réalisation d'un antibiogramme. En effet, les bactéries anaérobies ne présentent généralement pas de résistance aux anti-infectieux, le métronidazole étant une thérapeutique de choix contre les affections à bactéries anaérobies. Cependant le CNR fait le choix de réaliser ponctuellement des antibiogrammes pour certaines souches reçues à des fins de surveillance.

Certaines espèces, principalement appartenant aux genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta-lactamases ou des céphalosporinases, et sont de fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

En 2018, parallèlement aux tests phénotypiques et à l'identification par analyse de la séquence ARNr 16S, le CNR a testé la sensibilité aux antibiotiques de 59 souches dont 52 souches d'origine humaine (dont 9 souches de *C. botulinum*, une souche de *B. cereus* impliquée dans un foyer de TIAC, 6 souches d'origine vétérinaire et une souche d'origine alimentaire). Les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les résultats concernant les 44 souches humaines autres que *C. botulinum* et *C. baratii* sont repris dans les tableaux 3 et 4 - chapitre 9).

Les données d'antibiorésistance sont décrites ci-dessous :

#### **Métronidazole**

Le métronidazole demeure l'antibiotique donné en première intention pour lutter contre les infections à bactéries anaérobies. Il est donc important de suivre l'évolution des résistances. Sur les 43 souches testées, 14 sont résistantes au métronidazole dont deux souches de *Bacteroides fragilis*. Ce chiffre est identique à celui de 2017.

#### **Amoxicilline, amoxicilline/ac. Clavulanique**

Les résistances à l'amoxicilline sont observées essentiellement chez les bactéries anaérobies à Gram -, notamment du genre *Bacteroides/Parabacteroides*. 28 souches sont résistantes à l'ampicilline, le genre *Bacteroides* représente plus de la moitié des souches (57,1%).

23 souches sont résistantes à l'association ampicilline + acide clavulanique dont 18 souches appartenant au genre *Bacteroides*. 15/18 sont des *Bacteroides fragilis*.

6 souches sont résistantes aussi bien au métronidazole qu'à l'association ampicilline + acide clavulanique.

Les gènes de résistance codant pour des bêta-lactamases/céphalosporinases (*cepA*, *cfxA*, *cftA*) sont systématiquement recherchés par PCR chez les bactéries anaérobies des genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*.

Quatre souches d'anaérobies stricts Gram + (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium* et *C. difficile*) étaient résistantes à l'amoxicilline et à l'amoxicilline/acide clavulanique

#### **Céphalosporines: cefalotine (C1G), cefoxitine (C2G), cefotaxime (C3G)**

La résistance aux céphalosporines a été identifiée principalement chez les anaérobies Gram – du genre *Bacteroides*.

Sur les 43 souches testées, 24 sont résistantes à la cefalotine, 27 au cefoxitine, et 25 au cefotaxime parmi lesquelles pour cet antibiotique, 14 sont des *B. fragilis*. Pour cette espèce, l'ensemble des souches, excepté une, étaient résistantes au cefotaxime (93,7%) contre 12/15 en 2017 (80%).

#### **Imipénème**

12 souches (20%) du genre *Bacteroides* étaient résistantes à l'imipénème.

#### **Moxifloxacine (Fluoroquinolone 3<sup>ème</sup> génération)**

11 souches d'anaérobies Gram - étaient résistantes à la moxifloxacine, principalement dans les genres *Bacteroides*. Parmi les anaérobies à Gram +, cette résistance est observée essentiellement chez *C. difficile*.

#### **Clindamycine**

La résistance à la clindamycine a été observée pour 16 sur les 44 souches testées. 10 souches appartiennent au genre *Bacteroides* soit 62,5% des souches contre 26,7% en 2017. Une seule souche de *Clostridium* était résistante à la clindamycine.

#### **Vancomycine**

16 souches sont résistantes à la vancomycine dont 10 souches appartenant au genre *Bacteroides*. Les souches résistantes sont essentiellement des Gram négatif (87,5% des souches).

Pour l'année 2018, le CNR confirme comme les autres années que le genre *Bacteroides* et notamment les souches de *Bacteroides fragilis* représentent la plus grande partie des souches résistantes aux antibiotiques. Sur les 16 souches caractérisées de cette espèce, 100% des souches sont résistantes à l'ampicilline, 75% des souches à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Sur les 16 souches, 6 étaient également résistantes à l'imipénème et 2 souches au métronidazole.

### **3-3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux**

La situation épidémiologique du botulisme fait l'objet d'une mise au point régulière avec Santé publique France, avec pour principal interlocuteur Mme Jourdan da Silva. Des échanges avec SpF, les cliniciens concernés, l'ARS et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé sont établis pour chaque foyer identifié ou suspicion. Les données du CNR sont confrontées tous les ans aux déclarations obligatoires de cas de botulisme humains reçues par SpF. Des études communes présentant la situation du botulisme en France sont régulièrement publiées dans le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH).

#### **Contribution aux réseaux de surveillance européens et international**

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

Dans la suite d'une décision prise par la Direction de l'Institut Pasteur dans le cadre d'une restructuration interne, le CNR s'est vu retiré son implication dans le projet européen EuroBioTox (*European programme for the establishment of validated procedures for the detection and identification of biological toxins*) dans le cadre de l'appel d'offre H2020 regroupant 13 partenaires européens et une cinquantaine de laboratoires participant à des essais inter laboratoires. Malgré cela, l'équipe du CNR continue à maintenir ses interactions et collaborations fortes établies depuis 15 ans avec ses homologues européens.

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

### **3-4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance réalisées**

Sans objet



## 4-ALERTE

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

**Botulisme** : Chaque cas de botulisme confirmé biologiquement par le CNR a fait l'objet d'une déclaration par fax, email ou téléphone à Santé publique France (SpF). En outre, le CNR a eu régulièrement des contacts téléphoniques ou par courrier électronique avec SpF, les ARS, la DGAL et les cliniciens pour faire le point sur les foyers de botulisme en cours et sur des suspicions de botulisme. L'alerte est déclenchée lorsqu'il y a un risque de santé publique, notamment avec un produit alimentaire du commerce, ce qui ne s'est pas produit en 2018.

**TIAC à *Bacillus cereus*** : Le CNR a été sollicité par la DGCCRF pour une recherche de toxine botulique et *Clostridium botulinum* dans des lots de sauce aux cèpes maison dans le cadre d'une investigation de TIAC (réf 26/2018 – 202712) impliquant les clients d'un restaurant de Saint Gilles les Bains à l'île de la Réunion (974). Les recherches de toxine botulique et *Clostridium botulinum* se sont révélées négatives mais le CNR a mis en évidence la présence de *Bacillus cereus* portant le gène de l'entérotoxine Nhe dans les sauces permettant ainsi de réorienter vers une TIAC à *B.cereus*, plus compatible avec les symptômes développés par les patients.

**TIAC à *Clostridium perfringens*** : Le CNR est régulièrement sollicité dans le cadre d'investigations de TIAC à *Clostridium perfringens*. En 2018, à la demande du Service de Santé des Armées (Colonel Vincent Pommier de Santi, Centre d'Epidémiologie et de Santé Publique des Armées (CESPA) – Base de défense Marseille-Aubagne) et en collaboration étroite avec l'Hôpital d'Instruction des Armées BEGIN (Médecin en chef Sébastien Larréché), le CNR a participé activement à l'investigation de 3 TIAC survenues dans des unités militaires et résumées ci-dessous :

### **Foyer A :**

- 200 malades.
- Plat à risque : chili corn carne
- La courbe épidémique évoque une intoxication rapide (premiers malades 1h00 après le repas), assez peu compatible avec la pathogénie classique de *C.perfringens* (ingestion des bactéries puis production d'entérotoxine dans le tube digestif – 6 heures d'incubation).
- Signal positif d'entérotoxine (CPE) détectée par ELISA dans certaines selles.
- Peu de patients avec bactérie dans les selles.
- Culture des repas témoins négative.
- 3 mois d'enquête, d'investigations et d'analyses concluent à une intoxication à la phytohémagglutinine (PHA) des haricots rouges insuffisamment cuits et révèlent une réaction croisée entre CPE et PHA dans le test ELISA commercialisé qui explique les résultats faussement positifs pour CPE dans les selles des patients, et nous a conduit au début de l'enquête sur une mauvaise piste quant à l'agent à incriminer.

### **Foyer B :**

- 60 malades
- Plat suspect : sauce bolognaise des spaghettis
- 6 souches de *Clostridium perfringens* isolées des selles des patients et 8 souches de la sauce bolognaise sont entérotoxine positive et toutes identiques (NGS).

### **Foyer C :**

- Pas de précision sur le nombre de malades
- Pas de plat témoin (défaut de procédure)

- 7 souches de *Clostridium perfringens* isolées des selles des patients sont entérotoxine positive et toutes identiques (NGS).

**Les souches des foyers B et C sont différentes**

## **5-ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL**

### **5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé**

#### **5-1-1 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR et du laboratoire associé**

Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme>

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

#### **5-1-2 Activités de conseils aux professionnels de santé**

Le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme a mis à disposition des numéros de téléphone (01 45 68 84 56 / 01 45 68 83 10), des adresses email ([christelle.mazuet@pasteur.fr](mailto:christelle.mazuet@pasteur.fr), [laure.diancourt@pasteur.fr](mailto:laure.diancourt@pasteur.fr) et [cnranaerobies@pasteur.fr](mailto:cnranaerobies@pasteur.fr)) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, pré analytiques, interprétation des résultats). Des cahiers d'enregistrement/traçabilité/transmission des prestations de conseils délivrées aux professionnels de santé, vétérinaires, industriels, particuliers ont été mis en place à chaque poste téléphonique. Ainsi en 2018 (253 jours ouvrés), le CNR a répondu à environ 200 emails et à 134 appels téléphoniques enregistrés.

### **5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires**

C. Mazuet a été régulièrement en contact avec Nathalie Jourdan Da Silva et Alexandra Mailles pour l'investigation des suspicions de botulisme ainsi qu'avec Marie-Pierre Donguy et son équipe (Mission des Urgences Sanitaires de la DGAL) pour aider à l'évaluation du risque que représenterait la consommation, notamment pour les enfants, de produits laitiers issus de la collecte dans un cheptel bovins laitiers atteints de botulisme de type D/C.

## 6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

### 6-1 Travaux de recherche

#### 6-1-1 Travaux de recherche sur la toxine botulique et *C. botulinum*

##### ◆ Analyse d'anticorps monoclonaux neutralisants de la toxine botulique E (collaboration avec le CEA Saclay)

Dans le cadre du programme NRBC et en collaboration avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse, CEA, Saclay, des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine Hc de la toxine botulique de type E ont été obtenus. Ces anticorps reconnaissent BoNT/E en ELISA, mais ils ne neutralisent pas ou seulement à un faible niveau BoNT/E dans le test de létalité chez la souris. Par contre, une association de 3 de ces anticorps monoclonaux a une activité neutralisante très élevée. Ce travail de caractérisation de l'activité neutralisante de cette association d'anticorps n'a pas pu être poursuivi en 2018 faute d'espace de laboratoire et d'équipements dédiés.

##### ◆ Caractérisation de l'anticorps monoclonal neutralisant de la neurotoxine botulique A (collaboration avec le CEA Saclay et la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'Institut Pasteur)

Un total de 14 anticorps monoclonaux contre la toxine botulique A ont été obtenus chez la souris à l'aide du fragment Hc de la toxine botulique A. Un de ces anticorps a une activité neutralisante très élevée et supérieure à celle obtenue avec des anticorps polyclonaux. L'objectif actuel est de mapper sur la toxine botulique l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal ayant une activité neutralisante très élevée. Pour cela nous utilisons une technique d'incorporation de deutérium sur les amides libres du fragment Hc de la toxine botulique A seul ou lié à l'anticorps monoclonal, suivi d'une analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons pu déterminer que l'anticorps monoclonal reconnaît le site de liaison du fragment Hc à son récepteur protéique (protéine de vésicule synaptique SV2). Les expériences et analyses de spectrométrie de masse ont permis de caractériser plus en détail cet épitope et de comprendre le mécanisme du haut pouvoir neutralisant de cet anticorps. Un article est en cours de rédaction.

##### ◆ Développement des tests alternatifs au test *in vivo* sur souris pour la détection et le titrage des toxines botuliques

C'est un enjeu crucial actuellement de remplacer les tests sur souris pour la détection et titrage des toxines botuliques par des tests *in vitro* qui devraient être plus rapides et plus précis, et pour autant aussi sensibles que les tests sur animaux. Cet aspect constitue une part essentielle du programme européen H2020 EuroBioTox (European Programme for the establishment of validated procedures for the detection and identification of biological toxins) que nous avons obtenu pour la période 2016-2021. C. Mazuet et MR Popoff étaient co-PI d'un Work Package entièrement dédié à cette problématique.

Par décision institutionnelle de réorganisation des périmètres d'activité au cours de l'année 2018, le CNR a été exclu de ce projet au profit de l'équipe de recherche récemment nommée pour prendre la succession de Mr Popoff.

## 6-1-2 Développement d'outils et investigation autour des foyers de botulisme animal

### **Type C botulism outbreak in beef cattle due to the contamination of wheat by a cat carcass**

C. LE MARECHAL, O. HULIN, S. MACE, C. CHUZEVILLE, S. ROUXEL, T. POËZEVARA, C. MAZUET, F. POZET, E. SELLAL, L. MARTIN, A. VIRY, C. RUBBENS, M. CHEMALY

Article soumis pour publication

#### **Abstract**

We report a botulism outbreak in Charolais cattle fed with wheat flour contaminated by *C. botulinum* type C. Diagnosis was based on typical suggestive clinical signs and detection of *C. botulinum* type C using real-time PCR in samples collected from 3 young affected bulls. All young exposed bulls and cows (18 animals) eventually died, but 3 young bulls and 1 cow were recovering when it was decided to euthanize them. *C. botulinum* type C was detected in the liver of these 4 animals. Analysis of the ration components demonstrated that wheat flour, wheat and the mill used to make flour were positive for *C. botulinum* type C. A cat carcass positive for *C. botulinum* type C was discovered in the silo where wheat was stored and was considered the source of contamination. Specific measures, in particular vaccination of the rest of the herd and cleaning and disinfection operations were implemented to prevent any recurrence of the outbreak and these are described here. Feed contamination by carcasses has been reported several times as the source of a cattle botulism outbreak, mostly for hay or silage but this case report demonstrates that dry feed can also be a potential source of contamination.

### **Comparison of the antibody response of cattle vaccinated against type C and D botulinum neurotoxins with a traditional toxoid based vaccine and a recombinant vaccine**

Luca Bano, Elena Tonon, Luca Zandonà, Ilenia Drigo, Andrea Bravo, Romina Brunetta, Christelle Mazuet, Joachim Frey

Article soumis pour publication

#### **Abstract**

Bovine botulism is a fatal disease that causes great economic losses, with nearly 100% lethality during outbreaks. The disease is sustained by botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum* commonly belonging to serotype C and D and vaccination is the most effective method to prevent botulism in cattle.

In the present study, we compared the immune response of bovines immunized with the recombinant heavy chain (Hc) domain of BoNT type C and D, with the immune response produced by a commercial toxoid based vaccine.

Ten bovines were vaccinated twice with a commercial bivalent (C/D) toxoid based vaccine (Botulism vaccine, Ondestepoort, SA), 10 bovines were vaccinated twice with a recombinant 50 kDa protein representing the Hc domain of BoNT types C and D, 5 bovines were injected with the adjuvant and 5 bovines were included in the study as negative control.

The immune response was investigated by means of two ELISA tests developed in-house using the immunogens (Hc of BoNT C and D) as capture antigens. A mouse protection assay was employed to measure the neutralizing antibodies elicited by the two different vaccines.

The group of bovines vaccinated with the recombinant vaccine showed an antibody response mean of 1.031 ELISA units (EU) for type C and 1.14 EU for type D. The means of the antibody response of control animals and animals inoculated with the only adjuvant were 0.171 EU and 0.097 EU respectively, when tested with Hc of type C as capture antigen, and 0.013 and 0.007 when tested

with the Hc of type D. The mean of the antibody response of bovines vaccinated with the bivalent toxoid based vaccine was 0.737 EU for type C and 0.665 for type D.

Preliminary results of the mouse protection assay performed on a restricted number of sera evidenced that 5.5 LD<sub>50</sub> of BoNT C are neutralized with the sera of bovines vaccinated with the traditional toxoid based vaccine until the serum-dilution of 1:2. The same quantity of toxin was neutralized *in vivo* with the sera of bovines vaccinated with the recombinant sub-units until the dilution encompassed between 1:8 and 1:16. In the next future, the serum titre will be compared with type C and D reference antitoxins and expressed in international units.

Our results suggest a higher protective efficacy of the studied recombinant vaccine in comparison with the traditional toxoid based vaccine for the prevention of botulism in cattle.

### 6-1-3 **Investigation autour d'une suspicion d'épizootie suite à une entérotoxémie à *Clostridium septicum***

Dans le cadre de l'investigation de cette suspicion d'épizootie de cervidés suite à une entérotoxémie à *Clostridium septicum*, agent pathogène à potentiel zoonotique, la caractérisation génétique de ce type de souches a été entreprise. Les génomes de 18 souches de *Clostridium septicum* identifiées et/ou isolées au CNR entre 2010 et 2018 (9 souches d'origine humaine, 8 d'origine vétérinaire et 1 d'origine inconnue) ont été entièrement séquencés.

Les premiers résultats indiquent que la surmortalité de cerfs observée cet hiver n'est pas le fait d'une souche clonale de *Clostridium septicum*. Par ailleurs, les souches d'origine vétérinaire semblent être assez divergentes de celles isolées de cas pathologiques humains, à l'exception d'un clone identique isolé d'un cas humain de fasciite nécrosante fatale en 2010 et de la rate d'un cerf victime d'entérotoxémie en 2018.

## 6-2 **Publications et communications 2018**

### 6-2-1-1 **Publications nationales**

*C Mazuet, N Jourdan-Da Silva, C Legeay, J Sautereau, M R. Popoff*

Le botulisme humain en France, 2013-2016// Human Botulism in France, 2013-2016

Bull Epidémiol Hebd. 2018;(3):46-54.

### 6-2-1-2 **Publications dans des revues internationales à comité de lecture**

Infant botulism: Two case reports and electroneuromyogram findings.

*Bernardor J, Neveu J, Haas H, Pitelet G, Popoff MR, Mazuet C, Bérard E, Boulay C, Chabrol B.*

Arch Pediatr. 2018 Jun 7 pii: S0929-693X(18)30108-8. doi: 10.1016

### 6-2-1-3 **Congrès, workshops, séminaires**

- Journée « Botulisme animal »  
Présentation par C. Mazuet : « Le botulisme humain en France »  
ANSES, Ploufragan, 15 février 2018
- H2020\_KO Meeting ToxDetect  
ANSES, Maisons Alfort, 28 février 2018
- Journée d'échanges MOT IP/ANSES

- ANSES, Maisons Alfort, 10 septembre 2018
- Journée mondiale du sepsis  
Institut Pasteur, Paris, 12 septembre 2018
- Séminaire du Réseau Biotox/Piratox  
Hôpital du Val de Grace, Paris, 26-27 septembre 2018
- Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting 2018  
Chicago, US, 20-25 octobre 2018

## 7-COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

Nous coopérons activement et efficacement avec le Laboratoire National de Référence (LNR) (ANSES Ploufragan) qui participe au diagnostic et à la surveillance du botulisme animal en France, et en particulier aviaire :

- 1) Pour valider la méthode de détection de *C. botulinum* par PCR dans les prélèvements animaux, nous leur avons transmis une souche de référence de *Clostridium botulinum* de type E via une autorisation de cession de souche MOT par l'ANSM. La validation de cette méthode de diagnostic a fait l'objet d'une publication en 2017.
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications en 2018.
- 3) Le CNR et le LNR coopèrent à l'investigation des foyers de botulisme bovin et aviaire, notamment des oiseaux sauvages en collaboration étroite avec l'ONCFS et le réseau SAGIR. En 2018, l'ensemble des acteurs s'est fortement mobilisé autour du diagnostic simultané de 3 foyers de botulisme de type C/D et E dans la faune aviaire sauvage. Des investigations sont encore en cours, une demande d'autorisation ANSM a été faite pour permettre un transfert d'échantillons positifs entre le LNR et le CNR.
- 4) Un projet commun entre le LNR, le CNR et son laboratoire associé a été soumis à l'appel d'offre France Agrimer en octobre 2017: *Caractérisation de souches de C. botulinum et C. difficile au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins*. Ce projet n'a pas été retenu pour financement en 2018 mais est toujours d'actualité, et pourra être à nouveau soumis à l'occasion d'un nouvel appel à projet.
- 5) Une étude du portage sain de *Clostridium botulinum* chez le porc a démarré (cf. Programme d'activité).
- 6) Christelle Mazuet fait partie du comité de thèse de l'étudiant de Caroline Le Maréchal (responsable du LNR) dont le sujet porte sur l'isolement et la caractérisation génétique des souches de *Clostridium botulinum* du groupe III.

## 8- PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019

### 8-1-1 Bactériologie anaérobie

#### 8-1-1-1 *Expertise en bactériologie anaérobie*

##### ◆ Identification et typage des souches de bactéries anaérobies

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

Notre laboratoire a jusqu'à présent réalisé l'identification des souches courantes et peu courantes de bactéries anaérobies adressées par les laboratoires d'analyses et de biologie médicale. Les techniques utilisées (séquençage notamment du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais aussi de gènes de ménage comme *dnaK*, *rpoB*, *cpn-60*... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie), ont été utilisées pour plusieurs groupes bactériens. Il faut souligner l'abondance et l'extrême diversité des bactéries anaérobies, plus de 80 genres et 500 espèces actuellement identifiées. La caractérisation des souches d'intérêt médical repose aussi sur la mise en évidence des gènes potentiels de virulence (toxines, facteurs d'adhésion, flagelles, enzymes hydrolytiques ...) et des gènes d'antibiorésistance. Ces techniques notamment basées sur des amplifications par PCR de gènes spécifiques ont permis d'améliorer les identifications et caractérisations des souches, notamment l'identification de nouveaux genres et espèces. Cependant, la complexité et le nombre de gènes ciblés pour ces caractérisations ont considérablement augmenté, plus de 30 pour *C. perfringens* par exemple. Etant donné l'amélioration des techniques et procédés de séquençage de génomes complet et la plus grande facilité d'accéder à ces ressources via la structure P2M, nous nous orientons de plus en plus vers du séquençage systématique de génomes complets des souches à identifier et du traitement bio-informatique des données.

En parallèle, une approche rapide d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est en cours. Elle permet de valider cette technique qui est utilisée par de nombreux laboratoires et aussi de compléter la base de profils de spectrométrie pour des espèces bactériennes non encore répertoriées.

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

##### ◆ Typage toxinique des souches de bactéries anaérobies

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

les souches de *Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* toxigènes pour lesquelles nous disposons du test de létalité sur souris et de tests ELISA.

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

Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêta-lactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*). Nous procédons à l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des bactéries anaérobies qui nous sont adressées par la technique d'antibiogramme par diffusion en gélose. Les concentrations minimales inhibitrices sont déterminées (notamment par Etest) lorsque les souches présentent des diamètres d'inhibition anormalement réduits. Nous évaluons également en parallèle le système Sensititre. Ces examens sont d'un intérêt plus marqué pour les bacilles anaérobies à Gram négatif et les cocci anaérobies.

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

♦ **Projet ToxDetect: Development and harmonization of innovative methods for comprehensive analysis of food-borne toxigenic bacteria, ie. *Staphylococci*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens***

Les toxines bactériennes produites par *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* et *Clostridium spp.* sont responsables d'un grand nombre de foyers d'intoxication alimentaire dans l'Union européenne (près de 10 000 cas/an). Ce chiffre est probablement sous-estimé du fait :

- de la complexité de l'investigation liée à une symptomatologie commune des intoxications alimentaires impliquant une toxine (diarrhées, vomissements...)
- d'un manque cruel d'outils de détection pour l'ensemble des toxines bactériennes et facteurs de virulence potentiellement incriminés.

Ce projet européen de 4 ans (2017-2020) qui réunit l'ANSES, l'Institut Pasteur (CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme, Centre de Ressources Biologiques, Plateforme de Spectrométrie de Masse), l'INRA, BfR (Allemagne), WIV-ISP (Belgique) et NIV (Norvège) a été accepté pour financement dans le cadre de l'appel d'offre H2020/European Joint Programme (EJP) : « One Health-Emerging Diseases ».

Les objectifs:

- Le développement et l'harmonisation au niveau européen d'approches «non-NGS» pour une meilleure détection et quantification des toxines bactériennes ou des facteurs impliqués dans la virulence des bactéries toxigènes, y compris celles qui restent actuellement indétectables (menaces émergentes).

- Le développement de méthodes rapides (type « bandelettes ») permettant de discriminer les bactéries pathogènes et non-pathogènes en tant qu'outils complémentaires.

- L'organisation d'essais inter-laboratoires entre les partenaires et autres laboratoires européens pour évaluer et optimiser les méthodes développées.

En comblant certaines lacunes méthodologiques pour détecter les toxines bactériennes, et en caractérisant les bactéries toxigènes d'origine alimentaire, les résultats de ce projet contribueront à une protection accrue de la santé du consommateur.



### 8-1-1-2 *Botulisme humain*

#### ◆ **Diagnostic du botulisme**

La surveillance du botulisme humain, qui est le plus souvent d'origine alimentaire, repose sur la confirmation biologique de cette affection incluant le typage de la toxine. Les essais sont réalisés à partir d'échantillons biologiques (sérum, selles) provenant des malades suspects et d'échantillons alimentaires afin d'identifier l'aliment responsable et de prévenir d'autres contaminations. Cette activité prioritaire sera poursuivie pendant la période à venir.

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

#### ◆ **Développement de nouvelles méthodes de mise en évidence et de caractérisation des toxines botuliques**

Le développement et l'évaluation de méthodes alternatives au test *in vivo* pour la détection et le typage des toxines botuliques reprendront lorsque les conditions matérielles et ressources en personnel formé seront réunies (cf annexes 2 et 3). Ces méthodes alternatives comprennent:

- des méthodes basées sur l'activité enzymatique des toxines botuliques (protéolyse de substrats spécifiques: SNAP25, VAMP2 et syntaxin) et détection des produits de clivage par Biacore ou ELISA.

- Une variante de la méthodologie précédente est basée sur une détection des produits de clivage par spectrométrie de masse.

- des méthodes ELISA. Nous avons développé des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre les différents types de toxines botuliques. Les tests ELISA que nous avons testés avec ces anticorps sont très spécifiques mais restent moins sensibles que le test *in vivo*. Cependant, ces anticorps se révèlent très précieux pour améliorer la sensibilité des méthodes basées sur l'activité enzymatique, en permettant de développer une étape d'immuno-concentration.

### 8-1-1-3 *Botulisme animal*

#### ◆ **Etude du portage sain de *Clostridium botulinum* chez le porc**

##### Contexte

Le CNR a isolé des souches de *C. botulinum* de type B4 (non protéolytique) à partir de jambons artisanaux en lien avec des foyers de botulisme humain dans différentes régions de la France. Le séquençage de ces souches a montré qu'elles sont très clonales. Ce résultat est surprenant, les souches de *C. botulinum* des groupes I et II présentent en effet en général une variabilité génétique marquée (Mazuet et al., 2016).

Il n'y a pas de données disponibles sur la prévalence de *C. botulinum* chez le porc en France dans la littérature. Les souches qui pourraient être présentes chez l'animal et constituer une source de contamination des produits finis lors de l'abattage ou de la transformation n'ont jamais été caractérisées en France.

##### Objectifs

L'objectif de ce projet est d'évaluer la prévalence de *C. botulinum* chez le porc en France, d'isoler si possible des souches toxigènes et de les caractériser afin de les comparer aux souches impliquées dans les épisodes de botulisme humain.

Ce projet se passera en 2 temps : une préenquête sera menée afin d'obtenir une première série de données puis une recherche de financement pourra être initiée en fonction des résultats de cette préenquête.

#### Préenquête :

L'unité HQPAP dispose de fèces de porcs prélevés à l'abattoir en 2012 dans le cadre d'un projet européen SAFEORGANIC. Ces fèces ont été conservés au congélateur depuis leur collecte. Il s'agit de prélèvements de porcs biologiques et conventionnels.

Ces prélèvements seront expédiés par l'unité HQPAP au CNR qui se chargera de détecter la présence de *Clostridium botulinum*, d'isoler les éventuelles souches toxigènes, de les caractériser (NGS et analyse MLST) et de les comparer à celles isolées de foyers de botulisme.

### ◆ **Etude du portage sain de *Clostridium botulinum* sur des oiseaux tués à la chasse dans une zone ayant eu un épisode de botulisme aviaire de type C/D et E**

#### Contexte

Comme chaque année en période estivale, de nombreux foyers de botulisme ont été détectés dans l'avifaune par le réseau SAGIR. **En 2018, les gènes codant pour les toxines C/D et E ont été détectés par PCR par le LNR et le CNR, sur des oiseaux dans 3 foyers de botulisme**, dans 3 départements différents (Loiret, Yvelines et Ain) sur 3 espèces différentes (cigogne, cygne tuberculé, colvert). C'est la première fois que la détection simultanée du E et du C/D est rapportée à notre connaissance. Cette détection atypique a fait l'objet d'une communication par mail à la DGAL et à SpF ainsi que d'un « Flash Info » destinés aux acteurs du réseau SAGIR (<http://www.oncfs.gouv.fr/Reseau-SAGIR-ru105/Actualites-sanitaires-2018-news2116>).

Le botulisme humain est associé aux types A, B, E et dans une moindre mesure au type F tandis que le botulisme animal est majoritairement associé aux types C, D, C/D et D/C et dans une moindre mesure le botulisme aviaire peut être associé au type E. Le type C/D est celui qui est principalement associé aux épisodes de botulisme aviaire recensés ces dernières années en France. Des cas de botulisme aviaire de type E ont déjà été rapportés en France mais **le dernier cas recensé remonte à 2001**, tandis que des cas sont rapportés annuellement autour des Grands Lacs aux Etats-Unis. Le risque zoonotique du type C/D est considéré comme faible ou négligeable tandis que le type E présente un risque pour la santé humaine.

L'épidémiologie du botulisme aviaire est encore relativement méconnue et la gestion des épisodes délicate. Le ramassage des cadavres reste actuellement la méthode la plus efficace pour contenir un épisode de botulisme et limiter la mortalité.

#### Objectif

Au cours de l'épisode de botulisme aviaire détecté dans l'Ain, des sédiments prélevés aux abords des étangs ainsi que des oiseaux chassés à proximité ont été conservés par l'ONCFS ; ces oiseaux n'avaient pas de symptômes mais étant donné le contexte, la DDPP avait indiqué qu'ils ne devaient pas être consommés. Ce matériel représente une bonne opportunité d'évaluer la pertinence de cette mesure, d'étudier le portage chez ces oiseaux et de rechercher la présence de *Clostridium botulinum* dans les prélèvements environnementaux.

#### Méthode

CNR : Recherche de *Clostridium botulinum* par PCR et test de létalité sur souris dans 11 prélèvements de sédiments, 36 gésiers et 36 contenus intestinaux d'oiseaux (canard colvert, oie et sarcelle d'hiver) tués à la chasse.

LNR : Recherche de *Clostridium botulinum* par PCR dans 36 caeca, 36 foies et 36 muscles du bréchet.

Les premiers résultats obtenus au CNR montrent la présence de *Clostridium botulinum* neurotoxigène de type C/D dans un prélèvement (gésier de canard) sur les 72 analysés.

Le LNR a de son côté détecté par PCR du *Clostridium botulinum* de type C/D dans 7 prélèvements d'oiseaux différents (caeca d'oie et sarcelle) ainsi que du *Clostridium botulinum* de type E dans le muscle du bréchet d'un canard. Les échantillons détectés positifs par le LNR vont nous

être expédiés pour confirmer ces résultats et vérifier le caractère toxigène dans le test de létalité sur souris.

Chaque équipe essaiera également d'isoler les souches de *Clostridium botulinum*, notamment de type E, de les caractériser (NGS et analyse MLST) et de les comparer entre elles et à celles isolées de foyers de botulisme humain.

## 9- TABLEAUX

TABLEAU 1

Demandes d'identification de souches d'origine humaine  
Fréquences par département

Période du 01/01/2018 au 31/12/2018

Département	Fréquence
3	2
6	2
10	7
13	2
17	1
20	1
25	2
26	2
29	1
30	1
31	1
33	1
34	61
37	2
38	4
39	2
42	1
45	2
49	15
53	1
59	4
62	8
63	1
64	8

Département	Fréquence
67	1
69	11
71	1
73	2
74	1
75	9
76	1
77	6
79	3
84	2
85	2
87	1
89	2
92	1
94	18
97	2
98	1
<b>France Métropolitaine</b>	<b>195</b>

Département DROM	Fréquence
974 (La Réunion)	2
987 (Polynésie Française)	1
<b>TOTAL DROM</b>	<b>3</b>

TABLEAU 2

## Répartition des souches d'origine humaine par genre et espèces

Période du 01/01/2018 au 31/12/2018

49 genres, 74 espèces, 14 espèces non nommées

Genre bactérien	Nombre (espèce)	Genre bactérien	Nombre (espèce)
Actinobaclum	1 ( <i>schaallii</i> )	Intestinomonas	1 ( <i>timonensis</i> )
Actinomyces	3 ( <i>graevenetzii</i> , <i>oris</i> , <i>turicensis</i> )	Lactobacillus	4 ( <i>delbrueckii</i> , <i>gasseri</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>sp</i> )
Allistipes	1 ( <i>onderdonkii</i> )	Lagierella	1 ( <i>massiliensis</i> )
Alloprevotella	2 ( <i>rava</i> , <i>sp</i> )	Mobiluncus	1 ( <i>curtisii</i> )
Anaerococcus	2 ( <i>tetradium</i> , <i>sp</i> )	Mogibacterium	7 ( <i>diversum</i> , <i>neglectum</i> (4), <i>vescum</i> , <i>sp</i> )
Anaeroglobus	1 ( <i>germinatus</i> )	Mycoplasma	2 ( <i>salivarium</i> )
Bacillus	1 ( <i>cereus</i> )	Negativococcus	6 ( <i>massiliensis</i> (5), <i>succinivorans</i> )
Bacteroides	26 ( <i>fragilis</i> (17), <i>thetaiotamicron</i> (5), <i>ovatus</i> (1), <i>pyogenes</i> (1), <i>salyersiae</i> (1), <i>vulgatus</i> (1))	Parabacteroides	1 ( <i>gordonii</i> )
Barnsiella sp	1	Prevotella	3 ( <i>multiformis</i> , <i>melaninogenica</i> , <i>sp</i> )
Bifidobacterium	1 ( <i>longum</i> )	Propionibacterium	2 ( <i>acnes</i> )
Brevibacterium	1 ( <i>casei</i> )	Propionimicrobium	1 ( <i>lymphophilum</i> )
Butyricimonas sp	1	Olegussela	1 ( <i>massiliensis</i> )
Campylobacter	2 ( <i>showae</i> )	Olsenella sp	1
Casaltella	1 ( <i>massiliensis</i> )	Oscillibacter	1 ( <i>ruminantium</i> )
Catabacter	1 ( )	Porphyromonas	3 ( <i>pogonae</i> , <i>assacharolytica</i> , <i>sp</i> )
Clostridium	40 ( <i>perfringens</i> (25), <i>botulinum</i> (5), <i>combesi</i> (3), <i>argentinense</i> (1), <i>baratii</i> (1) ; <i>difficile</i> (1), <i>sordellii</i> (1), <i>steroides</i> (1), <i>subterminale</i> (1) <i>sp</i> (1))	Paraeggerthela	1 ( <i>hongkongensis</i> )
Dakarella	1 ( <i>massiliensis</i> )	Parvimonas sp	1
Desulfovibrio	2 ( <i>desulfiricans</i> , <i>fairfieldensis</i> )	Peptinophilus sp	1
Dialster	1 ( <i>invisus</i> )	Rikenella	1 ( <i>microfusum</i> )
Eggerthela	1 ( <i>lenta</i> )	Ruminococcus	1 ( <i>bicirculans</i> )
Fingegoldia	1 ( <i>magna</i> )	Sarcina	1 ( <i>ventriculi</i> )
Fusobacterium	5	Selenomonas sp	1
Gemella	1 ( <i>bergeri</i> )	Tannerella	1 ( <i>forsythia</i> )
Gordonibacter sp	1	Varibaculum	1 ( <i>camabriense</i> )
		Veillonella	1 ( <i>parvula</i> )

**Profils de résistance (R+I) des bactéries anaérobies isolées en 2018**  
**Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)**

**TABLEAU 3**  
**Bactéries à Gram +**  
**N=18 souches**

Espèce	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Imipenem	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacin
<i>Actinobaculum longum</i>	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>Actinomyces sp</i>	2	2 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	2
<i>Bifidobacterium longum</i>	1	1	1	1	0	0	0	1
<i>Brevibacterium casei</i>	1	1	1 <sup>a</sup>	1	0	0	0	0
<i>Clostridium spp</i>	5	0	1	1	0	1	0	3
<i>Eggerthella lenta</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Finegoldia magna</i>	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>Gemella bergeri</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus sp</i>	3	3	2	1	0	0	1	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	1	0	0	0	1	0	0
<i>Propionimicrobium lymphophilum</i>	1	1	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>: Espèces naturellement résistantes

TABLEAU 4

Bactéries à Gram -  
N=25 souches

Espèce	N	Métronidazole 16µg	Pénicilline	Ampicilline	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Ticarcilline	Mézlocilline	Tétracycline	Triméthopri-m-sulfa	Erythromycine	Imipenem	Céfalotine	Céfoxitine	Céfotaxime	Clindamycine	Rifampicine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxalactam	Moxifloxacine
<i>Bacteroides spp</i>	19	2	19	19	19	18	18	17	12	13	15	12	19	19	18	12	1	11	0	17	5
<i>Desulfovibrio spp</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Fusobacterium spp.</i>	2	0	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1
<i>Intestinomonas spp</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Oscillibacter ruminantium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0

## 10- ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

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

### 10-1 Missions et objectifs majeurs

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par Santé publique France (SpF), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à SpF des affections graves à anaérobies notamment à *C. difficile*), et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec SpF.

Depuis avril 2007, le laboratoire d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Hôpital St Antoine (responsable, F. Barbut) a été nommé par SpF comme laboratoire associé du CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridium difficile*. Il a été reconduit dans ses fonctions en 2011 et 2017.

Le CNRAB conduit des thèmes de recherche et développement en relation avec ses activités d'expertise, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *Clostridium botulinum*, techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection, l'identification et la quantification des toxines botuliques. Ces recherches n'ont cependant pas progressées en 2018 faute de locaux et équipements dédiés et d'accès aux ressources biologiques.

### 10-2 Equipe

- Effectif 2018 du CNR en Equivalent Temps Plein (ETP) et financement

Fonctions	ETP réels	Financement
Scientifique / biologiste	1	Institut Pasteur & SpF
Ingénieur	0,8	Institut Pasteur & SpF
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP	2	Institut Pasteur & SpF
Agent technique	1	Institut Pasteur
Administratif	0,25	Institut Pasteur & SpF

### 10-3 Locaux et équipements

#### 10-3-1 Locaux

Les locaux hébergeant le CNR ont été redéfinis en 2018. L'ensemble des activités est maintenant regroupé au RDC du bâtiment Guérin (61). Des travaux de déménagement/réaménagement doivent encore être réalisés dans un laboratoire P2 récemment attribué (cf plan ci-dessous). Ces locaux comprennent :

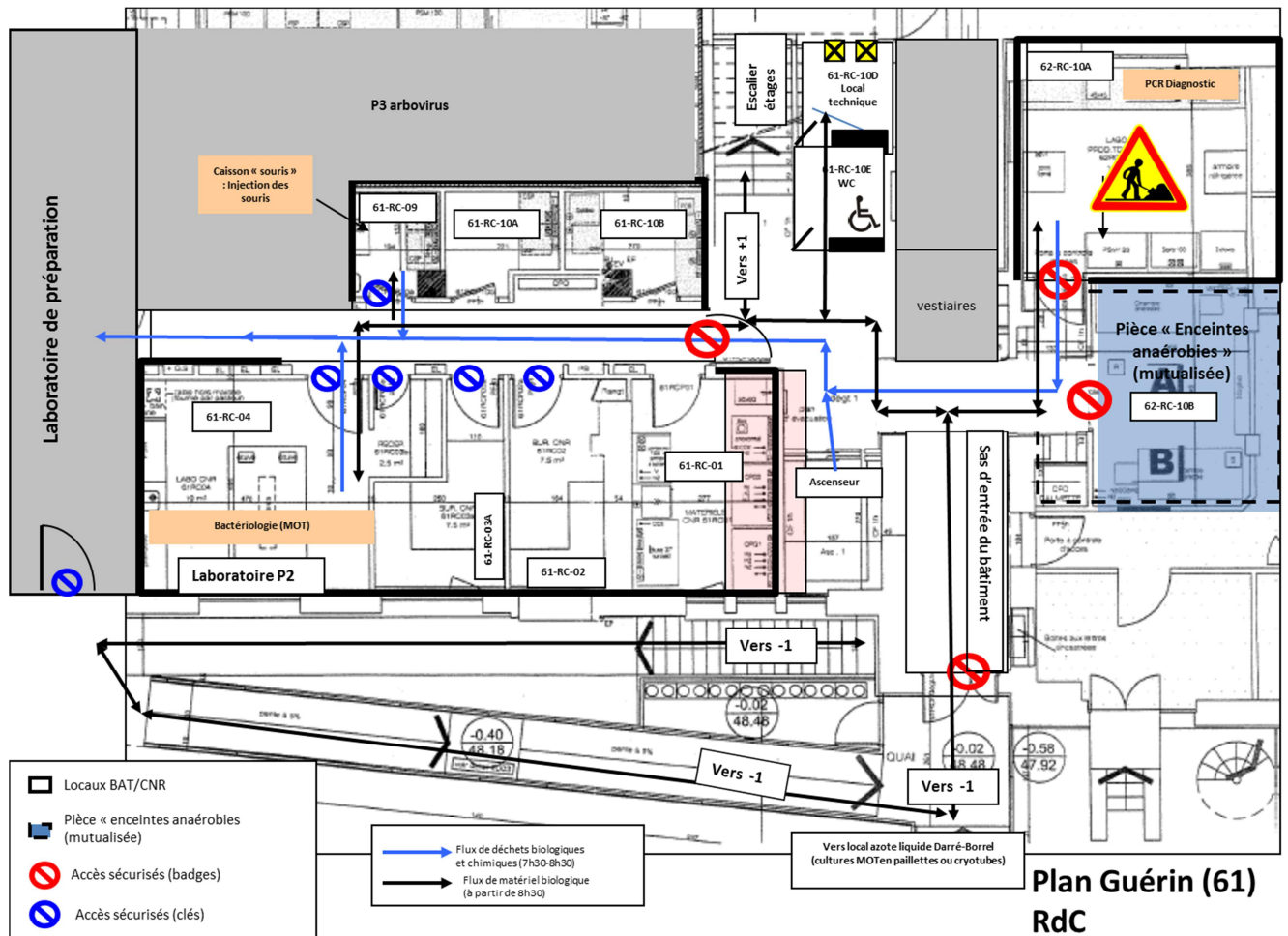
- 2 espaces bureaux de 7,5m<sup>2</sup> chacun.
- un laboratoire P2 de 19m<sup>2</sup> qui contient un PSM de type II



- une pièce "matériel" de 11m<sup>2</sup> renfermant 1 appareil de chromatographie en phase gazeuse, un appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec les mélanges gazeux pour l'anaérobiose, un incubateur à 37°C, une sorbonne et un combiné réfrigérateur/congélateur,
- une pièce avec un caisson souris réservée aux injections de souris pour le diagnostic du botulisme,
- une pièce réservée à la préparation des mix PCR avec une hotte PCR et un congélateur,
- une pièce "PCR" avec thermocycleurs, électrophorèses d'ADN, système de visualisation de gels GelDoc.

- Une pièce commune avec une autre unité située au Rez-de-chaussée du même bâtiment renferme une chambre anaérobie.

- Une pièce (17m<sup>2</sup>) qui sera à terme réservée à la PCR de diagnostic du botulisme, à la préparation et au stockage des toxines et aux activités de recherche de développement. Ces activités n'étant pas compatibles simultanément, une nécessaire dissociation temporelle sera mise en place, l'activité de diagnostic restant toujours prioritaire.



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

### 10-3-2 Equipements

Les équipements ont été redistribués en 2018. Le CNR ne dispose plus pour le moment d'équipement de culture cellulaire, de congélateur – 80°C, d'équipement pour la préparation et la purification des protéines recombinantes ni de chaîne ELISA. Les équipements de base nécessaires et indispensables à court terme aux activités de diagnostic ont été préservés.

#### Equipements de base pour la bactériologie anaérobie:

- Equipements de base de bactériologie standard
- Jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system).
- Enceinte anaérobie.
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.
- Enceinte climatique à 37°C.
- Microscope.
- Centrifugeuses
- Bains-marie et blocs chauffants.
- Réfrigérateurs, congélateurs (-20°C).
- Container d'azote liquide pour la conservation des souches de référence et des isolats.

#### Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

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

#### Equipement de biochimie :

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

#### Animalerie :

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

Locaux, matériel, équipements, moyens extérieurs à la structure, mais disponibles pour elle sur le campus (animaleries, séquenceurs, etc...) et nécessaires aux missions du CNR.

Laboratoire de préparation commun aux autres unités hébergées dans le bâtiment

Animalerie lapins pour la production d'anticorps spécifiques anti-toxines (une extension au dossier technique ANSM devra être constituée).

*Plateformes techniques* du campus de l'Institut Pasteur

P2M (Séquenceur automatique d'ADN et bioinformaticiens), Pôle Omics, Plateforme de protéines recombinantes (une extension au dossier technique ANSM devra être constituée).

### 10-4 Collections de matériel biologique

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

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

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

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.

Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.

A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

## 10-5 Démarche qualité

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

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

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

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

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles qualité externes. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter-laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Ainsi, le CNR a participé en octobre 2018 à un essai inter-laboratoire avec l'Institut de recherche biovétérinaire de Wageningen (WBVR, The Netherlands, Miriam Koene & Marc Engelsma) et le Laboratoire National du Botulisme et autres Clostridies

zoonotiques belge (Institut de Santé, Sciensano, Bruxelles, Tom Van Nieuwenhuysen) afin d'évaluer, de comparer et d'échanger sur la capacité et la méthodologie de nos trois laboratoires pour le diagnostic du botulisme humain et animal. Les résultats des 3 laboratoires étaient concluants et homogènes. L'expérience est renouvelée chaque année avec un tour de rôle de chaque institut pour l'organisation du test. Il est important de noter qu'au regard des contraintes de réglementation ANSM liées à la cession, importation, exportation et transport des Microorganismes et Toxines (MOT), ces essais sont très lourds et très onéreux à mettre en place et à réaliser.

L'année qualité 2018 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	16 au 20 janvier 2018
Revue qualité	13 mars 2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audits internes qualité et technique	05 et 11 octobre 2018

Perspectives 2019 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	janvier-avril 2019
Audit COFRAC S6	15 au 19 Avril 2019
Audits internes qualité et technique	septembre - novembre 2019
Revue de direction LRE-MS	Mai 2019
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

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

## 11- ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

### 11-1 Liste des techniques de référence

- Test de détection, d'identification et de typage des neurotoxines botuliques par le test de létalité sur souris (Accréditée par le COFRAC).
- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturels et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques).
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique.
- Identification des gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C par PCR temps réel. Cette technique est accréditée par le COFRAC.
- Amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage.
- Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).
- Dosage de certaines toxines par ELISA (comme toxine epsilon de *C. perfringens*, toxine LT de *C. sordellii*, toxines botuliques)

#### Technique ELISA de détection de la toxine LT de *C. sordellii*

La recherche de toxine LT de *C. sordellii* dans certains échantillons, comme des contenus intestinaux ou selles est occasionnellement demandée. Une technique ELISA basée sur des anticorps spécifiques de LT obtenus chez le lapin et la souris, a été développée.

#### Liste des marqueurs épidémiologiques

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

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

#### Couples d'amorces pour autres gènes d'intérêt

- gènes codant l'ADN ribosomal 16S
- gènes de l'espace intergénique ARNr 16S – 23S
- gènes de ménage *hsp60*, *hsp70* et *recA*
- gènes de sporulation
- gènes de résistance aux antibiotiques [métronidazole ;  $\beta$ -lactamines (gènes *cepA*, *cfxA* et *cfiA*, séquences d'insertion IS 942, IS1186, ISBF417) chez *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron*]
- Détermination de la sous-espèce de *Fusobacterium necrophorum* (subsp. *necrophorum* ou *funduliforme*) à l'aide de PCR spécifiques (basées sur la séquence du gène *gyrB*). Détection par PCR des gènes codant la leucotoxine (*lkt*), le promoteur du gène *lkt*, les gènes de l'hémagglutinine et d'une « Hemagglutinin related protein »

## 11-2 *Collection de souches et sérums de référence*

- Collection de souches de bactéries anaérobies MOT et non MOT, comprenant les souches types pour chaque espèce et toutes les souches reçues ou isolées au CNR depuis sa création en 1972. Ces souches sont conservées en azote liquide et/ou à -80°C. Les souches des espèces nouvellement décrites par le CNR sont également déposées dans une collection internationale étrangère (Culture Collection, University of Göteborg).
- Sérums de référence et sérums anti-toxines botuliques préparés au CNR.
- Sérums anti-toxine *C. difficile* et *C. sordellii*, notamment sérum anti toxine LT de *C. sordellii* qui neutralise spécifiquement la cytotoxicité de *C. difficile* ToxB.
- Sérums anti-toxine de *C. perfringens*, anti-toxine alpha, bêta1, bêta2, epsilon, iota Ia et iota Ib.
- Sérums anti-toxine alpha de *C. septicum*
- Sérum anti-toxine alpha de *C. oedematiens*
- Sérum anti *C. chauvoei*

## LIVRE II

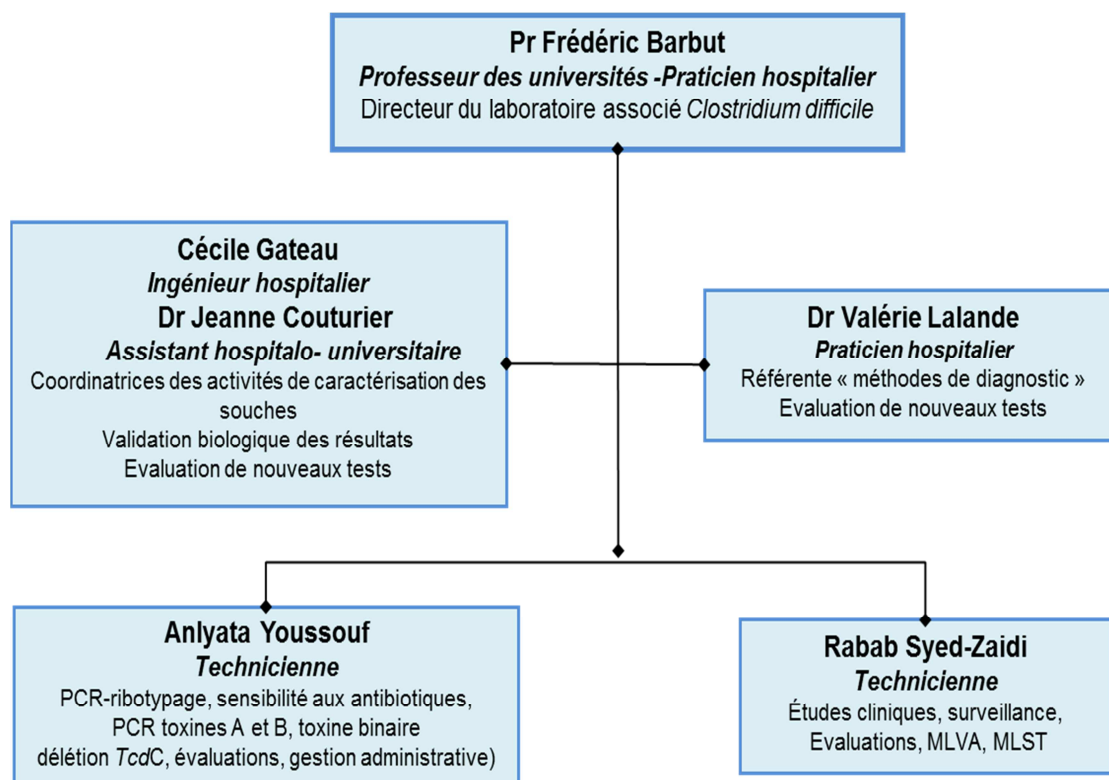
### Laboratoire associé au CNR *Clostridium difficile*



## 1- MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE

Description détaillée présentée en **annexe 1**

Organigramme du laboratoire associé



## 2- ACTIVITES D'EXPERTISE

*Éléments clefs de l'année 2018 (en termes de production d'expertise)*

Validation de la méthode de PCR-ribotypage avec identification des PCR-ribotypes sur le site « web-ribo » (<https://webribo.ages.at/>).

Techniques et marqueurs disponibles, liste des techniques recommandées pour le laboratoire expert présentés en **annexe 2**.

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



## 2-1 Evolution des techniques au cours de l'année 2018

Les souches de *Clostridium difficile* reçues au laboratoire sont caractérisées par PCR multiplex permettant la détection simultanée de 7 cibles (dont les principaux facteurs de virulence) : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvé chez les souches non toxigènes. Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire. La détection des fragments amplifiés se fait par électrophorèse capillaire.

La technique de PCR-ribotypage permet la détection des fragments amplifiés par PCR sur séquenceur (capillary-gel electrophoresis PCR-ribotyping) (Fawley et al, PlosOne 2015, DOI :10.1371). Cette technique est maintenant utilisée en routine au laboratoire. Depuis quelques mois, nous utilisons la plateforme européenne « webribo » (<https://webribo.ages.at/>) pour l'identification des PCR ribotypes.

## 2-2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

## 2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Sans objet

## 2-4 Collections de matériel biologique

Collections présentées en **annexe 1**

## 2-5 Activités d'expertise

En 2018, nous avons reçu 343 prélèvements au total contre 437 en 2017, ce qui représente une diminution de 21.5 %

Le **tableau I** présente le nombre de souches reçues par le laboratoire associé en 2018 ainsi que les différentes caractérisations réalisées sur ces souches.

Le laboratoire associé rend les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours à partir de la date de réception de la souche isolée au laboratoire.

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

Année	2018
Nb de <b>prélèvements reçus</b>	<b>343</b>
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	332
Nb de souches <b>toxigènes</b>	<b>319</b>
Recherche du fragment A3 (%)	100
Recherche du fragment B1 (%)	100
Recherche de la toxine binaire (%)	100
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	100
Antibiogramme (%)	100
PCR-ribotypage (%)	100

## 2-6 Activités de séquençage

En 2018, nous avons séquençé environ 250 souches de *C. difficile* et commencé à analyser les résultats par cg-SNP, wg-MLST (Bionumériques) dans le but :

- D'évaluer le pouvoir discriminant du cg-MLST à partir d'une collection de souches de *C. difficile* déjà caractérisées au niveau du Centre National de Référence et appartenant aux PCR-ribotypes les plus fréquents.
- D'investiguer une épidémie de *C.difficile* de PCR-ribotype 018 (PCR-ribotype peu fréquent) survenue dans un hôpital de l'Est de la France pour étudier le lien de clonalité entre ces souches. Celles-ci ont été caractérisées par cg-SNP, wg-MLST (Bionumériques). L'analyse a montré des résultats cohérents entre les deux méthodes de typage et a permis d'objectiver l'épidémie dans un service de gériatrie.
- Déterminer la fréquence de transmission des souches de *C.difficile* dans un CHU en caractérisant systématiquement toutes les souches isolées sur une année par cg-MLST et en analysant les résultats en fonctions des données épidémiologiques des patients (analyse spatio-temporelle des séjours des patients). Nous nous intéresserons en particulier à la composante cryptique de la transmission (c'est-à-dire la transmission de la même souche sans lien évident spatial ou temporel entre les patients). Nous évaluerons la supériorité de discrimination de la phylogénie basée sur le cg-MLST par rapport au PCR-ribotype.

## 3-ACTIVITES DE SURVEILLANCE

### Eléments clefs de l'année 2018 (en termes de surveillance)

Synthèse de l'évolution de l'incidence des ICD :

L. ASSOUVIE, M. COLOMB-COTINAT, J. DURAND, A. BERGER-CARBONNE, C. DANIAU, L. LEON, S. MAUGAT, S. SOING-ALTRACH, C. GATEAU, J. COUTURIER, I. ARNAUD, P. ASTAGNEAU, LE GROUPE BMR-RAISIN, F. BARBUT

Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in France 2010-2017

Eurosurveillance, 2019 soumis.

Importance de *C. difficile* dans les diarrhées communautaires

BARBUT F, , DAY N., BOUÉE S., YOUSOUF A., GRANDVOINNET L., LALANDE V.,COUTURIER J., ECKERT C..

Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. Clin. Microbiol. Infect. 2019 Jan 4. pii: S1198-743X(18)30814-0

Surmortalité des patients infectés par *C. difficile*

BARBUT F, BOUÉE S, LONGEPIERRE L, GOLDBERG M, BENSOUSSAN C, LEVY-BACHELOT L.

Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with *Clostridium difficile* infection: a French Health Insurance Database analysis.

J Hosp Infect. 2018 Jan;98(1):21-28

Un isolat ayant un profil particulier en PCR multiplex a été envoyé par le CH de Brignoles. Cette souche possède le gène tpi et celui de la toxine B uniquement (Absence des gènes *lok*, *tcdA*, *cdtB* et *cdtA*). Cette souche présente un nouveau PCR-ribotype.

Un isolat ayant un profil particulier en PCR multiplex a été envoyé par laboratoire privé de Cholet. Cette souche possède les mêmes caractéristiques que l'isolat de Brignoles mais appartient à un autre PCR-Ribotype.

Une analyse par MLST a été réalisée sur ces 2 souches et a montré que ces souches n'appartiennent pas à un Sequence type connu. Ces souches sont en cours de séquençage par NGS.

Un isolat ayant un profil particulier en PCR multiplex a été envoyé par le CH de Bischwiller. Cette souche possède les caractéristiques d'une souche non toxigène (présence de *lok* et absence de *tdcA*, *tcdB*) mais possède une toxine binaire tronquée : le gène *cdtB* est présent et *cdtA* est absent. Cette souche est en cours de séquençage NGS.

Une souche particulière a été isolée à St Antoine. Cette souche était négative pour la toxine B au GeneXpert mais avait un profil toxigène en PCR multiplex (présence de *tcdA*, *tcdB*). Cette souche est de PCR-Ribotype 078.

### 3-1 Description du réseau partenaire

Le laboratoire associé « *Clostridium difficile* » (Hôpital Saint-Antoine) assure une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

Il assure le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un **signalement** aux autorités sanitaires (e-sin). Les cas signalés correspondent soit à des formes sévères d'infections (*cf* définitions de la sévérité dans le guide « [Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance et principes de prévention et de maîtrise des infections à \*Clostridium difficile\*](#) » InVS 2006) soit à des cas groupés (épidémies). Cependant il est fréquent que les souches reçues n'aient pas fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires. Le motif d'envoi des souches qui doit être précisé sur la feuille d'accompagnement (infection communautaire motivant l'hospitalisation, transfert en réanimation pour infection à *C. difficile*, décès lié à l'infection à *C. difficile* dans les 30 jours, hyperleucocytose >20 000/mm<sup>3</sup>, traitement chirurgical de l'infection à *C. difficile*, épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours noté. Le **tableau II** montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (ces critères ne sont pas exclusifs).

Il est à noter que de plus en plus de laboratoires envoient des souches de *C. difficile* pour confirmation du PCR-ribotype 027 lorsque le test GeneXpert a rendu une identification présomptive 027. Ces envois permettent également de surveiller la diffusion de la souche 027 épidémiques en France.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2018 (343 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	51	186	106
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	9	226	108
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	5	227	111
Hyperleucocytose >20 000/mm <sup>3</sup>	36	200	107
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	3	209	131
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	149	122	72

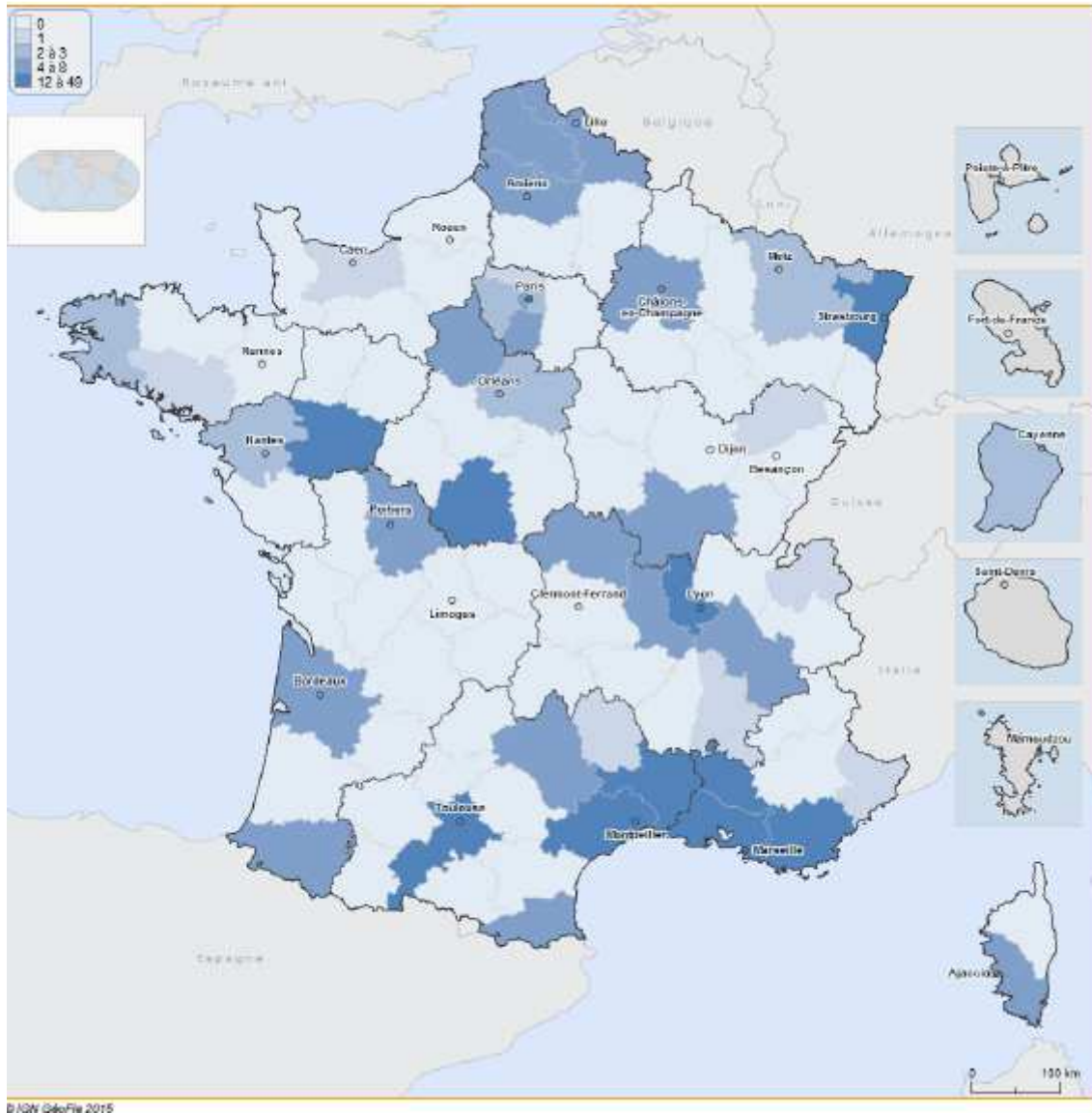
NR : non renseignés

La suspicion d'épidémies ou de cas groupés constitue le motif le plus fréquent d'envoi des souches au laboratoire expert pour typage (43.4% des motifs d'envoi renseignés).

### 3-2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la **figure 1**.

Le plus grand nombre de demandes observé dans certains départements est en relation avec le nombre et l'importance de Centres Hospitaliers dans ces régions et également avec l'intérêt particulier porté par certains microbiologistes aux bactéries anaérobies.

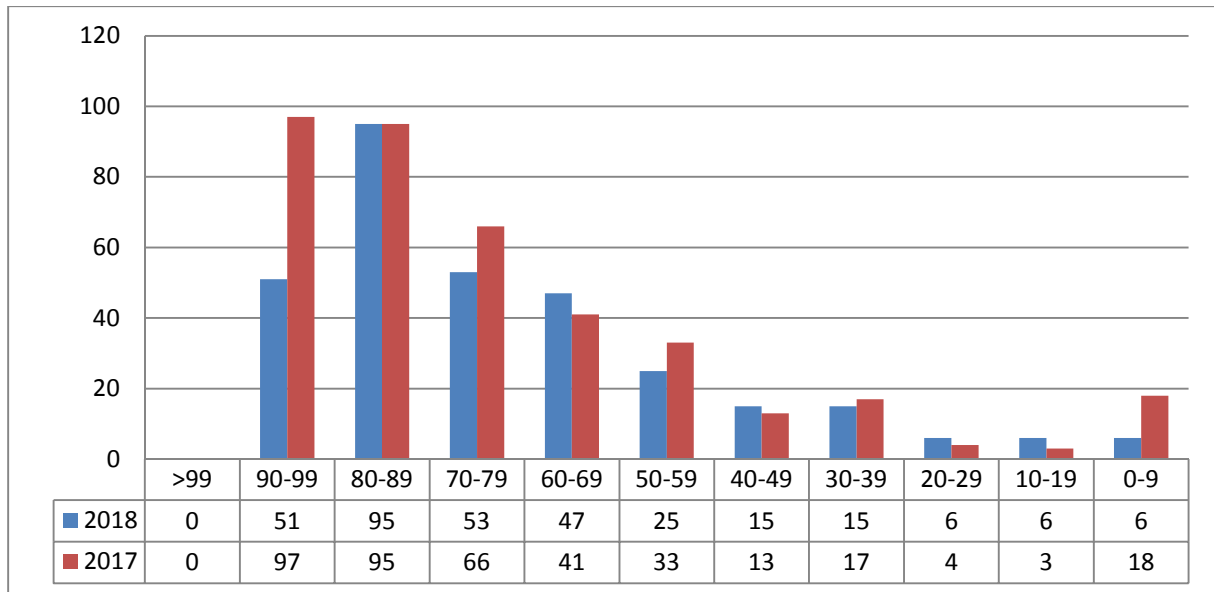


**Figure 1** : Répartition des prélèvements (n=343) envoyés par département, en 2018  
A noter : les départements en gris n'ont pas envoyé de prélèvement

En 2018, les souches de *C. difficile* toxinogènes provenaient uniquement de selles.

Cent soixante et onze souches (53.6%) de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes, 144 (45.1%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 4 cas.

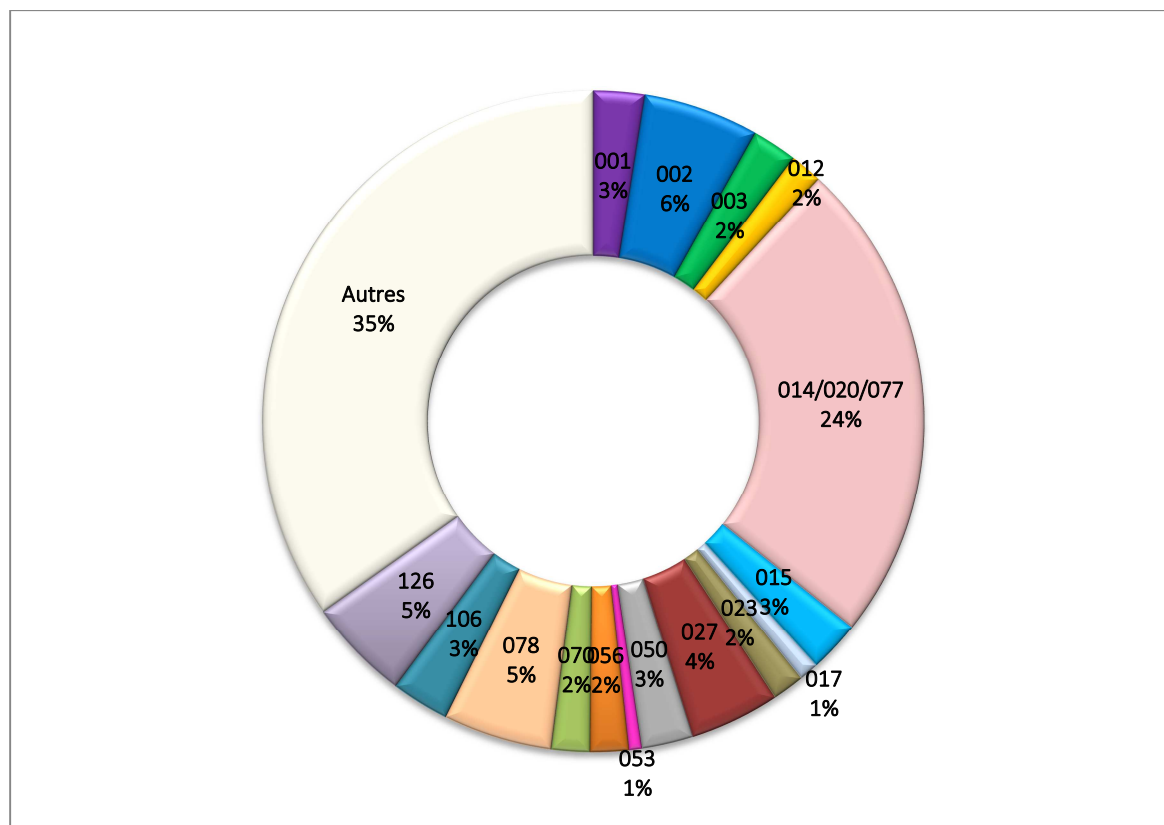
L'âge des patients chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représenté sur la **figure 2**. **Au total, en 2018, 70.2% des patients ont plus de 65 ans** (versus 71.1% en 2016).



**Figure 2** : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge (2017 et 2018)

**Tableau III** : Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2018

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)		
	2018	2017	2016
<b>027</b>	14 (4,44)	37 (9,56)	60 (15,92)
<b>014/020/077</b>	76 (23,82)	61 (15,76)	60 (15,92)
<b>078/126</b>	33 (10,34)	29 (7,49)	25 (6,63)
<b>002</b>	18 (5,64)	31 (8,01)	23 (6,10)
<b>001</b>	8 (2,51)	10 (2,58)	9 (2,39)
<b>015</b>	8 (2,51)	16 (4,13)	2 (0,53)
<b>017</b>	3 (<1)	1 (<1%)	0 (<1)
<b>106</b>	9 (2,82)	18 (4,65)	21 (5,57)
<b>053</b>	2 (<1)	4 (1,03)	0 (<1)
<b>autres</b>	148 (46,40)	179 (46,25)	141 (37,40)
<b>ND</b>	0 (<1)	1 (<1)	21 (5,57)
<b>Total</b>	319	387	377

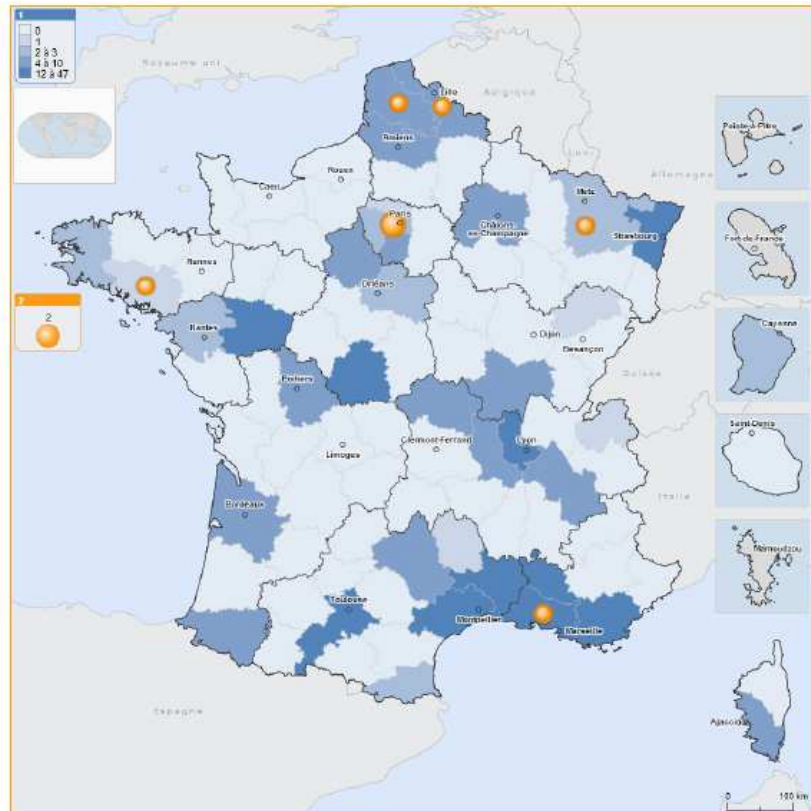


**Figure 3:** Répartition des PCR-ribotypes en 2018

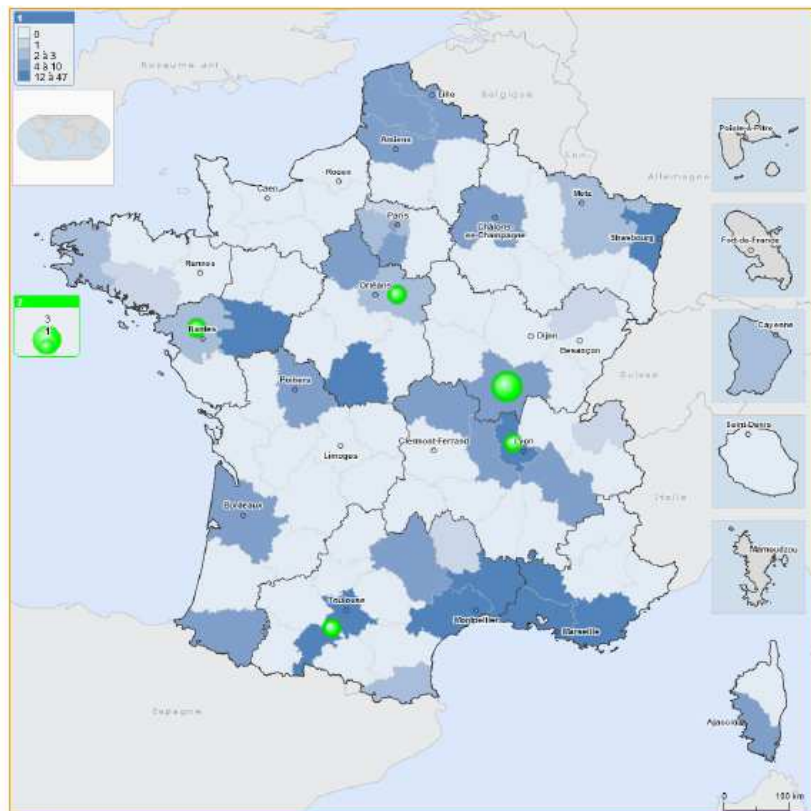
Les souches 014/020/077, 002 et 078 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 33.3% des souches toxigènes (**Tableau III, Figure 3**). Parmi les PCR-ribotypes « autres » les plus fréquemment retrouvés, on note le PCR ribotype FR099 (n=7), la FR038 (n=4) ainsi que la FR145 (n=4).

Parmi les 319 souches de *C. difficile* toxigènes, 14 (4%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, 7 (2%) souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **historique** » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine (souches isolées dans 5 départements) (**figure 4b**). Les **7 souches épidémiques 027** ont été isolées dans l'Aveyron (n=1), la Meurthe-et-Moselle (n=1), le Nord (n=1), le Morbihan (n=1), le Pas de Calais (n=1), et en Hauts de Seine (n=2) (**figure 4a**).

La souche 027 épidémique a été isolée pour la première fois en 2018 dans le département des Hauts de Seine. La souche 027 est présente sur tout le territoire. En 2017, 12 souches épidémiques 027 avaient été reçues au CNR contre 7 seulement en 2018. Le nombre de souches 027 reçues est en diminution. Cette diminution pourrait être liée à une implantation plus importante du test GeneXpert (Cepheid) qui permet une identification présomptive de la souche.

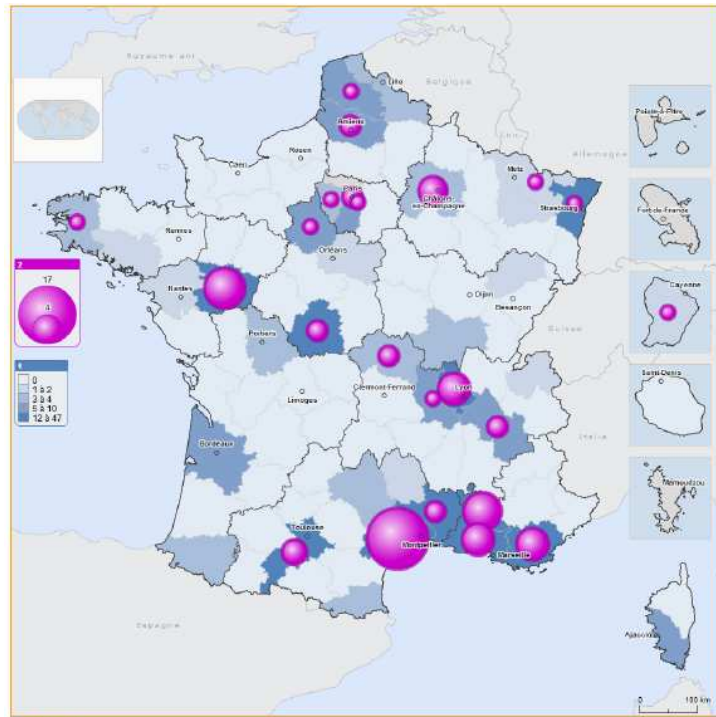


**Figure 4a** : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques (cercles oranges) en fonction des départements, en 2018. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en bleu.

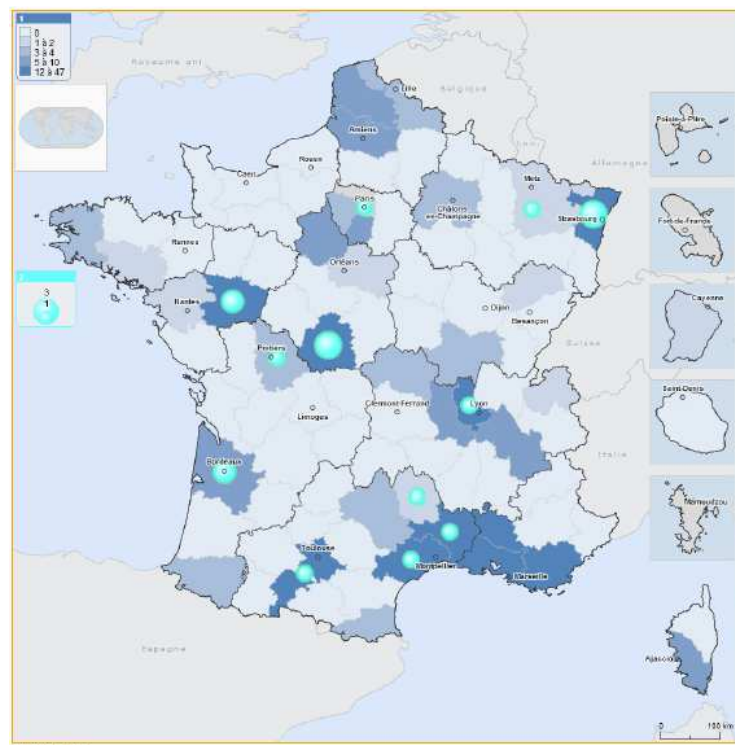


**Figure 4b** : Répartition des souches PCR-ribotype 027 historiques (cercles verts) en fonction des départements, en 2018. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en bleu.

Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé parmi les souches reçues au laboratoire est le 014/020/077, isolé sur tout le territoire (**figure 5**). Les souches de PCR-ribotype 002 arrivent en 2<sup>ème</sup> position (**figure 6**). Les souches de PCR-ribotype 078 arrivent en 3<sup>ème</sup> position.



**Figure 5 :** Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 (cercles roses) en fonction des départements en 2018. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en bleu.



**Figure 6 :** Répartition des souches PCR-ribotype 002 (cercles bleus) en fonction des départements en 2018. Les départements ayant envoyé des souches toxigènes sont représentés en bleu.



Au cours de l'année 2018 une augmentation de la proportion de souches non 027 possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Evolution de la proportion de souches productrices de toxine binaire.

	2018	2017
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	319	385
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	77	99
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	24,1	25.7
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	14	37
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs souches non 027 (%)	19,7	16.1

### 3-3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

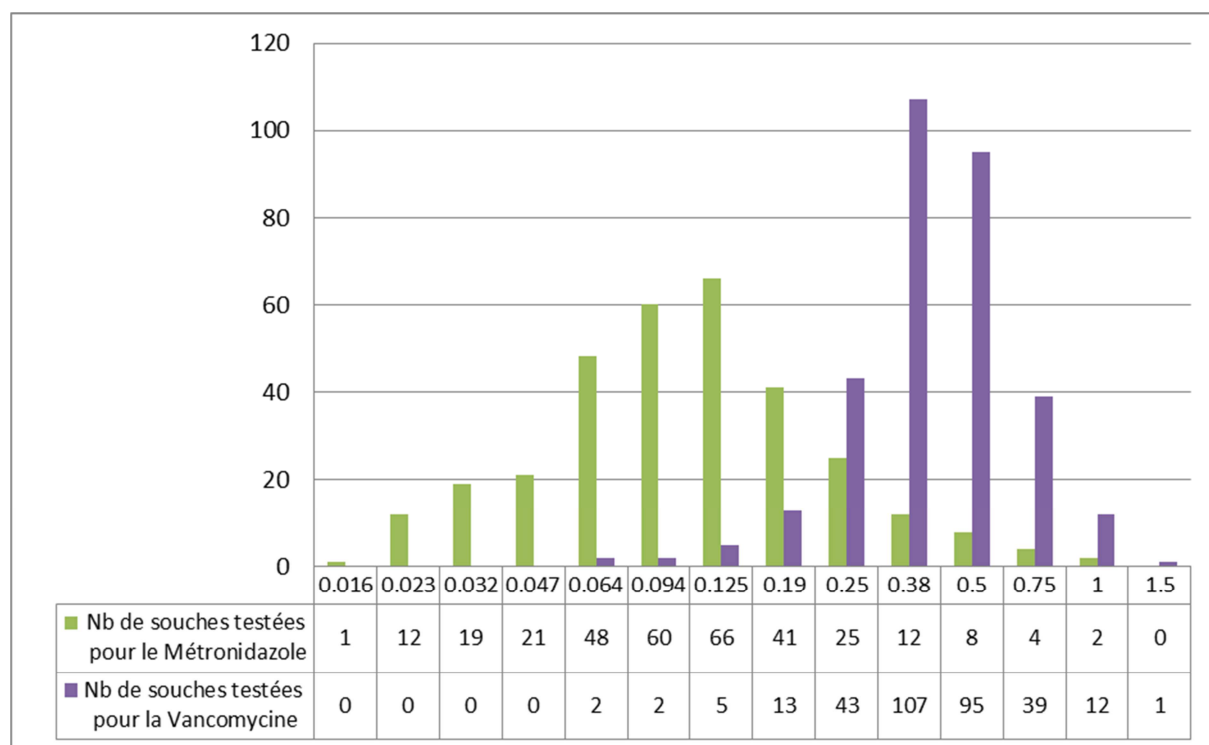
La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline (méthode des disques) a été testée pour 319 souches de *C. difficile* toxigènes en 2018. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 319 souches.

Les taux de résistance (R+) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm) de 24.5%, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm) de 97.5%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21 mm) de 20.7%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm) de 10.3% (**Tableau V**).

Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine (CMI ≤ 2 mg/l) selon l'EUCAST) et au métronidazole (CMI ≤ 2 mg/l selon l'EUCAST). La répartition des CMI pour les 319 souches toxigènes est présentée **figure 7**.

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

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline
% de souches	<22 mm	<15 mm	<21 mm	<19 mm
2017	38.7	98.9	35.6	8
<b>2018</b>	24.5	97.5	20.7	10.3

**Figure 7** : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 319 souches toxigènes.

### 3-4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

#### 3-4-1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France

Les résultats de typage bactérien sont enregistrés sur un site web sécurisé ([https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test\\_cookie=1&voo\\_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf](https://epidemiopasteur.fr/anaerobies/enquetes/1399392638/scripts/authentify.php?test_cookie=1&voo_665809112=cc4dfdb7b5995439bf9eb811fae4ddaf)). Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches et d'éditer un compte-rendu des résultats. Depuis août 2009, l'identification de 10 PCR-ribotypes (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 027, 053, 078/126 et 106) régulièrement retrouvés en France a été mise en place. L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à SPF.

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

De plus, F. Barbut, J. Couturier et C. Gateau sont régulièrement en contact avec B. Coignard ou A. Carbonne (Santé Publique France) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

### 3-4-2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

- **F. Barbut** est membre de l'**ESGCD** (European Study Group on *C. difficile*).
- **F. Barbut** a participé au projet **ClosER** (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes) en 2017.
- **F. Barbut** a participé aux projets **LuCID2** (Longitudinal European *C. difficile* infection diagnostic surveillance study) (Davies *et al.*- soumis).
- **F. Barbut** participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'**ECDC** sur la surveillance des infections à *C. difficile*. Il est notamment intervenu à un Workshop organisé par l'ECDC sur le diagnostic des infections à *C. difficile* en 2017 et 2019 et participe au projet « **Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections** » projet piloté par l'ECDC.
- **F. Barbut** est le coordonnateur français de l'étude européenne COMBACTE-CDI. Il s'agit d'une étude **non interventionnelle** dont les objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire.

### 3-4-3 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

#### 1. Surveillance par le réseau DIFTEC

DIFTEC<sup>®</sup> est un logiciel accessible gratuitement à partir du site diftec.fr ou diftec.net et est destiné aux professionnels de santé hospitaliers. Cet outil a pour finalité l'évaluation des pratiques diagnostiques et thérapeutiques des infections à *Clostridium difficile* au niveau des établissements de santé.

Ce logiciel donne la possibilité aux utilisateurs d'analyser leurs données localement mais également de regrouper leurs données anonymisées avec d'autres centres qui le souhaitent pour effectuer des analyses spécifiques, régionales voir nationales. Chaque utilisateur reste responsable de vérifier l'exactitude de l'analyse des résultats produits par le logiciel.

Le projet DIFTEC<sup>®</sup> s'inscrit dans une démarche qualité d'échanges et d'amélioration des pratiques de soins.

DIFTEC<sup>®</sup> est piloté par un comité scientifique national d'experts et a reçu le soutien de la Société Française de Microbiologie (SFM), de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H). F. Barbut appartient au comité scientifique. Cette initiative est soutenue financièrement par le laboratoire Astellas Pharma, qui est propriétaire du logiciel mais n'a pas accès aux données saisies dans l'outil et ne génère aucune analyse à partir de celles-ci. Le projet DIFTEC<sup>®</sup> a reçu l'autorisation de la CNIL (Décision DE-2015-081 - Traitements de données à caractères personnel de santé à des fins d'évaluations ou d'analyse des pratiques et des activités de soins et de prévention relevant de la procédure des articles 62 à 66 de la loi du 6 janvier 1978 modifiée). Les données des patients sont traitées de telle sorte que les personnes ne peuvent être identifiées.

Les centres peuvent s'inscrire à un Observatoire National des pratiques : dans ce cas, chaque centre s'engage à renseigner de manière exhaustive **tous les épisodes d'ICD** dans la base DIFTEC au **minimum 1 mois par semestre** et à envoyer pour une caractérisation les souches isolées pendant cette période au Laboratoire *C. difficile* associé au CNR. Les centres participants acceptent que le comité scientifique visualise et analyse leurs données. Le CNR s'engage à retourner les résultats de ces caractérisations aux centres participants. Les résultats de cet observatoire au niveau local et national seront transmis par le comité scientifique à tous les centres participants. Une réunion annuelle de restitution est organisée pour les membres de l'Observatoire (réunion du 21 /01/2019) et des résultats sont régulièrement présentés à des congrès (RICAI ou JNI)

GRAVET A, VACHEE A, BARBUT F, GUERY B, VANHEMS P, BOUTOILLE D, VANJAK D pour le Réseau National Diftec. *Clostridium difficile* (surveillance DIFTEC) : écart avec les recommandations ESCMID 2014. 38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-090)

## 2. COMMUNODIFF (Prévalence de *Clostridium difficile* dans les diarrhées communautaires).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Nesrine Day (Laboratoire du Chemin Vert, Paris) et a été financée par le laboratoire Alère.

L'objectif principal de cette étude non interventionnelle est de mesurer la prévalence des infections à *C. difficile* (ICD) chez des patients ambulatoires présentant une diarrhée communautaire. Les objectifs secondaires sont (i) de déterminer la proportion d'ICD sous-diagnostiquée par absence de suspicion clinique et (ii) de caractériser les patients atteints d'ICD communautaires.

BARBUT F., DAY N., BOUÉE S., YOUSOUF A., GRANDVOINET L., CASTELLA W., LALANDE V., COUTURIER J., ECKERT C.

*Toxigenic Clostridium difficile carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study.*

*Clin. Microbiol. Infect.* 2019, sous presse.

## 3. European surveillance of *Clostridium difficile* infections (Surveillance européenne des infections à *C. difficile*) (2017).

Le réseau BMR-RAISIN a introduit la composante « *Clostridium difficile* » dans la surveillance des BMR en s'appuyant sur la méthodologie proposée par l'ECDC (surveillance « light ») (données agrégées du nombre total de cas d'ICD communautaires et nosocomiales, nombre de journées d'hospitalisation, nombre de recherches de *C. difficile* réalisées) (Tableau VI). Les données sont analysées conjointement par Santé Publique France (Anne Carbone, Mélanie Colomb-Cotinat) et le CNR.

Tableau VI : Données du module ICD BMR-RAISIN en 2016 et 2017

Module optionnel ICD	Nb hôpitaux participants	selles testées/100 00JH	selles positives	% selles positives	HAI incidence	CA ou Unk Incidence	Total incidence
<b>2016</b>							
TOTAL	203	47,4	4,7	9,9	1,9	1,7	3,6
primaire	82	29	3,1	10,6	0,9	1,1	2
secondaire	100	51,8	4,8	9,2	2	1,7	3,7
tertiaire	12	51,7	6,1	11,9	2,8	1,9	4,7
specialized	9	71,5	5,8	8,1	2,7	2,7	5,5
<b>2017</b>							
TOTAL	207	45,3	4,6	10,2	2	1,6	3,6
primaire	86	28,2	2,9	10,4	1,1	1,3	2,4
secondaire	97	47,2	4,2	8,8	1,7	1,6	3,3
tertiaire	14	54,6	6,8	12,5	3,3	1,9	5,2
specialized	10	72,3	7,5	10,3	3,4	2,7	6,1

## 4-ALERTE

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (ARS et CPIas) des épidémies et des cas sévères d'infections (cf guide Raisin, [http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide\\_raisin/](http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/)). Il s'agit d'une surveillance ciblée. Les établissements réalisant un signalement doivent envoyer au laboratoire associé les souches isolées de l'épisode signalé afin d'assurer la surveillance de l'éventuelle dissémination du clone épidémique 027 sur le territoire français ainsi que celle d'autres clones émergents. Les données de typage sont accessibles en temps réel au responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de Santé Publique France. De plus chaque responsable des CPIas a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

## 5-ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

### 5-1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

#### 5-1-1 Enseignements

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Année d'études ou diplôme	Type d'enseignement	Nb d'heures en 2017
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours	2 h
Universités Paris V, VI et VII	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours	2h
Université Paris VI, UPMC	Réanimation	DU en soins infirmiers de réanimation et urgences vitales	Cours	2h
Université Paris V, VII - Denis Diderot- Versailles - Saint-Quentin en Yvelines - Bordeaux II P. Broca	Infectiologie	DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse	Cours	2h
Université Paris V René Descartes	Infectiologie	DU antibiotiques et antibiothérapie	Cours	2h
Université Mérieux, Lyon	Bactériologie (formation sur les Anaérobies)	Techniciens de laboratoire ou biologistes	Cours	2h

### 5-1-2 Activités de Formations continues

Cadre de l'enseignement	Discipline concernée	Public concerné	Type d'enseignement	Nombre d'heures effectuées-Année
Staff de service	Réanimation	Médecin	Hôpital Tenon	1h-2018
Staffs de service, Hôp. Saint antoine, Réanimation médicale (Pr B. Guidet) Maladies infectieuses (Pr PM Girard)	Réanimation Maladies infectieuses	Médecins	Staff de service	1h00-2018
Congres de la SRLF	Réanimateurs	Réanimateurs	Congrès annuel de la SRLF	30 min. 2019

### 5-1-3 Stagiaires accueillis

**Julianne Sedeno**, BTS Bioanalyse et contrôle, Ecole Nationale de chimie physique et biologie de Paris (ENCPB)

**Alice Freton**, Projet personnel de recherche (5<sup>ème</sup> année de pharmacie DFASP2 - Filière PHBMR)

**Auguste Wolfrom**, PIR Microbiologie, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris Descartes

### 5-1-4 Liste des guides élaborés

**BARBUT F.**, DONSKEY CJ.

Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*

In "Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice",

Edited by David H. Persing *et al.*, 3rd Edition, Press, Washington, DC. 10.1128/9781555819071.ch16 (p185-196).

KUIJPER E., **BARBUT F.**

« *Clostridium* »

In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press 2019, pp 968-995

TSCHUDIN-SUTTER S, KUIJPER E, DUROVIC A, VEHRESCHILD M, **BARBUT F**, ECKERT C, FITZPATRICK F, HELL M, NORÉN T, O'DRISCOLL J, COIA J, GASTMEIER P, VON MÜLLER L, WILCOX M., WIDMER A, on behalf of the Committee\*

Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings  
Clin Microbiol Infect. 2018 Oct;24(10):1051-1054.

**BARBUT F**, GATEAU C, COUTURIER J

Prévention et contrôle des infections à *Clostridium difficile*

*Hygienes 2017, XX, 5, 281-289*

Fiche EFFICATT . « *Clostridium difficile* » INRS 2018

### 5-1-5 Modalités et cibles de diffusion

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition des numéros de téléphone (01 49 28 09 89/01 71 97 09 86/01 71 97 09 85) et des adresses email ([frederic.barbut@aphp.fr](mailto:frederic.barbut@aphp.fr), [cecile.gateau@aphp.fr](mailto:cecile.gateau@aphp.fr), [jeanne.couturier@aphp.fr](mailto:jeanne.couturier@aphp.fr)) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostiques, hygiène). Bien que le nombre d'appels ne soit pas formellement enregistré, on peut estimer leur fréquence à un minimum de 1 appel par jour ouvrable.

Les demandes de renseignements ou de conseils se font directement par téléphone ou e-mail auprès des responsables du CNR.

- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>  
Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017.
- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à santé publique France et aux Cepias. Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats qui est envoyé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- Site web RAISIN et de Santé Publique France : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>
- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » ([http://invs.santepubliquefrance.fr//publications/2006/guide\\_raisin/conduite\\_clostridium\\_difficile.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr//publications/2006/guide_raisin/conduite_clostridium_difficile.pdf))

### 5-2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

F. Barbut, Cécile Gateau ou Jeanne Couturier ont été régulièrement en contact avec Anne Carbone et Mélanie Colomb-Cotinat (Santé Publique France) pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

### 5-3 Conseil et expertise pour d'autres cibles

F. Barbut participe aux groupes de travail sur la transplantation fécale pilotés par l'ANSM d'une part et l'Académie de Pharmacie d'autre part. Il est membre du **GFTF** (Groupe Français de Transplantation Fécale), groupe dirigé par Harry Sokol et créé en 2016.

## 6- TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS

Depuis Janvier 2018, F. Barbut est directeur adjoint de l'unité INSERM UMR S-1139 à la faculté de Pharmacie de Paris. La thématique développée par cette unité est centrée sur le microbiote intestinal et ses relations avec les entéropathies et l'allergie alimentaire. Un axe de recherche important concerne la TMF (Transplantation de Microbiote Fécal) et ses nouvelles voies d'administration (selles congelées, lyophilisat) dans le cadre notamment des infections à *C. difficile*.

### 6-1 Activités de recherche

#### 6-1-1 Etude SERODIFF : réponse immunitaire vis-à-vis de *C. difficile*

Investigateur principal : M. Greder, Versailles, responsable scientifique A. Le Monnier, Paris. F. Barbut fait partie du comité de pilotage (Soutien financier : Sanofi Pasteur).

Ce projet cherche à comprendre la réponse immunitaire des patients dans les infections à *C. difficile* et le poids de cette immunité comme facteur de risque d'infection. Ce projet multi-centrique (15 centres) a démarré en 2013 et est financé par Sanofi Pasteur. Les inclusions ont été terminées en 2016 et les souches ont été caractérisées par notre laboratoire. L'année 2017 a été consacrée à l'interprétation des résultats et la rédaction du rapport d'étude.

A la date du 10 juin 2017, 123 souches de *C. difficile* (directement envoyées par les centres participants ou isolées des selles de la coprothèque) ont été caractérisées. Parmi ces souches, 116 étaient des souches toxigènes et 7 souches étaient des souches non toxigènes de *C. difficile*. Toutes les souches toxigènes présentaient à la fois les gènes de la toxine A et B à l'exception d'une souche qui s'est avérée *tcdA+tcdB-* (souches de toxinotype XI, PCR ribotype 033). Deux souches épidémiques 027 ont été également isolées.

Le gène régulateur négatif *tcdC* a été caractérisé pour les souches toxigènes : 11 souches présentaient une délétion -39 pb (PCR ribotypes 078, 126, 033, FR128), 11 souches une délétion de -18pb (PCR ribotypes 027, 106, 015, FR007, FR038), et deux souches une délétion de -54 pb (PCR ribotype 023). Les autres souches n'avaient pas de délétion dans *tcdC*.

Sur les 123 souches, 16 avaient les deux gènes *cdtA* et *cdtB* de la toxine binaire, 15 étaient négatives vis à vis des deux gènes (dont les 7 souches non toxigènes) et 92 avaient des pseudo-gènes.

La distribution des PCR ribotypes indique une grande hétérogénéité des clones isolés avec seulement 5 PCR ribotypes regroupant plus de 5 isolats chacun : 014/20/77 (22 souches), 106 (6 souches), 002 (6 souches), 015 (11 souches), 018 (8 souches).

L'année 2018 a été consacrée à l'analyse des sérologies sur un nombre restreint de sera. (Réunion à Pasteur 5/09/2018 et 17/10/2018).

#### 6-1-2 Etude EVADE : évaluation *in situ* de l'activité sporicide de l'Anioxyfloor

Soutien financier : laboratoire Anios.

Après avoir évalué l'activité *in vitro* de l'Anioxyfloor (APA) par la méthode des porte-germes, nous avons comparé son efficacité à celle de l'eau de Javel (EJ) en conditions réelles d'utilisation. Une étude prospective, bi-centrique de type « avant-après » en cross over multiple a été réalisée dans 2 services cliniques. Pour tout patient ayant une infection à *C. difficile* (ICD), la chambre était prélevée avant bionettoyage puis dans les 2 heures suivant le bionettoyage. La contamination



environnementale a été mesurée à J0, J+1, J+2, entre J+7 et J+10 et à la sortie du patient. Quinze sites ont été prélevés (12 surfaces, 2 prélèvements d'air, un prélèvement de siphon). La satisfaction des utilisateurs a été évaluée à l'aide d'un questionnaire.

Quarante patients ayant une ICD ont été inclus : 14 chambres ont été désinfectées par l'EJ et 26 chambres par l'APA. Au total, 4441 prélèvements ont été réalisés incluant les prélèvements de surface (n=3288), d'air (n=548) et de siphons (n=221). Le taux global de contamination par *C. difficile* était de 6,66 % pour les surfaces, 10,03% pour l'air, et de 6,79 % pour les siphons. Les sites les plus fréquemment contaminés **avant bionettoyage** étaient : le sol des toilettes (23.13%) les lunettes de toilettes (15.67 %), et le lavabo (14.18%) ; la table de nuit (10.45%), les barreaux de lit (8.21%) et les boutons d'appel (8.21%). Le taux de contamination avant bionettoyage décroissait avec le temps et était corrélé à l'intensité de la diarrhée et l'incontinence du patient.

La comparaison de la contamination avant et après bionettoyage indique une réduction significative à la fois dans le bras EJ (13,4% versus 7,4%, réduction relative de 44,5%, p=0,0005) et dans le bras APA (10,4% versus 5,8%, réduction relative de 44,3%, p<0,0001). En revanche, la satisfaction globale des utilisateurs était largement en faveur de l'APA en raison de sa simplicité et de sa rapidité d'utilisation (p<0.001).

La contamination par *C. difficile* des chambres de patients ayant une ICD est fréquente. La réduction de la contamination est équivalente avec l'EJ et l'APA mais la satisfaction des utilisateurs est en faveur de l'APA en raison de sa simplicité d'utilisation.

COUTURIER J, SYED ZAIDI R, FOUQUET C, GATEAU C ECKERT C, BARBUT F

Comparaison de l'activité in situ de l'hypochlorite de sodium et d'un détergent-désinfectant vis-à-vis des spores de *Clostridium difficile* : résultats d'une étude prospective en cross-over.

Hygiènes, 2018 - Volume XXVI - n° 5, 185-192

### 6-1-3 **PREMAFLORA : Caractérisation génotypique de souches de *C. difficile* isolées dans une population de prématurés**

Cette étude se fait en collaboration avec l'équipe EA 4065 : Ecosystème intestinal, probiotiques et antibiotiques, Paris V (Pr M.J. Butel, Dr J. Aires, L. Ferraris).

Si le portage asymptomatique de *Clostridium difficile* est élevé chez le nouveau-né, il n'existe pas de données concernant les nouveau-nés prématurés (NPP) dont la période d'hospitalisation peut être prolongée. L'objectif était d'analyser la fréquence et la cinétique de colonisation par *C. difficile* des NNP pendant la 1<sup>ère</sup> année de vie et de caractériser les souches isolées.

Une étude prospective longitudinale et monocentrique (Saint Vincent de Paul, Paris) a été menée sur une population de 124 NNP sains (inclusions 2008-2009). Les prélèvements de selles correspondaient aux périodes d'hospitalisation (1S: 1 semaine (≤8 jours) (nombre d'enfants prélevés, n=85) ; 1M : 1 mois (20j-40j) (n=84); SH : sortie de l'hôpital (j4-j149) (n=113)) et post hospitalisation (1-3 mois, n=38 ; 3-6 mois, n=23 ; 6-9 mois, n=27 ; 9-12 mois, n=23 ; >12 mois, n=34). *C. difficile* a été recherché sur milieu sélectif. La détection des toxines dans les selles a été réalisée par un test immuno-enzymatique. Les souches ont été caractérisées par PCR-ribotypage et PCR-multiplex (gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA*, *cdtB* et *tpi*).

Sur 379 échantillons analysés, 199 (52,5%) étaient positifs à *C difficile* en culture. Parmi ces échantillons, 10 étaient positifs avec une souche toxigène (5%) et 189 avec une souche non toxigène (NT) (95%). Les souches toxigènes ont toutes été isolées de selles prélevées après la sortie de l'hôpital. La fréquence de colonisation par les souches NT était de 20, 61, et 60% respectivement pour les prélèvements à 1S, 1M et SH. La majorité (94%) des souches NT appartenait aux PCR-ribotypes (PR) FR082 et (CE)032. Après la sortie de l'hôpital et avant 12 mois, la proportion

de NNP colonisés était proche de 70% (PR FR082 et (CE)032 majoritairement) ; après 12 mois, la fréquence diminue à 53% et s'accompagne d'une augmentation du nombre de PR identifiés. L'étude de la cinétique de colonisation a permis de montrer qu'un même NNP peut être colonisé par différents PR au cours du temps.

Pendant la période d'hospitalisation les NNP se colonisent avec des souches de *C. difficile* NT avec une fréquence élevée. La fréquence de colonisation tend à diminuer après la sortie de l'hôpital et se caractérise par une diversification des PR et l'apparition de souches toxigènes.

*FERRARIS L, COUTURIER J, ECKERT C, DELANNOY J, BARBUT F, BUTEL MJ, AIRES J.*

*Carriage and colonization of C. difficile in preterm neonates: A longitudinal prospective study. PLoS One. 2019 Feb 20;14(2):e0212568. doi: 10.1371/journal.pone.0212568. eCollection 2019*

#### 6-1-4 **Etude DAFNE : Observatoire de l'utilisation de la fidaxomicine en France**

Soutien financier : laboratoire Astellas

La fidaxomicine est un antibiotique macrocyclique utilisé pour les infections à *C. difficile* (ICD). Deux essais de phase 3 randomisés double-aveugle ont montré que la fidaxomicine était non inférieure à la vancomycine pour le traitement des ICD et entraînait significativement moins de récurrences que la vancomycine. Peu de données sont disponibles sur son utilisation en routine en France.

Une étude observationnelle prospective multicentrique longitudinale a été conduite auprès de 27 sites entre septembre 2014 et août 2017. Ont été inclus les patients adultes avec un diagnostic microbiologique d'ICD. Le choix du traitement était laissé à l'initiative du médecin traitant. L'objectif principal était de décrire les caractéristiques des patients traités par fidaxomicine. L'objectif secondaire était d'étudier les caractéristiques des patients non traités par fidaxomicine et qui ont été inclus dans un registre pendant 3 périodes de 1 mois en 2015, 2016 et 2017. Pour les patients recevant la fidaxomicine, un autre objectif secondaire était de préciser le nombre et le délai des récurrences au cours des 3 mois qui ont suivi la fin du traitement.

Au total 447 patients avec une ICD (294 traités par fidaxomicine et 150 recevant un autre traitement) ont été inclus. Les patients traités par fidaxomicine ou une autre molécule étaient immunodéprimés dans respectivement 39.1% et 26% des cas, avaient une récurrence dans 36.3% et 9.3% des cas et une ICD sévère dans 59.2% et de 35.8% des cas. Parmi les 281 patients traités par fidaxomicine et pour lesquels un suivi a été possible, 259 (92.2%) ont été guéris cliniquement et 16.3% ont présenté une récurrence dans les 3 mois qui ont suivi. Les effets indésirables sont survenus dans 40.9% des cas, les effets sévères dans 27.7% des cas mais les effets secondaires liés à la fidaxomicine seulement dans 5.4% des cas.

Cette étude montre qu'en condition réelle d'utilisation, la fidaxomicine s'avère efficace et bien tolérée pour les traitements des ICD, notamment chez les patients immunodéprimés, les patients âgés de plus de 65 ans et les patients ayant une forme sévère d'ICD.

*GUERY B, BERGER P, GAUZIT R, GOURDON M, BARBUT F*

*"French observational study of fidaxomicin use for Clostridioides difficile infection". 38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-089) Thérapie 2018, soumis*

*GUERY B, BERGER P, GAUZIT R, GOURDON M, BARBUT F*

*"French observational study of fidaxomicin use for Clostridioides difficile infection". 38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-089)*

### 6-1-5 **Etude QALIFF : Qualité de vie des patients infectés par *C. difficile*.**

Soutien financier : laboratoires MSD

L'impact de l'infection à *Clostridium difficile* (ICD) sur la qualité de vie des patients est peu évalué. Une étude observationnelle a été conduite dans 7 établissements de santé en 2016 pour évaluer le retentissement de l'ICD à l'aide de deux questionnaires de qualité de vie : le EQ5D (non spécifique) et le Cdiff 32 (spécifique de l'ICD). Ces questionnaires ont été remplis à 7± 2 jours après le diagnostic d'ICD. Le questionnaire Cdiff 32 comprend 32 questions explorant les domaines physique, social et mental du patient. Chaque question est cotée de 0 (pire qualité de vie) à 100 (meilleure qualité de vie). 80 patients ont été inclus : l'âge médian était de 71 ans et 45% des patients étaient des hommes. Le score global Cdiff32 était de 50.4 (SD : 17.1) avec d'importantes variations selon les patients (min 18.3, max 90.2). L'impact le plus fort concernait les plaintes physiques (41.6), et l'anxiété (41.6). Le score global était significativement corrélé à la sévérité de l'infection (définie par le score de Zar) et les récurrences d'ICD ( $p=0.0154$ ). L'analyse par régression a montré une corrélation positive entre les deux échelles de qualité de vie ( $R^2=0.317$ ).

BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V., DUBURCQ A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, FAGNANI F

*Quality of life and utility decrement associated with Clostridium difficile infection in a French hospital setting.*

*Health Qual Life Outcomes. 2019 Jan 11;17(1):6. doi: 10.1186/s12955-019-1081-5.*

FAGNANI F, DUBURCQ A, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, JEANBAT V, **BARBUT F**

*Quality of life and utility decrement associated with Clostridium difficile infection in French acute care facilities.*

*20th ISPOR Annual European Congress*

*Glasgow, Scotland 4-8 Novembre (poster PIN78)*

### 6-1-6 **Etude DCDiff : Surmortalité liée aux infections à *C. difficile***

Soutien financier : laboratoires MSD

Les études évaluant la surmortalité liée aux infections à *Clostridium difficile* (ICD) aboutissant à des résultats contradictoires, cette étude avait pour objectif d'estimer, en France, l'impact des ICD en termes de mortalité et de ré-hospitalisation.

Une cohorte historique a été constituée à partir de l'échantillon au 1/97ème de la base de remboursement de l'Assurance Maladie. Afin de ne sélectionner que des primo-infections à *C. difficile*, les patients hospitalisés pour la première fois avec un diagnostic principal, relié ou associé d'ICD ont été inclus entre 2007 et 2014 après exclusion de ceux hospitalisés pour cette infection en 2006. La survie et les ré-hospitalisations de ces patients ont été comparées à celles d'un groupe contrôle de patients ayant été hospitalisés sur la même période, sans diagnostic d'ICD et appariés selon un score de propension. Ce score a été calculé à partir des variables : âge, sexe, score de Charlson, durée d'hospitalisation, année d'hospitalisation et principales comorbidités. Un modèle de Cox a permis d'estimer le *hazard ratio* de décès dans le groupe infecté par *Clostridium difficile* comparativement au groupe contrôle.

482 patients ayant eu une ICD ont été appariés à 964 témoins. Les 2 groupes étaient similaires au regard des caractéristiques ayant contribué au calcul du score de propension. Une

augmentation statistiquement significative du risque de décès a été observée dans le groupe de sujets atteints d'une ICD avec un *hazard ratio* non ajusté de 1,65 (IC95%=[1,33 ; 2,04]) et ajusté de 1,58 (IC95%=[1,27 ; 1,97]). Les risques relatifs ajustés de décès étaient 1,78 (IC95%=[1,18;2,70]) à 28 jours, 1,52 (IC95%=[1,17;1,98]) à 3 mois, 1,52 (IC95%=[1,20;1,93]) à 6 mois et 1,64 (CI95%=[1,32;2,03]) à 12 mois. Les analyses de sensibilité réalisées ont abouti à des résultats similaires et statistiquement significatifs. Les proportions de sujets ré-hospitalisés dans l'année ayant suivi l'hospitalisation initiale étaient de 52,5 et 41,2% ( $p < 0,0001$ ) et les nombres moyens de ré-hospitalisations étaient de 5,5 et 3,2 ( $p < 0,0001$ ) respectivement dans les groupes ICD et contrôle.

Les ICD sont responsables d'une surmortalité et d'une ré-hospitalisation plus fréquente en comparaison à une population similaire en termes d'âge, de sexe, de comorbidités et de durée d'hospitalisation.

**BARBUT F, BOUÉE S, LONGEPIERRE L, GOLDBERG M, BENSOUSSAN C, LEVY-BACHELOT L.**

*Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with Clostridium difficile infection: a French Health Insurance Database analysis.*

*J Hosp Infect. 2018 Jan;98(1):21-28*

### 6-1-7 Microbiological support to European surveillance of *Clostridium difficile* infections (2016-2018)

Soutien financier : ECDC

Ce projet est organisé sous l'égide de l'Université de Leiden (E. Kuijper) et implique un consortium de 4 laboratoires de référence (Royaume-Uni, Autriche, Pays-Bas et France). Il est financé par l'ECDC.

Les objectifs de ce projet sont d'améliorer les stratégies de diagnostic des infections à *C. difficile* des laboratoires des Etats Membres, et d'améliorer les capacités des laboratoires à typer les souches de *C. difficile*. Notre laboratoire intervient dans 2 workpackages (Work package 1: Increase of CDI diagnostics and PCR ribotyping by train-the-trainer activities in EU/EEA Member States, and WP4: « Monitor and maximise the effectiveness of train-the-trainer activities »).

Réunion ECDC du 22 mai 2019 (à venir) et participation à l'ESCMID Summer school du 3 juillet 2018 (Barbut F., *Clostridium difficile* infections: current threats)

### 6-1-8 Prévalence des souches de *Clostridium difficile* productrices de toxine binaire en France

Cette étude est pilotée par Y. Caspar et Max Maurin (Grenoble) et financée par les laboratoires Cepheid.

Les données concernant la prévalence de la toxine binaire chez les souches autres que le PCR ribotype 027 sont relativement limitées en France. La toxine binaire a été récemment incriminée comme un facteur pouvant potentialiser les effets des toxines A et B et conduire à des formes plus sévères d'infections. Une étude multicentrique rétrospective a été conduite auprès de 9 laboratoires (Paris, Lyon, Grenoble, Nantes, Montpellier, Lille, Boulogne-Billancourt and Roubaix) utilisant le GeneXpert *C. difficile* BT comme méthode de diagnostic des ICD. Ce test dépiste le gène *tcdB*, *cdtB* et une délétion en position 117 dans le gène régulateur *tcdC*. Un total de 10154 selles a été analysé entre janvier et juin 2017 : la toxine B a été retrouvée dans 1123 selles (11.1%). La toxine binaire a été détectée dans 177/10154 échantillons de selles (1,7%) mais associée à la présence potentielle du clone 027 dans 21/177 (11.9%) des souches seulement. Parmi les 1123 souches produisant le toxine B, 153 non-027 souches (13.6%) produisaient la toxine binaire. La présence de la toxine binaire était

plus importante dans le Sud de la France. Par ailleurs, 3 souches ne produisaient que la toxine binaire.

GATEAU C., YOUSSEUF A., SYED ZAIDI R, COUTURIER J, BARBUT F ET CASPAR Y  
"Epidémiologie moléculaire des souches de *Clostridium difficile* circulant en France en 2017-2018"

38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (P-130)

## 6-2 Liste des publications et communications

### 6-2-1 Publications nationales

COUTURIER J., BARBUT F.

Transplantation de microbiote fécal et infections à *Clostridium difficile*  
Feuillets de Biologie, 2018 Feuillets de Biologie n°342 - Mai 2018, 57-64

COUTURIER J, SYED ZAIDI R, FOUQUET C, GATEAU C, ECKERT C, BARBUT F

Comparaison de l'activité in situ de l'hypochlorite de sodium et d'un détergent-désinfectant vis-à-vis des spores de *Clostridium difficile* : résultats d'une étude prospective en cross-over.  
Hygiènes, 2018 - Volume XXVI - n° 5, 185-192

GATEAU C, COUTURIER J, ECKERT C, LALANDE V, BARBUT F. Actualités sur les infections à *Clostridium difficile*. Revue Francophone des laboratoires – Vol 208- n°505, Octobre 2018

### 6-2-2 Publications internationales

KRUTOVA M, KINROSS P, BARBUT F, HAJDU A, WILCOX MH, KUIJPER EJ. SURVEY CONTRIBUTORS.

How To: Surveillance Of *Clostridium difficile* Infections  
Clin Microbiol Infect. 2018 May;24(5):469-475.

BARBUT F, BOUÉE S, LONGEPIERRE L, GOLDBERG M, BENSOUSSAN C, LEVY-BACHELOT L.

Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with *Clostridium difficile* infection: a French Health Insurance Database analysis.  
J Hosp Infect. 2018 Jan;98(1):21-28

COUTURIER J., DAVIES K., GATEAU C., BARBUT F.

Ribotypes and new virulent strains of *C. difficile* across Europe  
Adv Exp Med Biol. 2018;1050:45-58.

GATEAU C, COUTURIER J, COIA J, BARBUT F. How to: Diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. Clinical Microbiology and Infection. 2018 May;24(5):463-468.

TSCHUDIN-SUTTER S, KUIJPER E, DUROVIC A, VEHRSCCHILD M, BARBUT F, ECKERT C, FITZPATRICK F, HELL M, NORÉN T, O'DRISCOLL J, COIA J, GASTMEIER P, VON MÜLLER L, WILCOX M., WIDMER A, on behalf of the Committee\*

Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings  
Clin Microbiol Infect. 2018 Oct;24(10):1051-1054.

DE CURRAIZE C, ROUSSEAU C, CORVEC S, EL-HELALI N, FIFMAN V, BARBUT F, COLLIGNON A, LE MONNIER A.

Variable spectrum of disease and risk factors of peripartum *Clostridium difficile* infection: report of 14 cases from French hospitals and literature review.  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Dec;37(12):2293-2299

KHANAFER N, VANHEMS P, BARBUT F, ECKERT C, PERRAUD M, VANDENESCH F, LUXEMBURGER C, DEMONT C; CDI01 Study Group.  
Outcomes of *Clostridium difficile*-suspected diarrhea in a French university hospital.  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Nov;37(11):2123-2130

ECKERT C, DEVALLIÈRE T, SYED-ZAIDI R, LALANDE V, BARBUT F.  
Evaluation of a novel molecular assay to diagnose toxigenic strains of *Clostridium difficile*.  
Anaerobe. 2018 Aug;52:111-114.

EYRE DW, DAVIES KA, DAVIS G, FAWLEY WN, DINGLE KE, DE MAIO N, KARAS A, CROOK DW, PETO TEA, WALKER AS, WILCOX MH; EUCLID STUDY GROUP .  
Two Distinct Patterns of *Clostridium difficile* Diversity Across Europe Indicating Contrasting Routes of Spread.  
Clin Infect Dis. 2018 Sep 14;67(7):1035-1044. doi: 10.1093/cid/ciy252.

Barbut F., , Day N., Bouée S., Youssef A., Grandvoinet L., Castella W., Lalande V., COUTURIER J., Eckert C.  
*Toxigenic Clostridium difficile carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study.*

BARBUT F, GALPERINE T, VANHEMS P, LE MONNIER A, JEANBAT V., DUBURCQ A, ALAMI S, BENSOUSSAN C, FAGNANI F  
Quality of life and utility decrement associated with *Clostridium difficile* infection in a French hospital setting.  
Health Qual Life Outcomes. 2019 Jan 11;17(1):6.

L. ASSOUVIE, M. COLOMB-COTINAT, J. DURAND, A. BERGER-CARBONNE, C. DANIAU, L. LEON, S. MAUGAT, S. SOING-ALTRACH, C. GATEAU, J. COUTURIER, I. ARNAUD, P. ASTAGNEAU, LE GROUPE BMR-RAISIN, F. BARBUT  
Epidemiology of *Clostridium difficile* infections in France 2010-2017  
Eurosurveillance, 2019 accepté, en révision.

### 6-2-3 Communications nationales

GRAVET A, VACHEE A, BARBUT F, GUERY B, VANHEMS P, BOUTOILLED, VANJAK D pour le Réseau National Diftec.  
*Clostridium difficile* (surveillance DIFTEC) : écart avec les recommandations ESCMID 2014  
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-090)

GUERY B, BERGER P, GAUZIT R, GOURDON M, BARBUT F  
"French observational study of fidaxomicin use for *Clostridioides difficile* infection".  
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-089)

C. GATEAU , S. DEBOSCKER , J. COUTURIER , T. VOGEL , E. SCHMITT , J. MULLER, C. MENARD , B. TURCAN , R. SYED ZAIDI , A. YOUSOUF, T. LAVIGNE , F. BARBUT  
"Epidémie d'infections à *Clostridium difficile* de PCR-Ribotype 018 investiguée par MLVA, wgMLST et cgSNP"  
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (CO-050)

GATEAU C., YOUSOUF A., SYED ZAIDI R, COUTURIER J, BARBUT F ET CASPAR Y  
"Epidémiologie moléculaire des souches de *Clostridium difficile* circulant en France en 2017-2018"  
38ème RICAI, Paris, 17-18 décembre 2018 (P-130)

ASSOUVIE L, COLOMB-COTINAT M., DURAND J, MAUGAT S, GATEAU C, COUTURIER C, BARBUT F, BERGER-CARBONNE A et le réseau des 17 Cepias Infections à *Clostridium difficile* en France : bilan des données disponibles.

XXIXème congrès national de la SF2H, Montpellier, France, 2018

#### 6-2-4 Communications internationales

C. GATEAU , S. DEBOSCKER , J. COUTURIER , T. VOGEL , E. SCHMITT , J. MULLER , C. MENARD , B. TURCAN , R. SYED ZAIDI , A. YOUSOUF , T. LAVIGNE, F. BARBUT

Outbreak of *Clostridium difficile* PCR-Ribotype 018 investigated by MLVA and wgMLST.

28ème ECCMID, Madrid, Espagne, Avril 2018

COUTURIER J, GATEAU C, SYED-ZAIDI R, YOUSOUF A, BELLOULOU L, LALANDE V, ECKERT C, BARBUT F. Evaluation of a novel point-of-care diagnostic assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile* strains.

28th ECCMID, Madrid, Espagne

C. GATEAU , S. DEBOSCKER , J. COUTURIER , T. VOGEL , E. SCHMITT , J. MULLER , C. MÉNARD , B. TURCAN , R. SYED ZAIDI , A. YOUSOUF , T. LAVIGNE, F. BARBUT

Subtyping *Clostridium difficile* PCR-Ribotype 018 strains by analysis of virulome, resistome, SNPs, wgMLST and MLVA

6ème ICDS, Bled, Slovénie, 12-14 Septembre 2018.

GATEAU C, GOUOT C, LAPIDUS N, COUTURIER J, LALANDE V, FOUSSADIER A, BANZ A, BARBUT F.

The SIMOA assay for detection of *Clostridium difficile* toxins has a better sensitivity than the cytotoxicity assay. ICDS,

Bled, Slovénie 12-14 septembre 2018

#### 6-2-5 Conférences sur invitations

##### **BARBUT F.**

*Clostridium difficile*: current threats

ESCMID summer school 2018, Paris

3 juillet 2018

##### **BARBUT F.**

*Clostridium difficile* : updates

Cepheid Championship Club, Chypre

20 octobre 2018

##### **BARBUT F.**

Infections à *C. difficile* et immunodépression

16ème journée du Groupe Transplantation et Infection

Paris, 18 mai 2018

##### **BARBUT F.**

Récidives d'infections à *C. difficile* : peut-on les prévenir ?

Colloque « Prévenir le risque infectieux chez l'immunodéprimé »

Lyon, 28 mars 2018

##### **BARBUT F.**

*C. difficile* en pathologie humaine ; rôle du CNR

Séminaire de l'ANSES (invitation Olivier Firmesse)  
11 décembre 2018, Maison Alfort

## 6-2-6 Chapitres de livres

CH23-BARBUT F., DONSKY CJ.

Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*

In "Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice",

Edited by David H. Persing *et al.*, 3rd Edition

2016 ASM Press, Washington, DC. 10.1128/9781555819071.ch16 (p185-196).

KUIJPER E., BARBUT F.

« *Clostridium* »

In « Manual of Clinical Microbiology », 12th edition, ASM press

2019 pages 968-994

## 7-COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

**Projet DiaBloClo : Caractérisation de souches de *C. botulinum* et *C. difficile* au cours de la digestion anaérobie mésophile d'effluents d'élevages bovins.**

### **Collaboration, Dr LeMaréchal, Anses Laboratoire de Ploufragan**

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

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

Le projet DiaBoClo a pour objectifs de :

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

Le projet DiaBoClo permettra de connaître les caractéristiques (sensibilité aux antibiotiques, typage des souches via l'utilisation de méthodes de référence et du séquençage des génomes d'une



sélection de souches) des souches de *C. botulinum* et de *C. difficile* qui circulent dans la filière bovine et qui sont susceptibles d'être disséminées dans l'environnement lors de l'épandage des fumiers ou des digestats de méthanisation.

Le Maréchal, C., Boscher, E., Repérant, E., Rouxel, S., Poezevara, T., Houdayer, C., Nagard, B., Barbut, F., Druilhe, C., Pourcher, A.M., Denis, M.. Evaluation de la contamination de digestats de méthanisation par des bactéries pathogènes sporulantes et non-sporulantes. In: Congrès de la société française de microbiologie, Cité des sciences et de l'industrie, Paris, 9-11 octobre 2017.

LE MARECHAL, C., DRUILHE C., REPERANT E., BOSCHER E., ROUXEL S., LE ROUX S., POEZEVARA, T., ZIEBAL C., HOUDAYER, C. NAGARD B. BARBUT F. POURCHER AM DENIS M. Evaluation of the occurrence of sporulating and non-sporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. MicrobiologyOpen 2019 Submitted

## 8-PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2019-2020

Le programme d'activité pour 2019-2020 est centré sur les activités suivantes :

### **8-1 Détermination des CMI d'inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de *C. difficile* et détermination du support génétique de la résistance.**

Cette étude se fait en collaboration avec P. Minoprio (IP Pasteur) et Philippe Uriac (Université de Rennes). Elle vise à étudier les concentrations minimales inhibitrices de différents inhibiteurs de proline racemase vis-à-vis d'un panel de souches de *C. difficile* par la méthode de dilution en milieu gélosé. Le support de la résistance sera étudié par séquençage des gènes de la proline racemase. L'activité des composés les plus actifs sera étudiée sur le modèle hamster de colite à *C. difficile* prétraité par clindamycine.

### **8-2 Apport du whole genome sequencing (WGS) dans l'épidémiologie des infections à *Clostridium difficile*.**

Le typage moléculaire est un outil essentiel pour surveiller les ICD et les épidémies dans les établissements de santé. Il joue aussi un rôle clé dans la surveillance de la dissémination et de l'émergence de certains clones de *C. difficile* dans le monde. A l'heure actuelle, le ribotypage par PCR est la méthode la plus utilisée en Europe, notamment dans l'étude des épidémies au niveau local, national et européen. Néanmoins, cette méthode ne dispose pas d'un pouvoir discriminant suffisant pour obtenir une bonne compréhension de l'évolution de certains clones de *C. difficile*.

Le séquençage complet du génome (WGS : Whole Genome Sequencing ou NGS : Next Generation Sequencing) appliqué à une espèce bactérienne permet de suivre l'histoire naturelle et démographique des populations. L'analyse génomique rend ainsi possible l'identification précise des changements génétiques (souvent liés à la virulence et aux phénotypes de résistances aux antibiotiques). La comparaison des souches après WGS peut se faire soit par l'analyse des SNP (Single-Nucleotide Polymorphism - souches ayant une différence d'un seul nucléotide) soit par l'analyse du core genome MLST (cg-Multi Locus Sequence Typing - nombre de gènes du core génome présentant une différence quelle que soit sa nature). Ces méthodes sont caractérisées par un pouvoir discriminant supérieur à celui issu des méthodes classiques de typage génétique. Le WGS est aussi

très utile pour l'épidémiologie en santé publique car il permet un suivi plus précis des phénomènes de transmissions et de l'émergence de nouveaux clones. Par ailleurs, une étude a montré que le WGS pourrait produire des données pratiques dans un délai relativement court permettant d'influencer la gestion du patient et ainsi contrôler la dissémination lors d'une épidémie.

Cependant, il est encore difficile d'utiliser le WGS en routine comme méthode de typage moléculaire. Cette technique souffre d'inconvénients notables comme le coût de l'équipement et la complexité d'analyse des données et fait l'objet de nombreux travaux d'optimisation. Certains programmes informatiques basés sur l'analyse des souches par cg-MLST sont actuellement en cours d'évaluation tel le programme EpiSeq V2.0 que nous utiliserons dans cette thèse en collaboration avec les laboratoires BioMérieux.

Cécile Gateau s'est inscrite en thèse de science en 2017 et son sujet portera sur les aspects suivants :

- Evaluer le pouvoir discriminant du cg-MLST à partir d'une collection de souches de *C. difficile* déjà caractérisées au niveau du Centre National de Référence et appartenant aux PCR ribotypes les plus fréquents. Nous nous attacherons à comparer la phylogénie des souches générée par les deux méthodes de typage et leur cohérence.
- Investiguer une épidémie de *C. difficile* de PCR-ribotype 018 (PCR-ribotype peu fréquent) survenue dans un hôpital de l'Est de la France pour étudier le lien de clonalité entre ces souches. Celles-ci seront caractérisées par leurs phénotypes de résistances, par leur virulome (PCR multiplex) ainsi que par l'analyse des SNP (WGS-SNP) et du cg-MLST à l'aide du programme EpiSeq V2.0 (BioMérieux). L'analyse de ces souches sera comparée à des souches de même PCR ribotype isolées dans d'autres établissements de santé (donc non épidémiologiquement reliées). Cette étude permettra d'évaluer la pertinence de la phylogénie basée sur le cg-MLST.
- Etudier les récurrences d'ICD (principales complications) en comparant par analyse des SNP, les souches isolées du premier épisode et celles isolées de récurrences. Nous pourrions ainsi déterminer la fréquence des rechutes (même souche) et celle de réinfections (souches différentes).
- Déterminer la fréquence de transmission des souches de *C. difficile* dans un CHU en caractérisant systématiquement toutes les souches isolées sur une année par cg-MLST et en analysant les résultats en fonctions des données épidémiologiques des patients (analyse spatio-temporelle des séjours des patients). Nous nous intéresserons en particulier à la composante cryptique de la transmission (c'est-à-dire la transmission de la même souche sans lien évident spatial ou temporel entre les patients). Nous évaluerons la supériorité de discrimination de la phylogénie basée sur le cg-MLST par rapport au PCR-ribotypage, en particulier son implémentation dans l'outil EpiSeq V2.0.

### 8-3 COMBACTE-CDI

COMBACTE CDI -CDI (**Combatting Bacterial Resistance in Europe- *Clostridium difficile* infections**) est une étude multicentrique européenne **non interventionnelle** concernant les infections à *Clostridium difficile*. Ses objectifs sont de connaître le poids des infections à *C. difficile* en Europe, leurs facteurs de risques, les modalités de traitements, l'évolution clinique des patients infectés, et les méthodes et stratégies diagnostiques utilisées au laboratoire. Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des anaérobies est chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Elle sera réalisée auprès de 22 laboratoires d'établissements hospitaliers.

Le principe de cette étude est simple. Il s'agit d'adresser un aliquot de **toutes les selles** (indépendamment de la prescription de *C. difficile*) reçues au laboratoire un « jour donné » (1 jour en **juin 2018** et un jour en **octobre 2018**) au **centre hospitalier de Leeds (UK)** qui recherchera systématiquement *C. difficile* et analysera les souches (PCR-ribotypage, WGS). Il sera ensuite demandé aux laboratoires de compléter, après avoir recueilli la non opposition du patient, des données rétrospectives cliniques concernant l'évolution de certains patients infectés par *C. difficile* et de témoins négatifs.

Cette étude est financée par le programme Innovative Medicines Initiative (European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013))

## **8-4 DIFALIBO**

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

Peu de données sont actuellement disponibles en France sur les souches de *C. difficile* qui pourraient être retrouvées dans les différents réservoirs/sources de contamination à l'origine des infections humaines communautaires, que ce soit en termes de prévalence ou de caractérisation. L'objectif de ce projet sera de mener une étude préliminaire afin d'évaluer la contamination d'aliments impliqués dans des toxi-infections alimentaires et d'obtenir des premiers éléments sur la prévalence de *C. difficile* dans un des réservoirs potentiels de contamination à partir de l'analyse de contenus intestinaux de bovins.

La recherche et isolement de *C. difficile* dans la filière bovine se fera par le Laboratoire de Ploufragan). L'unité HQPAP dispose d'environ 900 contenus intestinaux de bovins (veaux et gros bovins) collectés dans le cadre du projet BOVICA. L'unité HQPAP a déjà réalisé des isollements de *C. difficile* à partir d'intrants et de digestats de méthanisation dans le cadre du projet Clodia. Elle maîtrise donc l'approche proposée ici et qui sera également transférée à l'unité SBCL du LSAI pour l'isolement des *C. difficile* à partir d'aliments.

La recherche et isolement de *C. difficile* dans les aliments (LSAI) se fera par l'Unité LCSV du LSAI de Maisons-Alfort qui traite annuellement un millier d'échantillons alimentaires impliqués dans des TIAC. La recherche de *C. difficile* sera réalisée sur ces échantillons et plus particulièrement sur ceux à base de viande bovine.

La caractérisation des souches de *C. difficile* se fera par le laboratoire *C. difficile* associé au CNR des Anaérobies (PCR virulence, ribotypage et détermination de la sensibilité aux antibiotiques)

## **8-5 Clostridium difficile chez les enfants prématurés : relations avec le microbiote intestinal.**

La prévalence de *C. difficile* chez l'enfant < 2 ans est fréquente et varie, selon les études, de 2% à 70%. La colonisation est due à des souches toxigènes et non toxigènes. Cette colonisation est rarement suivie d'une infection, malgré la détection de toxines libres dans les selles de ces enfants. Le suivi de cohortes d'enfants a montré que la colonisation en milieu communautaire a lieu soit de manière précoce (acquisition néonatale), soit de manière plus tardive entre 4 et 6 mois. Les souches toxigènes sont identiques aux souches isolées chez l'adulte, suggérant que les enfants pourraient représenter un réservoir de souches pathogènes. La dynamique de colonisation dépend de différents facteurs, notamment des facteurs environnementaux comme le mode d'accouchement, le traitement antibiotique de la mère, ou le type d'alimentation. Rousseau *et al.* ont montré, en analysant la composition du microbiote fécal par méthode TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis), que certaines signatures bactériennes étaient associées à la colonisation par *C.*

*difficile*. Par exemple, la présence de *Ruminococcus gnavus* et *Klebsiella pneumoniae* était plus fréquente chez les patients colonisés, et inversement la présence de *Bifidobacterium longum* était associée à l'absence de colonisation. Ces résultats suggèrent que la composition du microbiote intestinal est cruciale dans le développement de la colonisation sans toutefois pouvoir déterminer la chronologie des événements.

Les données concernant les enfants prématurés et la colonisation par *C. difficile* ainsi que son impact sur le développement du microbiote intestinal de l'enfant sont très rares. Les objectifs du travail sont :

- d'étudier le microbiote intestinal par métagénomique ciblée sur le gène codant l'ARNr 16S afin de tenter d'identifier des signatures bactériologiques associées à la présence ou à l'absence de colonisation ou des profils prédictifs de la colonisation (grâce au suivi longitudinal)

- d'étudier la relation entre la colonisation par *C. difficile* et l'environnement clinique du prématuré.

Ce projet bénéficiera de cohortes déjà constituées pour lesquelles des échantillons de selles ont été conservés :

- Cohorte monocentrique comprenant le suivi de 124 prématurés pendant leur hospitalisation (à une semaine de vie et un mois) mais aussi après leur hospitalisation (cohorte PREMAFLORA).

- Cohorte multicentrique EPIFLORE (étude ancillaire de la cohorte EPIPAGE) comprenant 600 enfants prématurés. Ces enfants ont eu des prélèvements à une semaine de vie, un mois et à la sortie du service et, pour certains d'entre eux, à l'âge de 3 ans 1/2.

- Cohorte CLOSNEC comprenant 40 enfants prématurés atteints d'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) ayant été comparés à environ 90 prématurés appariés sur l'âge et le service.

Ce projet bénéficiera de l'expertise de notre équipe INSERM S-1139 en matière d'analyse de microbiote fécal (culture, PCR quantitative, séquençage de l'ADNr 16S) et de sa connaissance des facteurs environnementaux influençant le développement du microbiote de l'enfant ainsi que celle du Laboratoire *C. difficile* associé au Centre National de Référence des bactéries anaérobies pour la caractérisation des souches de *C. difficile*.

## 8-6 Comparaison du QuickChek GDH et du Quick Chek complete

Ces deux tests sont fréquemment utilisés en France pour le diagnostic des ICD. Certains utilisateurs nous ont rapporté des discordances entre les résultats du dépistage de la glutamate deshydrogénase (GDH) par le test quick Chek et le Quick Chek Complete (Abbott, Alere). Or le laboratoire qui fabrique ces deux tests assure qu'ils utilisent strictement les mêmes réactifs (anticorps monoclonaux anti GDH). Notre objectif est de comparer les résultats de ces tests à partir de selles congelées ou fraîches positives à *C. difficile* et d'évaluer la sensibilité analytique par dilution sériée de selle positive en GDH.

## 8-7 CoNOTOX =Etude des propriétés de souches non toxigènes de *Clostridium difficile*

Actuellement, le traitement d'un premier épisode d'ICD, d'une première récurrence ou d'une ICD sévère repose sur l'utilisation per os du métronidazole, de la vancomycine ou de la fidaxomicine. Paradoxalement, bien qu'efficace, cette antibiothérapie va contribuer à entretenir une dysbiose intestinale, qui constitue le principal facteur de risque d'ICD. Dans ce contexte, se sont développées des approches alternatives à l'antibiothérapie, comme la transplantation de microbiote fécal (ou

TMF), qui a montré une grande efficacité dans les cas des ICD multi-récidivantes. Parmi les approches prometteuses, l'utilisation de souches de *C. difficile* non toxigènes (NTCD) ne produisant pas les toxines A et B (et donc considérées comme non pathogènes) se sont montrées efficaces dans la prévention des récidives d'ICD *in vivo* chez le hamster et chez la souris gnotobiotique. Lors d'un essai de prévention des ICD chez des patients ayant déjà eu un épisode d'ICD ou une récurrence (essai de phase II randomisé, en double aveugle, contrôlé, versus placebo), les spores de NTCD M3 se sont révélées bien tolérées chez l'homme et ont été associées à une réduction significative de l'apparition de récidives d'ICD.

Au cours d'une étude prospective longitudinale, monocentrique, menée sur une cohorte de 121 prématurés, nous avons montré que 95% se sont colonisés pendant leur hospitalisation notamment par deux clones de *C. difficile* non toxigènes (NTCD) de ribotype FR082 et 032

Notre objectif est d'évaluer le potentiel des souches NTCD FR082 et 032 à prévenir le développement des ICD *in vivo* en modèle animal de hamster prétraité par clindamycine et infecté par la souche épidémique 027. Nous étudierons également les propriétés de ces souches non toxigènes en particulier :

- leur capacité de sporulation
- leur pouvoir d'adhésion sur modèle cellulaire Caco-2.
- le fitness des souches sera réalisée par co-culture bactérienne *in vitro*

Résultats attendus :

Les données de la caractérisation phénotypique (sporulation, fitness, adhérence) permettront de connaître spécifiquement la capacité de colonisation de chacune des souches candidates NTCD. Les résultats *in vivo* permettront de définir la capacité des souches FR082 ou 032 à prévenir l'apparition d'un premier épisode de ICD.

## 9-ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU LABORATOIRE ASSOCIE

### 9-1 Missions et objectifs majeurs du laboratoire associé

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

### 9-2 Organisation du laboratoire associé *Clostridium difficile*

<b>CNR <i>Clostridium difficile</i></b>			
Hôpital Saint-Antoine			
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage			
34 rue Crozatier			
75012 PARIS			
<b>Pr Frédéric Barbut</b> +33 1 49 28 30 11 ou frederic.barbut@aphp.fr			
<b>Cécile Gateau</b> +33 1 71 97 09 86 ou <a href="mailto:cecile.gateau@aphp.fr">cecile.gateau@aphp.fr</a>			
<b>Dr Jeanne Couturier</b> +33 1 71 97 09 85 ou jeanne.couturier@aphp.fr			

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	Professeur des universités -Praticien hospitalier	0,2	AP-HP
C. Gateau	Ingénieur hospitalier	1	SPF
J. Couturier	Assistant Hospitalo-universitaire	0,2	AP-HP
V. Lalande	Praticien Hospitalier	0,2	AP-HP
A. Youssouf	Technicienne	1	SPF
R. Syed-Zaidi	Technicienne	1	Autre
Réception/secrétariat/gestion		0,2	AP-HP

Personnel médical : 3 (ETP global : 0.6)

Personnel non médical : 4 (ETP global : 3.2)

### 9-3 Locaux et équipements du laboratoire associé

#### 9-3-1 Locaux

Le plan du service est représenté sur la figure 1.

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

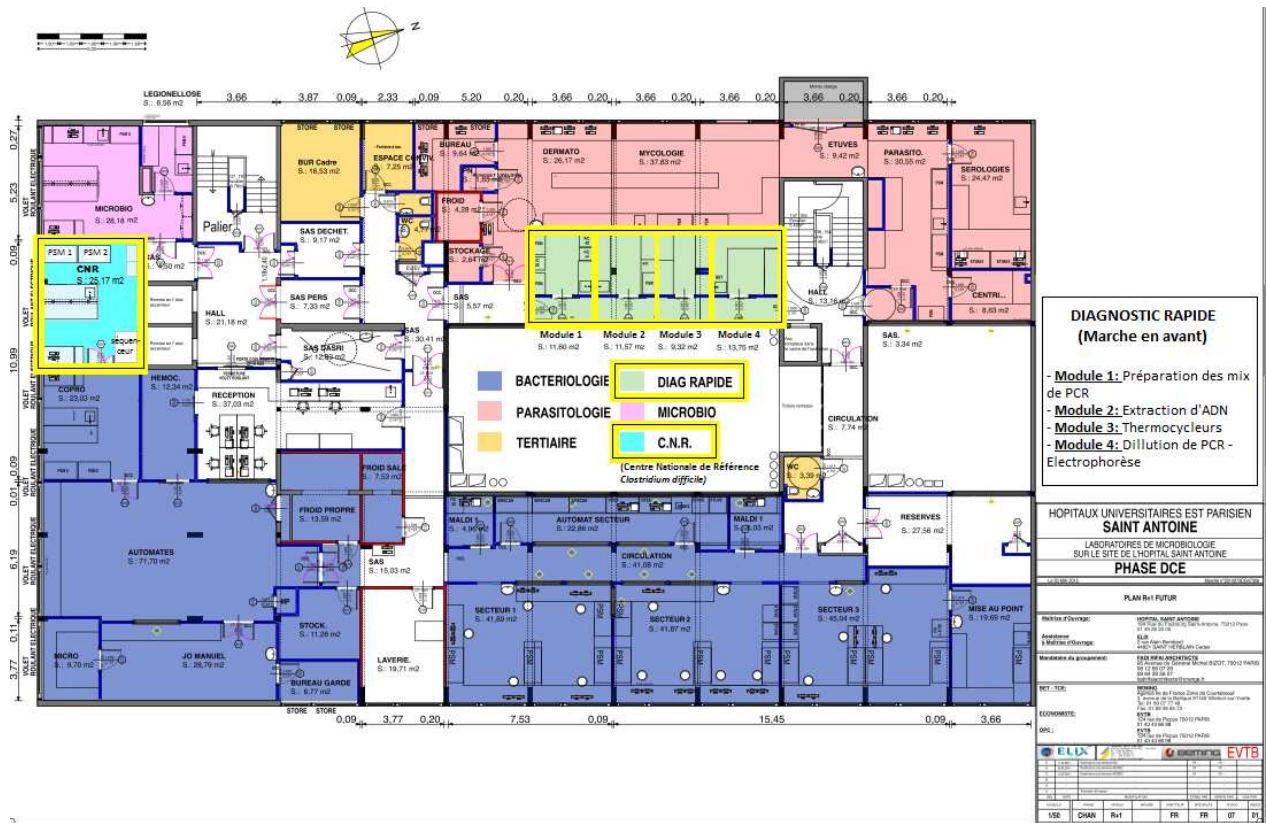


Figure 1 : plan des locaux (encadré en jaune : pièces utilisées par le personnel du CNR)

### 9-3-2 Equipements

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

- 1 Centrifugeuse 5430R (Eppendorf)
- 1 Mini Centrifugeuse de paillasse (Extra Gen Bleu)
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)
- 1 Etuve 37°C (Thermo Scientific)
- 2 Balances
- 1 Agitateur magnétique chauffant (Bioblock)
- 5 Cuves électrophorèse BioRad et 4 Cuves Mupid-EX
- 1 Lecteur analyseur d'image (Biorad)
- 2 Hottes PCR (Thermo-copro)
- 2 Hottes Bactériologie (Optimale 12)
- 1 Réfrigérateur-congélateur (Liebherr)
- 3 Réfrigérateurs sous paillasse (Liebherr)
- 2 Congélateurs -20°C (Liebherr)
- 1 Congélateur -20°C sous paillasse (Liebherr)
- 2 Congélateur -80°C (Froilabo)
- 1 Bain-Marie (Julabo)

CNR Bactéries anaérobies et botulisme et Laboratoire associé *Clostridium difficile*

- 1 Balance de précision (Sartorius)
- 1 Agitateur de microplaque (Labnet)
- 3 Thermocycleurs (1 Applied 9700 + 1 Proflex, 1 Verity)
- 2 Becs chauffant
- 5 Vortex
- 2 Bain-sec chauffant
- 1 Bain-sec (thermomix Bioer)
- 1 Microscope
- 1 Electrophorèse champs pulsé (Gene Path, BioRad)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)
- 1 logiciel GenMapper
- 1 séquenceur ABI3500
- 1 spectrophotomètre 600nm (Biochrom)
- 3 Pipettes Multicanaux (Dutscher)

### 9-3-3 Collections de matériel biologique

Toute souche de *C. difficile* reçue au laboratoire associée « *Clostridium difficile* » ainsi que les souches de référence sont conservées en milieu glycérolé à -80°C en deux exemplaires.

L'ADN des souches est conservé à -20°C.

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

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

### 9-4 Démarche qualité

- Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au pôle de Biologie médicale et Pathologie du GH HUEP (**Hôpitaux Universitaires Est Parisien**) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 (site cofrac, N°accréditation 8-2542)

- Un **contrôle externe de qualité** a été réalisé en 2018, pour la sixième année consécutive, en **collaboration avec le Centre National de référence en Belgique** (Pr. Michel Delmée). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridium difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper.

Un contrôle de **qualité européen** est organisé tous les ans par l'ECDC auprès des laboratoires volontaires qui participent au réseau de surveillance des ICD.

La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire), et la sensibilité à la moxifloxacine ont également été incluses dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité 2018 a permis de mettre en évidence une **bonne concordance** entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et nos méthodes.



## 10- ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE ASSOCIE

### 10-1 Liste des techniques de référence

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

- la détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, tétracycline, vancomycine)
- la détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée)
- la détection par PCR des fragments A3 du gène *tcdA* et B1 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B
- la détection par PCR des fragments A1 et A2 du gène *tcdA* et B2 et B3 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B, notamment pour la détermination de certains toxinotypes
- la détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes de restriction.
- la mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : les différents types de délétion du gène *tcdC* existants (18 pb, 39 ou 36 pb et 54 pb) sont déterminés après amplification puis séparation sur un gel d'agarose haute résolution et comparaison à des souches témoins
- la détection simultanée de 7 cibles : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvée chez les souches non toxigènes, par PCR multiplex et détection sur gel ou sur capillaire
- le typage par PCR-ribotypage qui est actuellement la technique de référence en Europe permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de comparer les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés. En plus du PCR-ribotype 027, l'identification de 9 PCR-ribotypes fréquents (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 053, 078/126 et 106) en France est maintenant possible par le réseau de laboratoires experts. La détection des fragments amplifiés est possible sur gel ou sur capillaire
- l'amplification de l'ARN 16S, l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) et la spectrométrie de masse (Maldi-TOF, Brücker) permettant l'identification de *C. difficile*
- l'amplification d'une séquence de 115 pb qui remplace le PaLoc chez les souches non toxigènes, permettant de confirmer l'absence des gènes *tcdA* et *tcdB* (PCR lok1-lok3).
- le typage des souches par MLVA (Multilocus Variable-number tandem repeat Analysis) et MLST (MultiLocus Sequence Typing) et par électrophorèse en champ pulsé (*SmaI*)

### 10-2 Liste des techniques recommandées

Sans objet