



**RESEAU NATIONAL DE SURVEILLANCE
DES *YERSINIA* ENTEROPATHOGENES**

***L'INVESTIGATION EPIDEMIOLOGIQUE
DE CAS GROUPES DUS AUX
YERSINIA ENTEROPATHOGENES***

Fascicule N° 23 – octobre 2019



Institut Pasteur

La caractérisation génotypique souches de *Yersinia*

- Depuis décembre 2017, la caractérisation des souches de *Yersinia* reçues au CNR est effectuée par une méthode génotypique qui a remplacé la méthode phénotypique (cf fascicule n°22).

- Le développement de cette méthode génotypique, basée sur une cgMLST, et sa validation ont été récemment publiés : Savin *et al.*, Microbial Genomics, 2019 :

<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000301>

- Pour rappel, par rapport à la caractérisation phénotypique classique, cette méthode d'identification génotypique possède plusieurs avantages :

- ✓ Identification plus résolutive des espèces et sous-espèces supplémentaires :
 - 19 espèces décrites et 7 nouvelles espèces identifiées mais pas encore décrites.

- nouvelles sous-espèces dans les espèces *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. mollaretii* et *Y. massiliensis*.

- ✓ Identification plus fiable des souches présentant des atypies phénotypiques.

- ✓ Elle permet d'obtenir des résultats plus rapidement.

- ✓ Elle est mise à disposition de tous les laboratoires disposant du génome complet.

Les *Yersinia* entéropathogènes

- Parmi les 19 espèces de *Yersinia* décrites, seules 2 ont un pouvoir entéropathogène :

- ✓ *Y. pseudotuberculosis* (tous génotypes).
- ✓ *Y. enterocolitica* (génotypes 1B, 2/3-9a, 2/3-9b, 3-3a, 3-3b, 3-3c, 3-3d, 4 et 5)

➔ Il est indispensable d'identifier le génotype car les souches de *Y. enterocolitica* des génotypes 1Aa et 1Ab ne sont pas pathogènes.

Epidémiologie des *Yersinia* entéropathogènes

- La grande majorité des souches sont responsables de cas sporadiques.

- Cependant, des épidémies dues à des *Yersinia* entéropathogènes ont déjà été décrites :

- ✓ Epidémie de 133 cas avec isolement de *Y. enterocolitica* du biosérotype 2/O:9 liée à la consommation de salade en Norvège en 2014 (MacDonald *et al.*, 2016, Euro Surveill)

- ✓ Epidémie de 220 cas avec isolement de *Y. pseudotuberculosis* en Nouvelle-Zélande en 2014 avec un point unique de contamination mais qui n'a pas été identifié (Williamson *et al.*, 2016 Genome Biol Evol)

- ✓ Epidémie de 57 cas due à *Y. enterocolitica* O:3 au Danemark et en Suède liée à la consommation d'épinard. (Espenhain *et al.*, 2019, Euro Surveill)

- En cas de suspicion de cas groupés ou d'épidémie, la proximité génétique des souches est évaluée pour savoir si elles sont reliées entre elles.

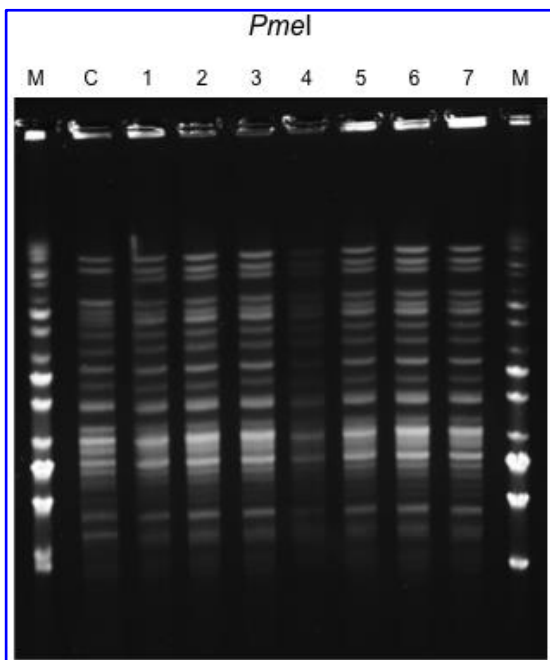
➔ Cela déclenche une alerte des autorités sanitaires qui vont rechercher une source commune de contamination.

Les méthodes de typage moléculaire

• Jusqu'à maintenant il y avait 2 techniques moléculaires de référence permettant d'évaluer le lien génétique entre plusieurs souches :

✓ L'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) :

L'ADN des souches étudiées est extrait puis digéré par une endonucléase à faible nombre de coupures. Les fragments digérés sont ensuite séparés par électrophorèse en champs pulsés. Un profil de restriction ou pulsotype est obtenu.



➔ La comparaison de ces pulsotypes permet d'établir un lien épidémiologique entre les souches comparées.

✓ La MLVA :

- Elle se base sur la variation naturelle du nombre de séquences d'ADN répétées en tandem sur le génome. Plusieurs loci ont des répétitions en tandem dans le génome des souches de *Y. enterocolitica*.

- Une PCR est effectuée pour chaque locus et la détermination du nombre de répétition se fait grâce à une électrophorèse en gel d'agarose ou une électrophorèse capillaire ou séquençage des amplicons.

- La détermination du nombre de répétition pour chaque locus permet d'obtenir un code numérique pour chaque souche étudiée

| locus | souche 1 | souche 2 | Souche 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| V2A | 10 | 10 | 12 |
| V4 | 3 | 3 | 6 |
| V5 | 10 | 10 | 11 |
| V6 | 6 | 6 | 7 |
| V7 | 13 | 9 | 6 |
| V9 | 5 | 5 | 8 |

➔ La comparaison de ces profils numériques permet d'évaluer la proximité génétique des souches comparées.

• Comparaison des performances des 2 méthodes :

| | PFGE | MLVA |
|----------------------|-------------|--------------|
| Pouvoir discriminant | Elevé | Très élevé |
| Reproductibilité | +/- | Très bonne |
| Coût | 7€ / souche | 20€ / souche |
| Temps | 4-5 jours | 2-3 jours |

✓ La MLVA a le meilleur pouvoir discriminant et une très bonne reproductibilité.

✓ Cependant la MLVA coûte cher et le temps requis pour la mettre en œuvre empêche d'effectuer l'investigation épidémiologique en temps réel.

➔ Considérant les faiblesses des techniques utilisées jusqu'à lors, et le fait que nous disposons du génome de toutes les souches identifiées au CNR, nous avons entrepris de développer une nouvelle méthode moléculaire très discriminante, rapide et peu coûteuse pour évaluer le lien épidémiologique entre différentes souches.

Développement d'une nouvelle méthode

- Une stratégie de cgMLST a été choisie pour chacune des 2 espèces entéropathogènes.

- A partir de notre base de données génomiques, pour chacune des 2 espèces, nous avons sélectionné les gènes communs à toutes les souches. Cela nous a permis de définir 2 nouveaux schémas cgMLST :

- ✓ *Y. enterocolitica* avec 1727 gènes.
- ✓ *Y. pseudotuberculosis* avec 1921 gènes.

- Comme pour notre méthode cgMLST du à 500 gènes permettant d'identifier et caractériser les souches de *Yersinia*, ces 2 nouveaux schéma cgMLST de typage pour *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* ont été créés dans le programme BIGSdb.

- Quand une souche de *Y. enterocolitica* ou *Y. pseudotuberculosis* est identifiée grâce à notre cgMLST du genre *Yersinia* :

- ✓ Le génome est ensuite scanné sur le schéma cgMLST spécifique de l'espèce entéropathogène correspondante (1727 ou 1921 gènes respectivement).

- ✓ Un profil allélique est ainsi obtenu pour chaque souche (cf ci-dessous). La comparaison de ces profils alléliques permet d'évaluer la proximité génétique des souches entre elles.

Extrait (9 gènes sur 1727) de la comparaison de 2 profils alléliques

| Locus | 6703 (2019/01369) | 6704 (2019/01370) |
|---------------------|-------------------|-------------------|
| yeen_YE1203_RS05170 | 1 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05200 | 1 | 35 |
| yeen_YE1203_RS05210 | 1 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05250 | 1 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05265 | 16 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05270 | 1 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05305 | 1 | 1 |
| yeen_YE1203_RS05325 | 31 | 31 |
| yeen_YE1203_RS05345 | 1 | 1 |

- ✓ Un programme informatique compare les profils alléliques des souches étudiées deux à deux et génère une matrice de distance entre ces souches.

➔ Cette matrice permet d'évaluer le nombre de gènes différents entre plusieurs souches (cf matrice ci-dessous).

| | souche 1 | souche 2 | Souche 3 |
|----------|----------|----------|----------|
| souche 1 | 0 | | |
| souche 2 | 3 | 0 | |
| souche 3 | 141 | 139 | 0 |

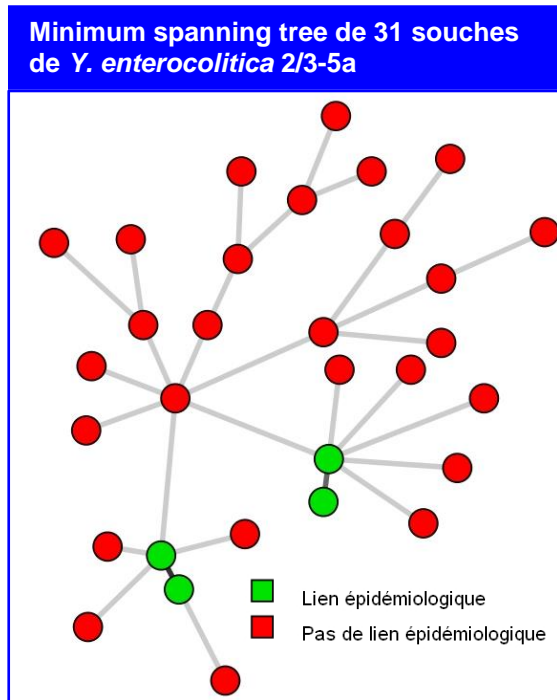
Détermination des seuils

- Afin de pouvoir établir un lien épidémiologique entre les souches comparées, nous avons dû établir des seuils significatifs de différence allélique.

- A partir de notre base de données génomiques comprenant 2341 souches de *Yersinia* entéropathogènes en 2018, nous avons évalué les distances entre les:

- ✓ souches sans lien épidémiologique.
- ✓ souches avec lien épidémiologique confirmé (cas familiaux, épidémie).

- Pour chacune des espèces, un minimum spanning tree (cf ci-dessous) a été généré à partir des matrices de distances entre souches.



➔ La longueur des branches reflète la distance (en nombre d'allèles différents) entre 2 souches.

1. Souches sans lien épidémiologique :

| Espèce | génotype | Distance minimale |
|------------------------------|----------|-------------------|
| <i>Y. enterocolitica</i> | 2/3-5a | 10 |
| | 2/3-9a | 10 |
| | 2/3-9b | 4 |
| | 3-3 | 10 |
| | 4 | 10 |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> | | 10 |

- Les souches de *Y. pseudotuberculosis* et de *Y. enterocolitica* des génotypes 2/3-5a,

2/3-9a, 3-3 et 4 ont une distance minimale de 10 différences alléliques

- Le génotype 2/3-9b de *Y. enterocolitica* est plus clonal car les souches présentent un minimum de 4 différences alléliques.

2. Souches avec lien épidémiologique :

- Pour les souches ayant un lien épidémiologique établi (même patient, même famille, même chaîne de transmission, etc.), il y avait toujours un maximum de 3 différences alléliques quel que soit le génotype.

3. Détermination du seuil

- A partir des distances observées entre souches avec ou sans lien épidémiologique, nous avons pu définir des seuils en dessous desquels les souches sont considérées proches génétiquement.

| Espèce | génotype | Seuil défini |
|------------------------------|----------|--------------|
| <i>Y. enterocolitica</i> | 2/3-5a | 5 |
| | 2/3-9a | 5 |
| | 2/3-9b | 3 |
| | 3-3 | ND* |
| | 4 | 5 |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> | | ND* |

ND : non déterminé

- Pour les souches de *Y. enterocolitica* génotype 3-3 et de *Y. pseudotuberculosis*, le seuil n'a pu être défini en raison de l'absence de souches ayant un lien épidémiologique entre elles.

➔ Ces souches étant rarement isolées, toute augmentation inhabituelle du nombre de ces souches reçues au CNR entrainera une comparaison plus fine des génomes.

En routine au CNR

- En pratique au CNR, nous évaluons régulièrement la proximité génétique des souches reçues.
- Cela nous a permis d'identifier à plusieurs reprises des souches identiques circulant au sein d'une même famille.
→ Nous avons alors alerté les autorités sanitaires pour rechercher la source de contamination.
- Nous pouvons aussi répondre à des demandes venant de l'étranger : en mars 2019, l'ECDC (European centre for Disease Prevention and Control) nous a demandé de comparer le génome de souches de *Y. enterocolitica* génotype 4 circulant en France avec une souche épidémique circulant en Suède et au Danemark.
→ Nous avons pu montrer que ce clone ne circulait pas en France.

Conclusion

- Nous avons développé une nouvelle méthode moléculaire pour investiguer le lien épidémiologique entre des souches entéro-pathogènes de *Yersinia*.
- Cette méthode, basée sur une cgMLST spécifique d'espèce, utilise les données issues du séquençage du génome des souches ayant déjà permis leur identification et leur caractérisation.

- Cette méthode est très rapide à mettre en œuvre puisqu'elle consiste en un traitement bioinformatique et ne nécessite aucune manipulation au laboratoire.
→ Elle permet d'alerter les autorités sanitaires (Santé Publique France) en temps réel en cas de suspicion de cas groupés ou d'épidémie
- Cette méthode a un pouvoir discriminant très élevé, au moins aussi élevé que les méthodes de référence (MLVA).
- Elle ne pèse pas sur le budget du CNR puisqu'elle n'utilise que des ressources informatiques.
- Elle est très reproductible et permet d'effectuer des comparaisons à l'échelle internationale très rapidement quand il y a une épidémie dans un pays étranger dès lors que le génome du clone responsable est séquencé.

Références

1. Savin C, Criscuolo A, Guglielmini J, Le Guern A-S, Carniel E, Pizarro-Cerdá J, Brisse S. **2019**. Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microbial Genomics*. doi : 10.1099/mgen.0.000301.
2. MacDonald E, Einöder-Moreno M, Borgen K, Thorstensen Brandal L, Diab L, Fossli Ø, Guzman Herrador B, Hassan AA, Johannessen GS, Johansen EJ, Jørgensen Kimo R, Lier T, Paulsen BL, Popescu R, Tokle Schytte C, Sæbø Pettersen K, Vold L, Ørmen Ø, Wester AL, Wiklund M, Nygård K. **2016**. National outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections in military and civilian populations associated with consumption of mixed salad, Norway, 2014. *Euro Surveill*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.34.30321.
3. Williamson DA, Baines SL, Carter GP, da Silva AG, Ren X, Sherwood J, Dufour M, Schultz MB, French NP, Seemann T, Stinear TP, Howden BP. **2016**. Genomic Insights into a Sustained National Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Biol Evol*. doi: 10.1093/gbe/evw285.
4. Espenhain L, Riess M, Müller L, Colombe S, Ethelberg S, Litrup E, Jernberg C, Kühlmann-Berenzon S, Lindblad M, Hove NK, Torpdahl M, Mörk MJ. **2019**. Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019. *Euro Surveill*. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.24.1900368.



RETOUR D'EXPERIENCE SUR LES PCR DE DIAGNOSTIC

De plus en plus de laboratoires membres du Réseau National de Surveillance des *Yersinia* entéropathogènes nous ont informé utiliser des PCR multiplex (comme le système BD MAX™) pour la détection des entéropathogènes avant d'effectuer la culture.

Afin d'avoir un retour des laboratoires utilisant ces techniques, nous vous remercions de bien vouloir remplir la fiche de renseignement clinique dans la rubrique adéquate (technique, cible pour les *Yersinia*, etc.).

Nous attirons votre attention sur le fait que la cible utilisée par le BD MAX™ pour identifier des *Yersinia* ne permet pas de détecter les *Yersinia pseudotuberculosis*. Ce système est utile pour orienter le diagnostic mais ne permet pas de s'affranchir de l'étape de culture.

DANS LE PROCHAIN FASCICULE,

***« BILAN EPIDEMIOLOGIQUE DES YERSINIOSES ENTERIQUES EN
FRANCE DE 2010 A 2019 »***



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA PESTE ET AUTRES YERSINIOSES

INSTITUT PASTEUR

UNITE DES *YERSINIA*

28, RUE DU DOCTEUR ROUX

75724 PARIS CEDEX 15 (France)

☎ 01 40 61 37 67 📠 01 45 68 89 54

Site web : <http://www.pasteur.fr>

CONTACT: Cyril SAVIN. E-mail : cyril.savin@pasteur.fr