

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME



Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines
Institut Pasteur, Paris

LABORATOIRE ASSOCIE AU CNR *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*



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

* * *

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ 2012

Unité Bactéries anaérobies et toxines :
Michel-R. POPOFF, Philippe BOUVET, Christelle MAZUET

Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales :
Frédéric BARBUT, Catherine ECKERT

Avril 2013

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	4
1.1. Résumé des activités 2012	5
1.2. Equipes	7
1.3. Démarche qualité.....	10
1.4. Locaux et équipements.....	11
2. ACTIVITES D'EXPERTISES	14
2.1. Capacités techniques du CNR	14
2.1.1. Techniques disponibles.....	14
2.1.2. Techniques des marqueurs épidémiologiques de <i>C. difficile</i>	15
2.1.3. Technique ELISA de détection de la toxine LT de <i>C. sordellii</i>	15
2.1.4. Techniques en développement.....	15
2.1.5. Liste des marqueurs épidémiologiques	16
2.1.6. Collection de souches, sérums de référence.....	16
2.2. Capacités techniques du Laboratoire associé <i>Clostridium difficile</i>	17
2.2.1. Techniques et marqueurs disponibles	17
2.2.2. Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts	17
2.2.3. Techniques en développement.....	18
2.2.4. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses	18
2.2.5. Collection de souches	22
2.3. Activités d'expertise en bactériologie anaérobie 2012 (CNR).....	22
2.3.1. Souches d'origine humaine	22
2.3.2. Souches d'origine vétérinaire	24
2.3.3. Souches d'origine "industrielle"	25
2.4. Activités d'expertise sur <i>C. difficile</i> (Laboratoire associé)	25
2.5. Activités d'expertise sur la toxine botulique	26
2.5.1. Développement d'un test de détection de la toxine botulique A par un test endoprotéase avec révélation par spectrométrie de masse (collaboration avec le CEA)	26
2.5.2. Développement d'un test de détection de la toxine botulique A par un test endoprotéase avec révélation par ELISA (collaboration avec C Leveque, CNRS Marseille)	27
2.5.3. Développement d'un test de détection de la toxine botulique B par un test endoprotéase avec révélation par Biacore ou ELISA	27
2.5.4. Caractérisation des souches de <i>C. botulinum</i> par génotypage, séquençage du gène de la neurotoxine botulique et étude MLST.....	28
2.5.5. Caractérisation des souches de <i>C. botulinum</i> au moyen d'une puce ADN Illumina (Publication dans PlosOne en cours).....	28
2.5.6. Détection de <i>C. botulinum</i> A, B, E, F, C, C/D, D/C et D en PCR temps réel.....	29
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	30
3.1. Surveillance des infections à <i>C. difficile</i>	30
3.1.1. Réseau de partenaires	30
3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées.....	30
3.1.3. Analyse de la distribution des souches de <i>C. difficile</i> en fonction des critères pertinents et analyse des tendances	32
3.1.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (<i>échanges de données, périodicité, analyse commune</i>).....	36
3.2. Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux	36
3.2.1. Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR).....	36
3.2.2. Surveillance de <i>C. difficile</i> aux anti-infectieux (Laboratoire associé)	39

3.3.	Surveillance du botulisme	40
3.3.1.	Botulisme humain.....	40
3.3.2.	Botulisme agro-alimentaire et environnemental.....	44
3.3.3.	Botulisme animal.....	45
3.4.	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	47
3.5.	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens	47
3.6.	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	48
4.	ALERTES	50
5.	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, ET DE CONSEIL	51
5.1.	Enseignements	51
5.2.	Stagiaires	52
5.3.	Diffusion aux professionnels de santé	52
5.4.	Activités de conseil.....	53
5.5.	Activité d'expertises.	54
6.	ACTIVITES DE RECHERCHE	56
6.1.	Activités de recherche en relation avec le CNR bactéries anaérobies et botulisme	56
6.2.	Activités de recherche du laboratoire associé	56
6.3.	Activités de recherche de l'unité bactéries anaérobies et toxines.....	58
7.	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	61
7.1.	CNR et Unité des Bactéries anaérobies et Toxines	61
7.1.1.	Publications dans des revues nationales	61
7.1.2.	Publications dans des revues internationales à comité de lecture	61
7.1.3.	Chapitres de livre.....	62
7.1.4.	Congrès, workshops.....	62
7.1.5.	Séminaire	62
7.2.	Publications du Laboratoire associé	63
7.2.1.	Publications dans des revues de langue française	63
7.2.2.	Publications dans des revues internationales	63
7.2.3.	Communications nationales.....	64
7.2.4.	Communications internationales.....	64
7.2.5.	Conférences sur invitation	66
7.2.6.	Autre.....	66
8.	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2012-2013	67
8.1.	programme du CNR	67
8.1.1.	Identification des souches de bactéries anaérobies	67
8.1.2.	Diagnostic du botulisme	67
8.1.3.	Activités de Recherche en relation avec le CNR	67
8.2.	Programme du Laboratoire associé	68
9.	ANNEXES	71

1. INTRODUCTION

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 et 2011. Il faut noter que le renouvellement du CNR s'est accompagné de la suppression d'un poste de technicien et de la réduction de la participation d'un scientifique.

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), 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 l'InVS des affections graves à anaérobies notamment à *C. difficile*) et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec l'InVS.

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 l'InVS comme laboratoire associé au CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridium difficile*. Il a été reconduit dans ses fonctions en 2011.

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 à cette bactérie. Il travaille en collaboration avec un réseau national de 5 laboratoires experts (laboratoires experts de Rouen, Nice, Toulouse, Montpellier et Nancy) pour la caractérisation des souches. 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 l'InVS qui en assure la diffusion.

Le CNR des Bactéries anaérobies conduit des thèmes de recherche en relation avec ses activités d'expertise, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *C. difficile*.

L'Unité d'Expertises et de Recherche des Bactéries anaérobies et Toxines (BAT), à laquelle est rattaché le CNRAB, a été évaluée et reconduite en 2006 ainsi qu'en 2010 (évaluation AERES niveau A). Cette unité est constituée de deux chefs de laboratoire, d'une technicienne et de stagiaires de thèse et postdoc, et elle englobe le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme. Elle a pour principaux thèmes de recherche : *Clostridium botulinum* (régulation de la toxinogenèse et passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale) et les toxines de *Clostridium* modifiant le cytosquelette d'actine ou formant des pores à travers la membrane. Elle bénéficie de crédits du ministère de la Défense (DGA), du ministère de la Recherche, d'un contrat européen et de contrats industriels.

L'Unité BAT et le CNRAB ont fait l'objet d'un contrôle de l'ANSM (ex AFSSAPS) à propos de la détention, cession, acquisition, et manipulation de microorganismes pathogènes et toxines (MOT) en juin 2008 et mars 2013.

1.1. Résumé des activités 2012

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

En 2012, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 149 échantillons de sérum, 55 selles, 55 échantillons alimentaires dont 20 en lien avec un foyer de botulisme et 4 de l'environnement. Un total de 7 foyers (plus un suspect) de botulisme regroupant 9 cas (plus un suspect) ont été identifiés. L'ensemble des patients a été hospitalisé dont la plupart en service de réanimation. Comme en 2011 et contrairement aux années précédentes, le botulisme de type A a été le plus fréquemment identifié (4 foyers, 5 cas), alors que le type B représentait 3 foyers (4 cas), et dans un autre foyer (1 cas) le botulisme a été suspecté cliniquement mais non confirmé. La forme la plus fréquente était le botulisme d'origine alimentaire par intoxication (7 foyers sur 8). Dans un autre cas, il s'agissait de botulisme infantile. **Il faut noter que, bien que rare, le botulisme infantile est plus régulièrement signalé au cours de ces dernières années.** L'origine du botulisme a été retrouvée dans 4 foyers: jambon de préparation familiale (2 foyers), conserve familiale d'aubergine préparée au Maroc (1 foyer), et dans un autre foyer préparation industrielle de pâté d'origine bulgare. Par ailleurs, l'analyse d'échantillons de patients suspects cliniquement de botulisme a permis de réorienter le diagnostic vers une intoxication à l'atropine (7 cas) ou autre neuropathie comme le Guillain Barré (20 cas).

Le CNR a également pratiqué la recherche d'anticorps neutralisants chez 25 patients traités à la toxine botulique. Des anticorps neutralisants ont été détectés chez 7 d'entre eux.

Le botulisme animal fait l'objet d'identification ou de typage en complément de premières analyses réalisées par les laboratoires vétérinaires. En 2012, 145 échantillons d'origine vétérinaire et 204 d'origine alimentaire ont été analysés. Le botulisme de type mosaïque C/D sévit notamment dans les élevages de volailles et le type D/C dans les élevages de bovins. Les types D ou C sont retrouvés avec une moindre fréquence. **Le botulisme reste une situation préoccupante en élevage bovin et volaille avec de nombreux foyers chaque année et un risque de santé publique.**

La surveillance des infections à *C. difficile* a continué au cours de l'année 2012 grâce à l'appui du Laboratoire associé et de son réseau de 5 autres laboratoires hospitaliers experts ainsi que du CNR. Plusieurs changements au niveau des personnels sont toutefois à signaler :

- pour le laboratoire associé :
 - changement de technicienne en octobre 2012
 - départ à la retraite de l'ingénieur d'étude (non remplacée) en octobre 2012
- pour les laboratoires experts :
 - départ à la retraite du Dr Mory remplacée par le Dr Tronel (Nancy)
 - départ du Dr Girard-Pipau, remplacé par le Pr Ruimy ; le Dr Landraud reprend l'activité du laboratoire expert (Nice).

La surveillance des affections nosocomiales à *C. difficile* est assurée par le laboratoire associé et le CNR, avec l'appui de 5 laboratoires hospitaliers experts (réseau *Clostridium difficile*). Au cours de l'année 2012, 464 prélèvements ont été reçus par les différents laboratoires experts. Parmi ces 464 prélèvements, 420 correspondaient à des souches de *C. difficile* toxigènes ; 91 (21,7%) ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les 3 principaux PCR-ribotype identifiés étaient le 027 (21,7%), le 014/020/077 (13,1%) et le 078/126 (12,9%). Le toxinotypage a permis d'identifier 2 souches de toxinotypes rares : les toxinotypes XIa et XIb. Ces toxinotypes rares ont pour particularité de

ne produire que la toxine binaire, les toxines A et B ne sont pas produites. Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine et au métronidazole.

En 2012, 195 souches ont été étudiées [dont les origines sont : humaine (155 souches), alimentaire (11), vétérinaire (24), et autres (collections... : 5)]. Les 155 souches de bactéries anaérobies d'origine humaine identifiées se répartissaient en 23 genres différents et 44 espèces. Le séquençage du gène ADNr16S (69 séquences effectuées en 2012) a permis de confirmer sans ambiguïté l'identification de plusieurs bactéries rares trouvées responsables d'infections chez l'homme appartenant aux genres *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Catabacter*, *Clostridium*, *Oscillibacter*, ou à la famille *Lachnospiraceae* avec plusieurs nouveaux genres/espèces potentiels. Cinq décès consécutifs à des infections sévères à *Clostridium perfringens* souvent à point de départ intestinal ont été enregistrés (dont 3 survenus quelques heures après admission aux urgences à la suite d'une hémolyse intra-vasculaire massive). Une infection à *Clostridium tetani* toxigène sans symptomatologie de tétanos a été confirmée chez un patient (souche isolée d'une tuméfaction cervicale chez un patient de 75 ans). 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.

Des travaux d'expertises ont porté sur le développement de nouvelles méthodes d'identification et de titrage des toxines botuliques, et caractérisation des souches de *C. difficile* portant une délétion dans le gène *tcdC*.

Les travaux de recherche de l'Unité associé au CNR ont porté sur les toxines botuliques (passage à travers la barrière intestinale), les toxines de *Clostridium* formant des pores (toxine epsilon de *C. perfringens*) et les toxines de grande taille de *C. sordellii* et *C. difficile*.

1.2. Equipes

CNR Bactéries anaérobies et botulisme

➤ Effectif par catégories de fonctions en 2012

- Effectif actuel de la structure de Recherche et du CNR

	Scientifiques / Biologistes	Ingénieur	Technicien(ne)s	Agent Technique	Administratif
Nombre de postes	3	1	3	1,25	0,75

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

Fonctions		ETP réels	ETP financés par l'InVS
Scientifiques / biologistes	Chef de laboratoire, Institut Pasteur (IP)	0,2	0,2
	Chargé de Recherche IP	0,8	0,4
Ingénieur de Recherche IP		0,5	0,5
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP		2	2
Secrétaire de Direction IP		0,5	0,25
Agent technique		1	1

L'équipe de recherche comporte en plus du personnel mentionné une étudiante en thèse et deux stagiaires post-doctoraux.

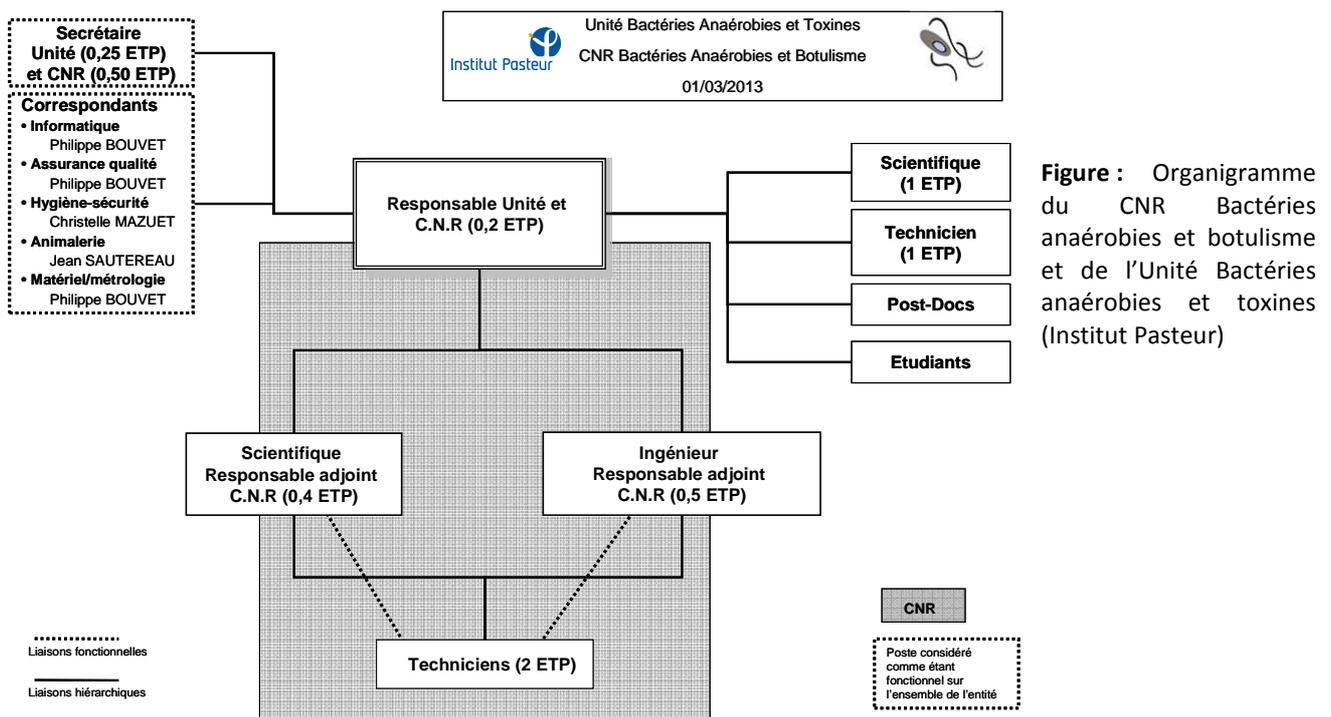


Figure : Organigramme du CNR Bactéries anaérobies et botulisme et de l'Unité Bactéries anaérobies et toxines (Institut Pasteur)

Laboratoire associé *Clostridium difficile***Laboratoire associé *Clostridium difficile*****Nord - Pas de Calais, Picardie, Ile de France, Centre**

Dr Frédéric Barbut +33 1 49 28 30 11 ou frederic.barbut@sat.ap-hop-paris.fr
Dr Catherine Eckert +33 1 40 01 14 63 (/13 88) ou catherine.eckert@sat.aphp.fr

Laboratoire de Bactériologie
 Faculté de médecine Saint Antoine
 27, rue de Chaligny,
 75012 Paris

Adresse d'envoi des souches : Laboratoire de Bactériologie
 Hôpital Saint-Antoine
 184, rue du faubourg Saint-Antoine
 75012 Paris, France

Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	Praticien Hospitalier	0,5	AP-HP
C. Eckert	Praticien Attachée	1	InVS
V. Lalande	Praticien Hospitalier	0,2	AP-HP
C. Rambaud puis A. Petit	Technicienne	1	InVS
B. Burghoffer	Ingénieur d'études	0,5	Université Pierre et Marie Curie
Réception/secrétariat/gestion		0,2	AP-HP

Personnel médical : 3 (ETP global : 1,7)

Personnel non médical : 3 (ETP global : 1,7)

Laboratoires experts**Haute-Normandie, Basse-Normandie, Bretagne, Pays de Loire**

Dr Ludovic Lemée +33 2 32 88 80 52 ou ludovic.lemee@chu-rouen.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 2 32 88 80 52)
 Rez de Chaussée Pavillon Derocque
 CHU Ch. Nicolle
 76031 Rouen Cedex

Alsace, Lorraine, Champagne-Ardenne, Bourgogne, Franche Comté

Dr Francine Mory/Dr Hubert Tronel +33 3 83 85 14 34 ou f.mory@chu-nancy.fr / h.tronel@chu-nancy.fr
Pr Alain Lozniewski +33 3 83 85 18 14 ou a.lozniewski@chu-nancy.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 3 83 85 12 03)
 Hôpital Central
 29 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny CO 60034
 54035 Nancy Cedex

Languedoc-Roussillon, Auvergne, Corse, Réunion

Pr Hélène Marchandin + 33 4 67 33 59 00 ou h-marchandin@chu-montpellier.fr
Dr Hélène Jean-Pierre + 33 4 67 33 65 94 ou h-jean_pierre@chu-montpellier.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 4 67 33 58 84)
 Hôpital Arnaud de Villeneuve
 371, Avenue du Doyen Gaston Giraud
 34295 Montpellier Cedex 5

Aquitaine, Limousin, Midi-Pyrénées, Poitou-Charente, Guadeloupe, Martinique

Pr Nicole Marty +33 5 67 69 04 07 ou marty.n@chu-toulouse.fr
Dr Laurent Cavalie +33 5 67 69 03 93 ou cavalie.l@chu-toulouse.fr

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
 CHU de Toulouse
 Institut Fédératif de Biologie
 330, avenue de Grande-Bretagne
 31059 Toulouse Cédex 9 TSA 40031

Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes

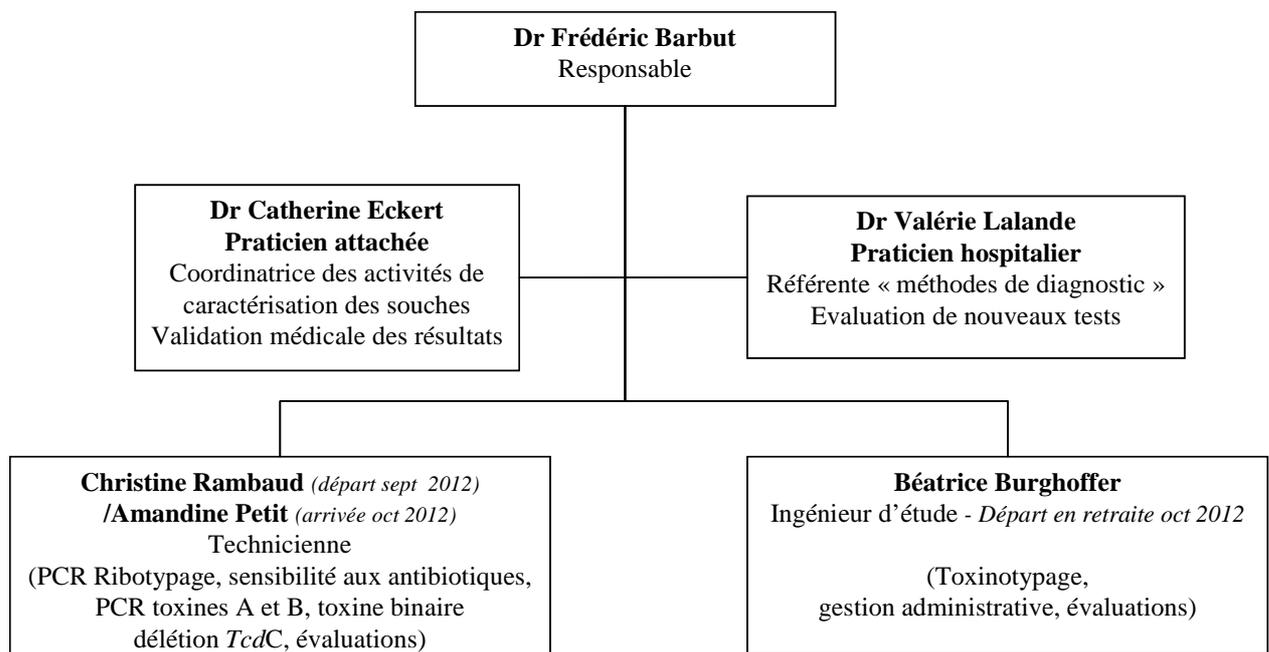
Pr Ruimy ruimy.r@chu-nice.fr
Dr Fernand Girard-Pipau/Dr Luce Landraud +33 4 92 03 62 20 ou landraud.l@chu-nice.fr

Laboratoire de Bactériologie (+33 4 92 03 62 14)
 Hôpital de l'Archet
 151 route de Saint Antoine de Ginestière BP 3079
 06202 Nice cedex 3

PARIS CNR Bactéries anaérobies et botulisme Coordination

Dr Michel R Popoff +33 1 45 68 83 07 ou michel-robert.popoff@pasteur.fr
Dr Philippe Bouvet +33 1 40 61 35 09 ou philippe.bouvet@pasteur.fr

CNR Bactéries anaérobies et botulisme Institut Pasteur Unité Bactéries Anaérobies et Toxines
 25/28 rue du Docteur Roux
 75724 paris cedex 15
 (+33 1 44 38 91 22 ou +33 1 45 68 83 10)

Organigramme

1.3. Démarche qualité

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme

Depuis 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont initié une démarche qualité suivant le référentiel GBEA. Par ailleurs, de 2008 à aujourd'hui, en réponse aux inspections ANSM relatives à la conformité aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux micro-organismes et toxines, une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des CNR, a été réalisée.

L'ensemble des modes opératoires et des procédures utilisés par le CNR est sous Assurance Qualité, ainsi que la gestion des réactifs, la gestion documentaire et le matériel. Les démarches "Qualité" concernant la métrologie (contrôle des températures des chambres chaudes et froides, congélateurs, réfrigérateurs et bain marie, ainsi que le contrôle de volume des pipettes automatiques) ont également été mises en place.

Le CNR s'est engagé dans une démarche d'accréditation (ISO 15189). Pour satisfaire à cet objectif d'accréditation, plusieurs services supports de l'Institut Pasteur (pôle Equipement, RH, logistique, QSE, Prévention des risques,...) ont mis en place des dispositions qualité permettant de répondre aux exigences des référentiels qualité (ISO 9001, ISO 17025, ISO 15189,...) appliqué à l'Institut Pasteur.

Le responsable du CNR Bactéries anaérobies et Botulisme dispose d'une autorisation de l'AFSSAPS pour l'acquisition, la détention et la mise en oeuvre des MOT (microorganismes et toxines) réglementés incluant *C. botulinum* et autres *Clostridium* neurotoxigènes. Une inspection de notre laboratoire par l'AFSSAPS a eu lieu en juillet 2008, puis de l'ANSM en mars 2013.

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Les modes opératoires et les procédures utilisés par le laboratoire associé et les laboratoires experts ont été rédigés et validés.

Un contrôle de qualité a été réalisé au début de l'année 2013 (envoi d'une souche de PCR-ribotype défini (souche de PCR-ribotype 027) à l'ensemble des 6 laboratoires experts.

↳ Résultats en cours

Un contrôle de qualité a été réalisé en 2012 en collaboration avec le Centre National de référence en Belgique (Pr. Michel Delmée). Le Panel était constitué de 2 souches A et B choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridium difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La souche C provenait de la collection du CNR (France ou Belgique) et correspondait à un ribotype appartenant aux 23 souches de référence de *Clostridium difficile*.

↳ Trois souches A, B et C envoyées par la Belgique ont été correctement identifiées par le laboratoire associé.

↳ Deux des 3 souches du laboratoire associé envoyées en Belgique ont été correctement identifiées (souches A et C). La souche B n'a pas été correctement identifiée. Après vérification et reprise de la souche B envoyée en Belgique par les 2 laboratoires, il a été conclu qu'une erreur s'était produite lors de l'envoi des souches de référence par Ed Kuijper

aux différents centres. La souche B (souche de PCR-ribotype 046) doit être exclue des 23 souches de référence en attendant l'envoi par Ed Kuijper d'une nouvelle souche de référence 046.

1.4. Locaux et équipements

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme

Le CNR Bactéries anaérobies et Botulisme a emménagé dans ses nouveaux locaux situés au rez-de-chaussée du bâtiment Guérin en avril 2008. L'unité BAT est située au 1^{er} étage du même bâtiment.

Locaux du CNR (rez-de-chaussée)

Les locaux hébergeant le CNR Anaérobies et botulisme comprennent: - 2 espaces bureaux de 7,5m² chacun, pour les responsables et les techniciens,

- un laboratoire P2 de 19m² qui héberge les 2 techniciens du CNR et éventuellement un stagiaire. Le laboratoire contient un PSM de type II
- une pièce "matériel" de 11m² renfermant 2 appareils de chromatographies 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.

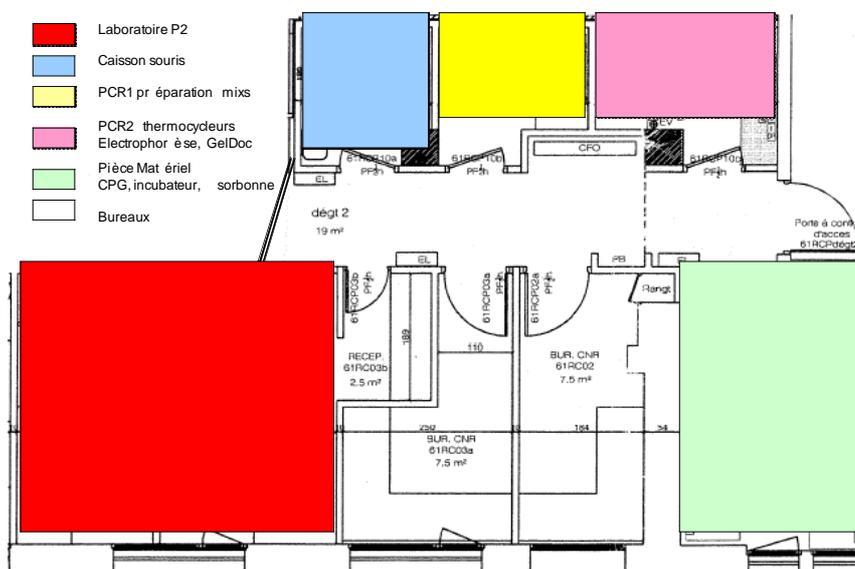


Figure : plan des locaux du CNR (rez-de-chaussée) du bâtiment Guérin, Institut Pasteur)

Locaux de l'unité BAT

Rez-de-chaussée

Une pièce (17m²) réservée à la préparation et au stockage des toxines.

1er étage

- Un laboratoire de 55m² pour la recherche comportant PSM de type II, sorbonne et armoire solvant ventilée, thermocycleurs, PCR temps réel, cuves à électrophorèse, appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec le mélange gazeux pour l'anaérobiose.
- Une pièce matériel de 11,5m² renfermant congélateurs à -80°C, centrifugeuses, incubateur.
- Une chambre froide de 9m²
- Un laboratoire P2+ (16m²) pour les cultures cellulaires partagée avec d'autres équipes
- Deux pièces de bureaux de 15m² chacune pour le responsable de l'unité et les personnels de l'unité.
- Un bureau pour le secrétariat partagé avec une autre unité.

MATERIEL, EQUIPEMENT DE LA STRUCTURE :

Equipements de base pour la bactériologie anaérobie comprenant entre autres :

- équipements 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).
- chromatographes en phase gazeuse pour l'identification des métabolites et des acides gras cellulaires des bactéries anaérobies.
- containers d'azote liquide et congélation -80°C pour la conservation des souches de référence et des isolats.

Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

- appareils d'amplification génique : PCR standard (2 appareils) et PCR-temps réel (2 appareils). Hottes à PCR
- cuves d'électrophorèse et générateurs
- Lecteur analyseur d'image (GelDoc 2000, BioRad).
- séquençage et clonage d'ADN.
- hybridation ADN/ADN.
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech) (acquis en 2008).

Equipement de culture cellulaire :

- hotte à flux laminaire, incubateur à CO₂, microscope à objectif inversé pour les cultures cellulaires et les essais de cytotoxicité des toxines. microscope à fluorescence.

Equipement de biochimie :

- équipement de chromatographie en phase liquide (chromatographie à basse pression et FPLC) pour la purification des toxines et protéines recombinantes.

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

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

- animalerie souris en vue des tests de toxicité, notamment détection et identification des toxines botuliques.

- animalerie lapins pour la production d'anticorps spécifiques anti-toxines.

Plateformes techniques du campus de l'Institut Pasteur dont nous sommes utilisateurs

Séquenceur automatique d'ADN, microséquençage de protéines, microscopie électronique et confocale, cytométrie de flux, PF8, PF5.

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Locaux

Le plan du service est représenté sur la figure 1.

Localisation : Service de Bactériologie 10^{ème} étage

Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, UPMC, Paris VI

Site Saint-Antoine 27, rue Chaligny 75571 Paris Cedex 12.

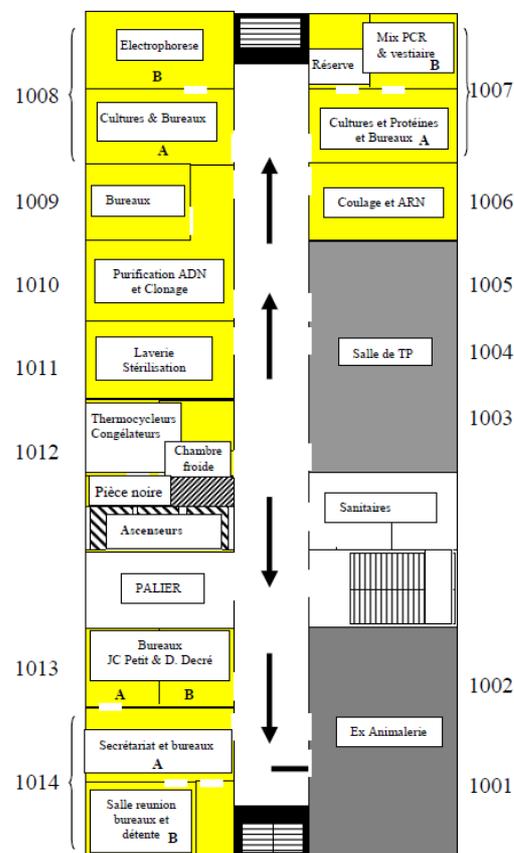


Figure 1 : plan des locaux (en jaune : pièces Bactériologie; en gris : pièces autres).

Equipements

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

- Electrophorèse : 4 cuves (Biorad)- 2 cuves (Mupid)
- Electrophorèse en champ pulsé (Gene Path, Biorad)
- Lecteur analyseur d'image (Biorad)
- 2 étuves à 37°C (Jouan)
- 1 microscope
- 1 centrifugeuse (Jouan)
- 1 micro centrifugeuse (Biofuge)
- 1 hotte à PCR
- 2 blocs chauffants
- 2 thermocyclers 9700 (Applied)
- 1 thermocycleur 2720 (Applied)
- 1 AB Prism (PCR temps réel) (Applied)
- 1 polaroid, 1 table UV
- 2 congélateurs à -80°C (Froilabo, Jouan)
- 2 réfrigérateurs-congélateurs
- 1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)
- 1 bain-marie

2. ACTIVITES D'EXPERTISES

2.1. CAPACITÉS TECHNIQUES DU CNR

Liste des techniques de référence

2.1.1. Techniques disponibles

- Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturaux et morphologiques, tests de pré identification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques), analyse des produits du métabolisme et des acides gras cellulaires par chromatographie phase gazeuse.
- Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR classique. Ces techniques ont été développées au CNR sur la base de gènes de toxines caractérisées dans notre Unité ou sur des gènes publiés.
- Identification des gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C par PCR temps réel ainsi que du gène prolyl aminopeptidase permettant de distinguer les souches protéolytiques des souches non protéolytiques.
- Mise en évidence de cytotoxine à l'aide de culture cellulaire de différents types.
- Amplification des gènes codant les ADN ribosomiaux 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)

2.1.2. Techniques des marqueurs épidémiologiques de *C. difficile*

1. Technique de PCR-ribotypage qui est actuellement la technique principale permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de différencier les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés.
2. Mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : un protocole d'amplification par PCR d'un fragment de 300 paires de bases (pb) interne au gène *tcdC* (150 bases de part et d'autre de la zone où les différentes délétions surviennent) a été élaboré au CNR et retenu par le réseau de laboratoires experts. Cette technique permet par amplification puis séparation sur un gel haute résolution en s'entourant de témoins, de différencier aisément les différents types de délétion du gène *tcdC* existants : 18 pb et 39pb déjà décrits dans la littérature ainsi qu'une nouvelle délétion de 54pb non encore décrite et identifiée au CNR. Des études récemment publiées ayant identifié d'autres délétions (délétion ponctuelle à la position 117, délétion de 36bp...), le CNR confronté à une délétion du gène détermine systématiquement la séquence du gène *tcdC* en entier.
3. Amplification par PCR de l'opéron codant pour la toxine binaire CDT permettant la mise en évidence d'opérons tronqués et de nouveaux variants.
4. Détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine, vancomycine, tétracycline).
5. Détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire, amplification des fragments A3 (gène *tcdA*), et B1 (gène *tcdB*) puis restriction par différentes enzymes pour détermination du toxinotype.

2.1.3. 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.

2.1.4. Techniques en développement

Techniques de titrage de la toxine botulique, voir chapitre "activités d'expertises".

Développement d'une puce ADN pour le génotypage des souches de *C. botulinum* (voir activités d'expertises, génotypage de *C. botulinum*).

Séquençage des génomes complets des souches isolées au CNR, notamment des souches de *Clostridium botulinum*, par la technique NGS (Illumina).

Développement de tests *in vitro* de dosage d'activités enzymatiques des toxines botuliques de type A, B et E.(format ELISA).

2.1.5. Liste des marqueurs épidémiologiques

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

- 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, théta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine théta 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 ; β -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 »

2.1.6. Collection de souches, sérums de référence

- Collection de souches de bactéries anaérobies, comprenant les souches types pour chaque espèce. Ces souches sont conservées en azote liquide. Les souches types ainsi que les souches d'intérêt médical sont déposées à la Collection de l'Institut Pasteur. 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*

2.2. CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE ASSOCIE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

2.2.1. Techniques et marqueurs disponibles

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
- 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
- l'amplification de l'ARN 16S et l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) 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*)
- l'identification des souches par spectrométrie de masse Maldi-TOF (Bruker)

2.2.2. Liste des techniques recommandées pour les laboratoires experts

Un recueil de protocoles standardisés pour la caractérisation des souches de *C. difficile* a été rédigé par le CNR en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Saint-Antoine (UHLIN, Frédéric Barbut) et adressé à tous les laboratoires experts.

Un nombre minimum de techniques utilisées par tous les laboratoires experts a été défini pour caractériser les souches de *C. difficile* :

- la détection des fragments A3 et B1 des toxines TcdA et TcdB

- la PCR ribotypage pour identifier la souche 027 (Oui/Non) ainsi que des PCR-ribotypes fréquents en France (001, 002, 005, 014/020/077, 015, 017, 053, 078/126 et 106); le caractère clonal ou non peut également être précisé
- l'antibiogramme (érythromycine, clindamycine, moxifloxacine, métronidazole, vancomycine, tétracycline)

Une page web est disponible sur le site du CNR pour informer les centres de santé (hôpitaux, laboratoires...) des modalités de fonctionnement de ce réseau et des procédures à suivre lors d'une infection à *C. difficile* (paragraphe collaborations et réseaux) (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-bacteries-anaerobies-et-du-botulisme/activites-de-service>).

2.2.3. Techniques en développement

La technique de PCR-ribotypage actuellement utilisée au laboratoire est une méthode longue et délicate qui nécessite une interprétation visuelle des profils obtenus après migration sur gel résophor. L'identification des PCR-ribotypes peut parfois s'avérer complexe et nécessite de déposer les souches à identifier à côté de souches de référence sur un même gel. Pour standardiser cette technique; l'évaluation et la mise en place d'une technique d'**électrophorèse capillaire** (EXPERION V3.1, BioRad) permettant la séparation des amplicons obtenus par PCR-ribotypage est en cours d'évaluation pour améliorer à terme l'identification des PCR-ribotypes. Cette méthode permettra également de s'affranchir du BET.

2.2.4. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2012, plusieurs trousse diagnostiques ont été évaluées :

- Le **VIDAS *C. difficile* GDH** (bioMérieux), test permettant la détection de la glutamate déshydrogénase de *C. difficile* a été évalué sur les selles.
- Le test **VIDAS *C. difficile* toxin A&B** (bioMérieux) a été évalué sur des colonies de *C. difficile*.
 - Un algorithme en 3 temps basé sur la détection de la GDH et des toxines de *C. difficile* dans les selles (**VIDAS *C. difficile* GDH** et **VIDAS *C. difficile* toxin A&B** (bioMérieux)) et la culture sur milieu **chromID *C. difficile* agar** (bioMérieux) a été évalué.
 - Un nouveau test de PCR en temps-réel (**FOCUS Simplexa® *C difficile* Universal Direct**, FOCUS diagnostics, Eurobio) utilisant des sondes amorces fluorescentes bidirectionnelles ayant pour cible une séquence conservée du gène de la toxine B (*tcdB*) a été testé pour le diagnostic des infections à *C. difficile*.
 - Le test moléculaire **GenoType CDiff** (Hain Lifescience) permettant la détection simultanée des gènes des toxines A et B, de la toxine binaire, la détection de différentes délétions dans le gène *tcdC* (-18pb, -39pb, délétion ponctuelle en 117), la détection de la résistance aux fluoroquinolones ainsi que la détection de gènes spécifiques de *C. difficile* a été évalué.
 - Le test moléculaire **AmpliVue** (QUIDEL Molecular), test permettant la détection du gène de la toxine A dans les selles avec une détection immunochromatographique, est actuellement en cours d'évaluation.

1. Evaluation des performances du Vidas® *C. difficile* GDH et du C. diff Quik Chek Complete® en comparaison avec la culture de *Clostridium difficile*

C. Eckert, O. Said, N. Poccardi, C. Rambaud, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut

(RICAI 2012 P399; ECCMID 2013 accepté)

Objectif: L'utilisation d'algorithmes en 2 ou 3 étapes, basés sur la détection de la glutamate deshydrogénase (GDH) en première intention, est maintenant préconisée par les recommandations américaines et européennes pour le diagnostic d'infection à *Clostridium difficile* (ICD). La GDH est une enzyme produite par les souches de *C. difficile*. La détection de cette enzyme dans les selles permet de renseigner sur la présence de la bactérie. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du Vidas® *C. difficile* GDH (bioMérieux) et de la composante GDH du test C. diff Quik Chek Complete® (Alère) en comparaison avec la culture sur milieu sélectif.

Méthodes : L'étude a porté sur 408 selles diarrhéiques de patients suspects d'ICD hospitalisés dans les hôpitaux universitaires de l'est parisien. La culture a été réalisée par ensemencement des selles fraîches sur milieu TCCA (taurocholate, cyclosérine, céfoxitine). En parallèle, les tests Vidas® *C. difficile* GDH et C. diff Quik Chek Complete® étaient réalisés selon les recommandations des fabricants. Pour ce dernier, un deuxième test était réalisé en cas de résultat invalide ou équivoque.

Résultats : La prévalence des cultures positives pour *C. difficile* sur TCCA était de 13% (77,4% des souches étaient toxigènes et 22,6% non toxigènes). Comparées à la culture, la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et prédictives négatives du Vidas® *C. difficile* GDH et de la composante GDH du test C. diff Quik Chek Complete® étaient respectivement de 96,2%, 97,7%, 86,4% et 99,4% et de 92,5%, 98,9%, 92,5% et 98,9%. Cinq résultats (1,2%) étaient invalides ou équivoques en première détermination pour le test C. diff Quik Chek Complete®.

Conclusion : Le test Vidas® *C. difficile* GDH et la composante GDH du test C. diff Quik Chek Complete® présentent une excellente valeur prédictive négative et peuvent être utilisés comme test de screening des ICD. De plus, le test Vidas® *C. difficile* GDH présente l'avantage d'être automatisé, éliminant toute ambiguïté de lecture et d'interprétation des résultats et permettant la traçabilité des résultats.

2. Evaluation du VIDAS® *Clostridium difficile* Toxin A&B sur colonies

C. Eckert, P. Schaaf, C. Ménard, C. Elias, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut

(ICDS 2012, P100)

Objectif: La culture toxigénique (CT) est toujours considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic des infections à *C. difficile* (ICD). Cette méthode consiste à isoler une souche de *C. difficile* sur un milieu sélectif puis à déterminer *in vitro* la production de toxines. Cependant l'utilisation des tests immune-enzymatiques pour déterminer le pouvoir toxigène d'une souche à partir des colonies n'est pas toujours validé par les fabricants. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du test VIDAS *Clostridium difficile* Toxin A&B (bioMérieux) (VIDAS) directement à partir des colonies isolées sur milieu chromID® *C. difficile* (bioMérieux) (chromID).

Méthodes: Lors d'une précédente étude de comparaison de milieux, 36 souches de *C. difficile* avaient été isolées sur 2 des milieux testés: chromID *C. difficile* incubé en anaérobiose pendant 24 heures (chromID) et TCCA incubé en anaérobiose pendant 48 heures. La détermination *in vitro* de la cytotoxicité des souches avait été réalisée en inoculant 2 à 5 colonies isolées sur TCCA dans du BHI et incubé 5 jours en anaérobiose à 37°C. Le surnageant de culture a ensuite été filtré et inoculé sur des cellules MRC5 en culture (CT). En parallèle le test VIDAS *Clostridium difficile* Toxin A&B a été réalisé sur colonies isolées sur milieu chromID (culture primaire ou après subculture pour obtenir suffisamment de colonies). Les colonies étaient homogénéisées dans de l'eau pour atteindre un McFarland 3. Le test VIDAS était ensuite réalisé selon les recommandations du fabricant. Ce test était répété lorsque le résultat obtenu était discordant (CT positive et VIDAS négatif ou TC négatif et VIDAS positif) ou équivoque.

Résultats: Parmi les 36 souches étudiées, 27 (75%) étaient positives et 9 (25%) négatives en CT. Le premier test VIDAS a été réalisé à partir de colonies isolées en primoculture sur milieu chromID dans 29 cas (80.6%) et après subculture dans 7 cas (19.4%). La sensibilité et la spécificité pour le test VIDAS réalisé sur colonies isolées sur milieu chromID (1 résultat équivoque) étaient respectivement de 70.4% [49.7-85.5] et 87.5% [46.7-99.3], comparativement à la CT. Après ré-analyse des discordants, la sensibilité et la spécificité pour le test VIDAS réalisé sur colonies isolées sur milieu chromID (4 résultats équivoques) étaient respectivement de 83.3% [61.8-94.5] et 100% [59.8-100], comparativement à la CT.

Conclusion: VIDAS *Clostridium difficile* Toxin A&B réalisé à partir de colonies isolées sur milieu chromID *C. difficile* agar (24h) est un test rapide lorsqu'il y a suffisamment de colonies sur le milieu. Cependant un résultat négatif doit être confirmé par un test de référence.

3. Comparaison d'un algorithme en 3 temps basé sur les tests VIDAS® *C. difficile* (GDH et CDAB) et la culture sur milieu chromID *C. difficile* avec le test Quik Chek Complete pour le diagnostic d'une infection à *Clostridium difficile*

A. Banz, C. Eckert, O. Said, N. Pocard, C. Rambaud, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut, A. Foussadier

(ECCMID 2013, accepté)

Objectif: L'utilisation d'un algorithme en 2 ou 3 temps pour le diagnostic d'une infection à *C. difficile* (ICD) est maintenant largement recommandée. L'objectif de cette étude était de comparer les performances d'un algorithme en 3 temps basé sur l'utilisation du test *C. difficile* VIDAS® GDH (GDH) suivi du test VIDAS® toxin A & B (CDAB) et de la culture sur milieu chromID *C. difficile* (chromID) (bioMérieux) avec le test Quik Chek Complete (QCC) (Alere) pour le diagnostic d'une ICD. La culture toxigénique (CT) a été utilisée comme méthode de référence.

Méthodes: L'étude a porté sur 408 selles diarrhéiques de patients suspects d'ICD. La culture était réalisée sur milieu TCCA avec détermination du pouvoir toxigène des colonies isolées par le test de cytotoxicité (CT). En parallèle, l'«algorithme bioMérieux» était réalisé selon les recommandations du fabricant: le test GDH était réalisé sur toutes les selles. Un résultat négatif permettait d'exclure le diagnostic d'ICD. Un résultat positif nécessitait de réaliser le test CDAB. Si ce dernier était négatif, la selle était ensemencée sur milieu chromID (incubé 48h) afin de réaliser le test CDAB à partir des colonies. En parallèle le test QCC était réalisé

sur toutes les selles selon les recommandations du fabricant.

Résultats: La prévalence de souches toxigéniques était de 10% (41/408). La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives du QCC étaient respectivement de 39.0%, 100%, 100% et 93.6% comparativement à la CT. L'«algorithme bioMerieux» montrait de meilleures performances en termes de sensibilité et de valeur prédictive négative qui étaient respectivement de 68.6% et 97.1%.

Conclusion: L'utilisation d'un algorithme en 2 étapes GDH/Toxines sur les selles, suivi d'une étape de détection du pouvoir toxigène des souches isolées en culture avec le test VIDAS CDAB améliore le diagnostic des ICD.

4. Evaluation d'un nouveau test d'amplification FOCUS Simplexa® C difficile Universal Direct pour le diagnostic d'infection à *Clostridium difficile* (ICD).

V. Lalande, L. Barrault, C. Eckert, et F. Barbut

(RICAI 2012, Poster 402)

Objectif: *Clostridium difficile* est la principale cause de diarrhées nosocomiales. Un diagnostic fiable et rapide est indispensable pour une prise en charge optimale des patients infectés. Différents tests d'amplifications des gènes des toxines A et/ou B de *C. difficile* sont maintenant disponibles. Nous avons comparé un nouveau test de PCR avec deux méthodes de référence.

Matériel et Méthodes: Le test Simplexa® C difficile Universal Direct (SimplexaCDIFF) de FOCUS diagnostics, Eurobio, France est une méthode de PCR en temps-réel utilisant des sondes amorces fluorescente bidirectionnelles ayant pour cible une séquence conservée du gène de la toxine B (*tcdB*). L'extraction manuelle d'ADN à partir des selles est faite en tampon TE et par chauffage à $97 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes. Cette méthode a été comparée au test de cytotoxicité (CTA) et à la culture toxigénique (CT). Le CTA a été réalisé par inoculation d'un filtrat de selles sur cellules MRC-5 et la culture a été réalisée sur milieu TCCA (taurocholate, cyclosérine, céfoxitine agar). Le pouvoir toxigène de chaque isolat a été recherché directement à partir d'une suspension de colonies (=CT) par le test de cytotoxicité.

Résultats: L'étude a été réalisée sur 301 selles diarrhéiques (prenant la forme du pot) consécutives et non répétitives. Le CTA était positif pour 13 échantillons (4.3%) et la CT étaient positives dans 14,9% des cas (62,2% des souches étaient toxigènes et 37,8% non toxigènes). Pour quatre échantillons, le test SimplexaCDIFF était invalide après un premier test. En cas de discordance avec la CT, les échantillons étaient contrôlés soit par une culture enrichie, soit par un deuxième test d'amplification. Le test SimplexaCDIFF avant résolution des discordances a une sensibilité et une spécificité respectives de 100% et 96% par rapport au CTA et de 85% et 99% par rapport à la CT. Les VPN et VPP sont de 100% et 54% par rapport au CTA et de 98% et 95% par rapport à la CT.

Conclusion : Le test SimplexaCDIFF est un nouveau test d'amplification de *C. difficile* à partir des selles. Ces performances sont équivalentes aux tests d'amplification actuellement disponibles pour le diagnostic des ICD.

2.2.5. Collection de souches

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). Chaque souche est caractérisée par son toxinotype, 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).

2.3. ACTIVITES D'EXPERTISE EN BACTERIOLOGIE ANAEROBIE 2012 (CNR)

Nature et nombre des souches analysées

La répartition des souches reçues en 2012 était la suivante :

ORIGINE	NOMBRE
humaine	155
vétérinaire	24
Alimentaire	11
Autres (industrielle, collections...)	5
Total	195

2.3.1. Souches d'origine humaine

La répartition des souches d'origine humaine selon l'origine géographique par département est présentée au Tableau 1. Quarante-trois départements métropolitains ont envoyé 138 souches au CNR : 19 souches (14%) par les laboratoires d'Ile-de-France et 119 (86%) par les laboratoires des autres régions. Les départements ultra-marins envoient également des souches très régulièrement pour identification (17 souches).

La distribution des souches de bactéries anaérobies selon les sites d'infections est présentée au Tableau 2.

Depuis 2010, les sites de prélèvement des souches sont mieux renseignés par les laboratoires expéditeurs. En 2012, seules 2 souches sur les 155 reçues (1,3%) ne disposaient pas de cette donnée vs 2,5% en 2011, 10% en 2010 et 68% en 2009.

La majorité des souches pour lesquelles nous avons des renseignements cliniques provenait principalement de coprocultures (49%) suivies par les hémocultures (17%). Le reste des souches provenait de différentes localisations : infections intra-abdominales, infections hépatiques/pancréatiques, suppurations cutanées, musculaires ou osseuses, urologie....

Les 155 souches de bactéries anaérobies d'origine humaine identifiées se répartissaient en 23 genres différents et 44 espèces (Tableau 3). Le pourcentage de souches n'ayant pu être étudiées est également en diminution nette avec 10% des isolats en 2012 vs. 12,3% en 2011, 22% en 2009 et 19% en 2010. Ces chiffres en amélioration nette reflètent bien sûr les efforts effectués par les laboratoires mais également par le CNR qui met tout en oeuvre de tout tenter pour essayer de purifier la souche d'intérêt à partir du prélèvement contaminé. Malgré tout, l'étude de souches anaérobies présente toujours pour bon nombre de laboratoires une difficulté certaine (contaminations, problème de viabilité au cours du transport etc...).

Le genre *Clostridium* est de loin le plus représenté : 91/155 souches soit 58,7% parmi lesquels les 49 souches de *C. difficile* envoyées pour étude (identification, recherche des gènes de toxines, PCR-ribotypage). Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Bacteroides* / *Dialister* / *Odoribacter* / *Parabacteroides* / *Porphyromonas* / (10 souches), *Fusobacterium* (5 souches), bacilles Gram + non sporulés (*Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Oscillibacter*) (20 souches), et divers.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée dans le Tableau 4. Parmi les *Clostridium*, la plupart était des souches envoyées pour toxinotypage et caractérisation de la pathogénicité.

Cinq décès consécutifs à des infections sévères à *Clostridium perfringens* souvent à point de départ intestinal ont été enregistrés (dont 3 survenus quelques heures après admission aux urgences à la suite d'une hémolyse intra-vasculaire massive). Une infection à *Clostridium tetani* toxigène sans symptomatologie de tétanos a été confirmée chez un patient (souche isolée d'une tuméfaction cervicale chez un patient de 75 ans). *Fusobacterium necrophorum* (sous-espèce *funduliforme*) est souvent retrouvé responsable d'infections oro-pharyngées sévères pouvant disséminer (cinq cas dont une méningite). 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.

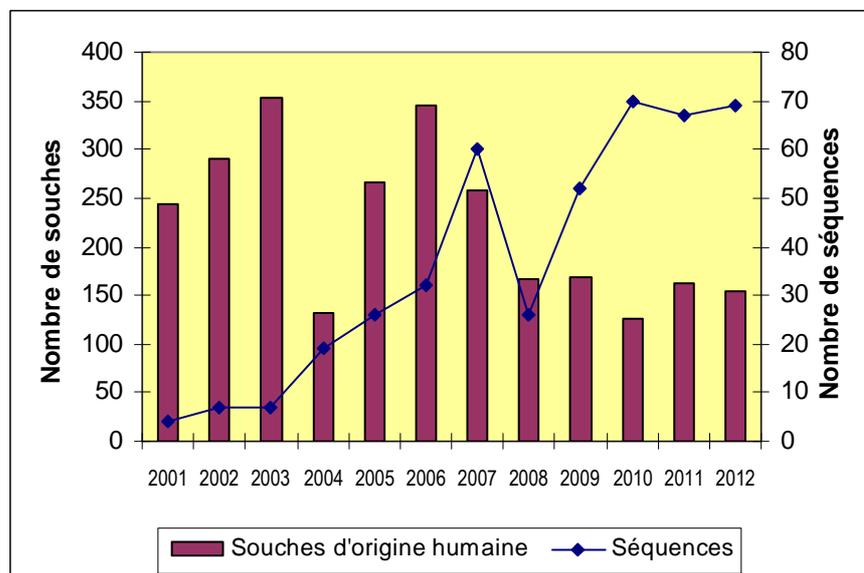
Le CNR participe également aux côtés de son laboratoire associé *Clostridium difficile* et de son réseau de laboratoires experts à la caractérisation des souches de *Clostridium difficile* isolées de cas sévères ou groupés (49 souches étudiées).

Apport du séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ADNr 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 retrouvées dans l'environnement (*Clostridium...*).

Ce séquençage du gène ADNr16S (69 séquences effectuées en 2012) a permis de confirmer sans ambiguïté l'identification de plusieurs bactéries rares trouvées responsables d'infections chez l'homme appartenant aux genres *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Catabacter*, *Clostridium*, *Oscillibacter*, ou à la famille *Lachnospiraceae* avec plusieurs nouveaux genres/espèces potentiels.

Le graphique suivant montre l'évolution du nombre annuel de séquences ADNr 16S effectuées au CNR.



2.3.2. Souches d'origine vétérinaire

Les souches anaérobies strictes d'origine vétérinaire qui nous ont été adressées sont des *Clostridium* dont 58 % sont des *Clostridium perfringens* (Tableau 5). Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par le test sur souris et amplification génique.

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.

Le typage des souches toxigènes 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 et Tpel plus récemment identifiés, sont inclus dans le toxinotypage de routine.

2.3.3. Souches d'origine "industrielle"

Un total de 5 souches, classées "industrielles", c'est à dire non médicales et non vétérinaires, nous ont été adressées par divers laboratoires, tels que laboratoires de collections, laboratoires du secteur agroalimentaire, laboratoires pharmaceutiques, laboratoires départementaux,... (Tableau 6). Ces demandes d'analyse concernaient des confirmations d'identification, toxinotypie, identification de souches toxigènes au cours d'enquêtes épidémiologiques pour préciser l'origine d'intoxications alimentaires botuliques ou dues à des *C. perfringens*, identification de contaminants dans des préparations pharmaceutiques, caractérisation de souches à usage vaccinal ou industriel. Egalement, des souches nous sont adressées par des industriels de l'agro-alimentaire pour évaluer leur éventuelle pathogénicité. Ce sont des souches isolées d'aliments traités par la chaleur, le plus souvent des *Clostridium* thermophiles ou apparentés à *C. botulinum* qui peuvent présenter un risque de santé publique.

2.4. ACTIVITES D'EXPERTISE SUR *C. DIFFICILE* (LABORATOIRE ASSOCIE)

Au cours de l'année 2012, 464 prélèvements ont été reçus par les différents laboratoires experts, contre 596 en 2011 (-22%) (Tableau I). Cette diminution s'explique par un **rappel des critères de signalement et d'envoi** des souches de *C. difficile* au CNR au début de l'année 2012. Parmi ceux-ci, **435** ont été confirmés comme étant des souches de *C. difficile* et analysés ; 15 souches (3,4%) étaient des souches de *C. difficile* non toxigènes et **420** (96,6%) correspondaient effectivement à des souches toxigènes.

Parmi les souches toxigènes (Tableau II),

- La recherche des fragments A3 et B1 a été effectuée pour 384 et 380 souches respectivement ; le toxinotype a été rendu pour 60 souches (effectué par le laboratoire associé).

- La recherche de la toxine binaire a été effectuée pour 343 souches. Parmi les 193 souches qui ne possèdent pas la forme entière de la toxine binaire, la recherche de la forme tronquée a été effectuée pour 144 souches.

- La recherche d'une délétion dans le gène *tcdC* a été réalisée pour 359 souches.

- Un antibiogramme a été rendu dans 418 cas.

- La PCR-ribotypage a été effectuée sur toutes les souches toxigènes.

	2012	2011	2010	2009	2008	2007
Nb de prélèvements reçus	464	596	551	561	617	780
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	435	550	520	499	578	748
Nb de souches toxigènes	420	543	503	486	561	731

Tableau I : Evolution du nombre de prélèvements reçus pour caractérisation et nombre de souches de *C. difficile* depuis 2007.

	2012
Nb de prélèvements reçus	464
Nb de souches de <i>Clostridium difficile</i>	435
Nb de souches toxigènes	420
Recherche du fragment A3 (%)	91,4
Recherche du fragment B1 (%)	90,5
Recherche de la toxine binaire (%)	81,7
Délétion dans <i>tcdC</i> (%)	85,5
Antibiogramme (%)	99,5
PCR-ribotypage (%)	100

Tableau II: Activité d'expertise sur *C. difficile* et analyses effectuées sur les souches toxigènes (en %)

Au cours de l'année 2012, une demande de souche non toxigène a été faite par l'Université d'Aix Marseille. Une souche de la collection du CNR lui a été envoyée.

2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE SUR LA TOXINE BOTULIQUE

2.5.1. Développement d'un test de détection de la toxine botulique A par un test endoprotéase avec révélation par spectrométrie de masse (collaboration avec le CEA)

(J. Clin. Microbiol. 2012, 50/ 4091-4094)

Une alternative au test de létalité chez la souris pour la détection et l'identification de la toxine botulique A consiste à utiliser l'activité protéasique de cette toxine vis-à-vis de son substrat spécifique qui est la protéine SNAP25. La toxine botulique A clive SNAP25 entre les acides aminés 197 et 198. Une première approche de détection des produits de clivage consiste à utiliser la spectrométrie de masse qui est une méthode très sensible et qui permet d'identifier les peptides issus de la protéolyse.

Cette méthode a été testée avec de la toxine botulique A purifiée ou sous forme de complexe en tampon phosphate. La sensibilité obtenue par spectrométrie de masse était voisine de 1 DL/ml par comparaison des deux tests qui ont été réalisés en parallèle avec les mêmes solutions de toxine. Par contre, les résultats étaient moins satisfaisants avec des échantillons de sérum contenant de la toxine botulique A. Pour augmenter la sensibilité de cette méthode avec les échantillons de sérum, une étape d'immunocapture a été développée. Des anticorps lapins dirigés contre la chaîne lourde de la toxine botulique A et immunopurifiés ont été fixés à des billes couplées à la protéine G (Dynabeads). Ces billes ont été utilisées pour concentrer la toxine botulique A dans des échantillons de 0.5 ml de sérum et ensuite pour réaliser le test de clivage de SNAP25 suivi d'une détection par spectrométrie de masse. Dans ces conditions, la sensibilité était proche de 1 DL/ml. Cette méthode a été testée avec 7 échantillons de sérum de malades naturellement contaminés et a permis de révéler la présence de toxine botulique A dans 6 de ces échantillons en accord avec le test de létalité chez la souris, mais un résultat à la limite de l'interprétation a été obtenu dans le 7^o échantillon alors qu'il contenait un taux élevé en activité létale.

2.5.2. Développement d'un test de détection de la toxine botulique A par un test endoprotéase avec révélation par ELISA (collaboration avec C Leveque, CNRS Marseille)

Afin de disposer d'un test plus facilement réalisable dans les conditions de notre laboratoire, un test de détection de la toxine botulique A avec révélation par ELISA est en cours de développement. Il est basé sur le clivage de SNAP25 par la toxine botulique A avec une révélation par ELISA à l'aide d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme clivée de SNAP25 par la toxine A et pas la molécule entière de cette protéine. Un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement cette protéine clivée nous a été fourni par C. Leveque. L'ADN codant pour SNAP25 a été cloné dans un vecteur pET28 et la protéine recombinante avec un tag 6His a été obtenue chez *E. coli* et purifiée sur colonne cobalt. La protéine recombinante SNAP25 a été fixée sur des plaques 96-puits, puis incubée avec des dilutions en série de préparations de toxine botulique ou des contrôles, et la révélation a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-forme clivée et d'un conjugué marqué à la peroxidase. Cette technique fournit des réponses 4 à 8 fois plus sensibles que le test de létalité chez la souris lorsqu'elle est réalisée avec des toxines purifiées et en tampon aqueux, mais la sensibilité est nettement plus basse lorsque des échantillons de sérum contenant de la toxine botulique sont utilisés. Ce test a été validé pour les toxines de sous type A1, A2, A3, A4 et A5. L'étape d'immunocapture, comme décrit au paragraphe précédent, est en cours d'évaluation pour augmenter la sensibilité de cette approche à partir d'échantillons de sérum.

En parallèle, l'équipe de C Leveque teste un protocole d'endoprotéase sans immunoprécipitation préalable et détection par SPR (Biacore). La sensibilité se révèle supérieure à celle du test de létalité chez la souris pour les sous types A1, A2, et A4, mais les sous types A3 et A5 ne sont pas détectés. Des essais sont en cours sur une série de sérums humains artificiellement contaminés avec des toxines de sous types A1 à A5. Le titrage des toxines a été effectué en parallèle par le test de létalité chez la souris à l'Institut Pasteur et par détection endoprotéase/SPR chez C Leveque. Les premiers résultats montrent une détection du sous type A1 dans le sérum par endoprotéase/SPR avec une sensibilité d'environ 0.1 DL50/ml, et pour le sous type A2 d'environ 3 DL50/ml. Le sous type A4 est également bien détecté. Par contre les sous types A3 et A5 n'ont pas été détectés. Ce programme de travail est encore en cours.

2.5.3. Développement d'un test de détection de la toxine botulique B par un test endoprotéase avec révélation par Biacore ou ELISA

(Anal Biochem 2011, 410: 281-288)

La toxine botulique B est aussi une protéase qui clive spécifiquement la protéine VAMP2 des vésicules synaptiques. En collaboration avec l'équipe de C. Leveque et M. Seagar (CNRS, Marseille), nous avons évalué le test qu'ils avaient développé, avec des sérums de malades de botulisme. Ce test est basé sur l'activité endoprotéasique de la toxine botulique B en utilisant comme substrat une préparation de vésicules synaptiques contenant VAMP2 et une révélation par Biacore (surface plasmon resonance, SPR) à l'aide d'un anticorps qui reconnaît uniquement la forme clivée de VAMP2. Une étape d'immunocapture a été réalisée au préalable avec les échantillons de sérum des malades à l'aide d'anticorps lapin anti-chaîne lourde de la toxine botulique B fixée à des billes de Sephadex. Dix sérums de malade naturellement contaminés ont révélé la présence de toxine botulique B par cette méthode en accord avec le test de létalité chez la souris. Cependant les titres obtenus dans les deux tests n'étaient pas comparables. Le test chez la souris dose l'activité globale de la neurotoxine entière, alors que le test "puce-vésicules synaptiques" est basé seulement sur l'activité enzymatique de la chaîne légère. Comme contrôle nous avons testé des sérums de

malades atteints de Guillain Barré ou d'autre forme de neuropathie autoimmune. Ces sérums induisent une insuffisance respiratoire chez la souris, parfois confondue avec la présence de toxine botulique mais non neutralisable par les sérums anti-botuliques. Par contre dans le test "puce-vésicules synaptiques", ces sérums ne donnent aucune réponse (Anal. Biochem. 2011, 10:154-170).

Afin de rendre cette approche plus accessible à nos conditions de laboratoire, un test endoprotéasique pour la toxine botulique B avec révélation par ELISA est en cours de développement. La protéine VAMP2 en fusion avec GST est produite chez *E. coli* et purifiée. Elle est déposée dans des plaques 96 puits et incubée avec des dilutions de toxine ou des contrôles. Des anticorps reconnaissant spécifiquement la forme clivée de VAMP2 ont été obtenus chez le lapin par immunisation à l'aide d'un peptide synthétique correspondant à la partie C-terminale précédant la coupure par la toxine botulique B.

2.5.4. Caractérisation des souches de *C. botulinum* par génotypage, séquençage du gène de la neurotoxine botulique et étude MLST.

Les souches de *C. botulinum* sont divisées en 7 types (A à G) selon les propriétés antigéniques des toxines botuliques produites et en sous-types selon les variations de séquence du gène de la neurotoxine. D'autre part, les souches de *C. botulinum* se caractérisent par les gènes des protéines non toxiques qui composent le locus botulique. Le génotypage du locus botulique réalisé par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques de chaque gène des locus botuliques, ainsi que le séquençage du gène de la neurotoxine botulique permet d'obtenir une caractérisation précise du type et sous type de chaque souche. Les souches de *C. botulinum* isolées au CNR sont systématiquement analysées par génotypage portant sur les gènes du locus botulique, séquençage complet du gène de la neurotoxine botulique et analyse de 7 gènes de ménage par MLST.

En collaboration avec la plateforme de séquençage de l'Institut Pasteur, nous sommes en train de développer une approche de séquençage du génome total des souches d'intérêt de façon à avoir accès directement aux séquences des gènes cibles pour le génotypage et sous typage des souches de *C. botulinum* sans avoir à réaliser et séquencer des multiples fragments d'ADN par PCR. De plus de nombreuses informations sur les séquences d'autres gènes sont accessibles par cette méthode. La limite actuelle de cette approche est le traitement bioinformatique des données.

2.5.5. Caractérisation des souches de *C. botulinum* au moyen d'une puce ADN Illumina (Publication dans PlosOne en cours)

Dans le cadre d'un programme en collaboration avec le NIH, une puce comportant des ADN d'intérêt pour de nombreux agents de la menace biologique a été développée. Cette puce comporte les ADN des principaux gènes de neurotoxines botuliques ainsi que les gènes des protéines non toxiques du locus botulique. Elle a été testée avec des souches représentatives des principaux types de *C. botulinum* ainsi qu'avec des échantillons et souches isolés d'un foyer de botulisme. Cette méthode a permis de détecter et typer en une seule opération des souches de référence ainsi que des souches de *C. botulinum* dans des échantillons naturellement contaminés en accord avec la méthode de référence qui a été mise en place en parallèle.

2.5.6. Détection de *C. botulinum* A, B, E, F, C, C/D, D/C et D en PCR temps réel

Les couples de primers correspondant aux gènes des neurotoxines A, B, E, C et D ont été synthétisés et validés par la méthode de Sybr-green en PCR temps réel avec des gammes d'ADN purifiés. Cette méthode est utilisée en routine depuis plus de 3 ans au CNR pour la détection des souches de *C. botulinum* dans les échantillons et la caractérisation des souches.

Cette méthodologie a été complétée avec des primers permettant de détecter et de différencier les souches de *C. botulinum* F, ainsi que les souches mosaïques C/D et D/C. Des souches de *C. botulinum* Af et Bf ont été identifiées dans des cas récents de botulisme humain.

De même, la méthode a été étendue aux souches de *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques de type B. Des primers basés sur des gènes spécifiques de chaque sous type ont été développés et validés pour différencier ces sous types de souches par PCR temps réel.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1. Surveillance des infections à *C. difficile*

3.1.1. Réseau de partenaires

Le CNR des bactéries Anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur, Paris), son laboratoire associé « *Clostridium difficile* » (Université Pierre et Marie Curie, site Saint-Antoine, microbiologie, Paris VI) et un réseau de 5 laboratoires experts (Rouen, Nice, Nancy, Montpellier, Toulouse) couvrant chacun une région, assurent une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*.

3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées

Le laboratoire associé et les laboratoires experts assurent le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un **signalement** aux autorités sanitaires. 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/mm³, traitement chirurgical de l'infection à *C. difficile* épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours noté. Le tableau III montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (ces critères ne sont pas exclusifs).

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2012 (464 prélèvements)		
	oui	non	NR
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	55	175	234
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	15	237	212
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	9	226	229
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	39	197	228
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	5	219	240
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	153	118	193

NR : non renseignés

Le nombre de prélèvements reçus par chaque laboratoire est détaillé dans le tableau IV et l'évolution est représentée sur la figure 2.

Le nombre de prélèvements reçus par chaque laboratoire est détaillé dans le tableau IV.

Tableau IV : Répartition par laboratoire et par an des prélèvements reçus depuis 2007

Laboratoire	Nombre de prélèvements reçus en					
	2012	2011	2010	2009	2008	2007
CNR (Institut Pasteur)	22	10	4	6	4	25
Laboratoire associé Paris	260	345	298	291	348	475
Laboratoire expert Nancy	22	61	23	10	21	35
Laboratoire expert Montpellier	29	30	38	27	28	35
Laboratoire expert Toulouse	36	46	61	63	59	18
Laboratoire expert Rouen	31	47	47	96	77	75
Laboratoire expert Nice	64	57	80	68	80	117
Total	464	596	551	561	617	780

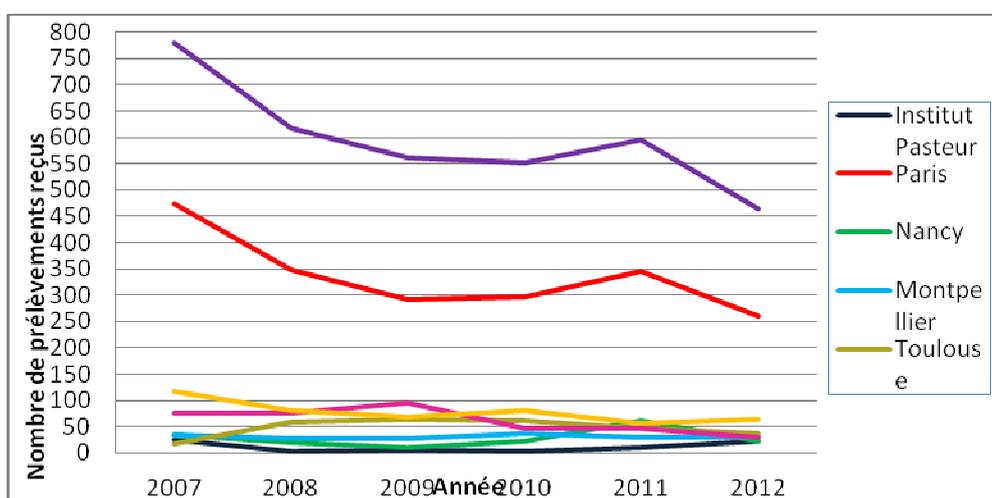


Figure 2: Répartition par laboratoire des prélèvements reçus en 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 et 2012

La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la figure 3.

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 aussi avec l'intérêt particulier porté par certains microbiologistes aux bactéries anaérobies.

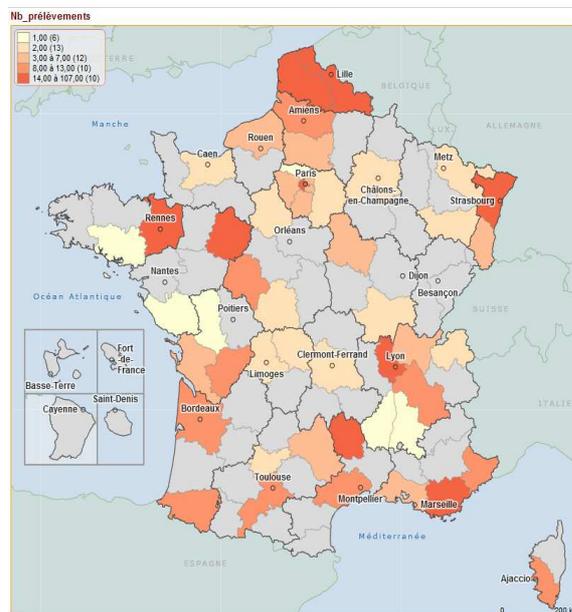


Figure 3 : Répartition des prélèvements envoyés par département, en 2012

3.1.3. Analyse de la distribution des souches de *C. difficile* en fonction des critères pertinents et analyse des tendances

En 2012, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient de selles (401 souches) à l'exception de 3 souches qui provenaient d'une hémoculture, d'une poche d'iléostomie colectomie et d'un drain de poumon. Dans 16 cas l'origine du prélèvement de la souche toxigène n'était pas renseignée.

Deux cent quarante-sept souches (62,4%) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes, 149 (37,6%) chez des hommes. Le sexe n'était pas renseigné dans 24 cas.

L'âge des patients, renseigné dans 408 cas, chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représenté sur la figure 4. **Au total, en 2012, 73,8% des patients ont plus de 65 ans** (versus 74,1%, 68,5% 76,3 %, 72,9 % et 76,8 % en 2011, 2010, 2009, 2008 et 2007 respectivement).

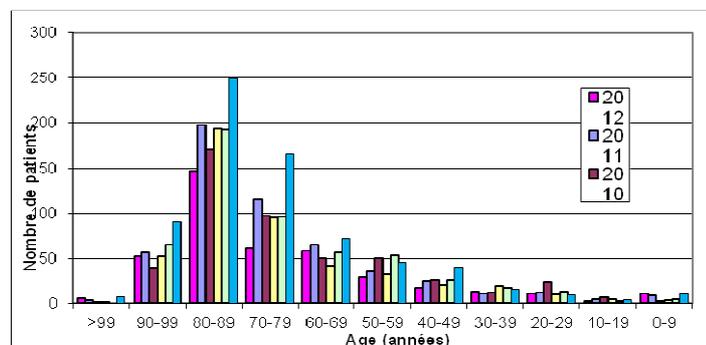


Figure 4 : Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge et en fonction de l'année (2007 à 2012)

Parmi les 420 souches de *C. difficile* toxigènes, 91 (21,7%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027** ; parmi celles-ci, 9 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « historique » c'est-à-dire sensibles à la moxifloxacine (souches isolées dans les départements de la Haute-Garonne (n=2), de la Sarthe (n=4), du Var (n=1), des Bouches-du-Rhône (n=1) et de Paris (n=1)). Les 82 souches épidémiques 027 ont été isolées en Gironde (n=1), en Ile-et-Vilaine (n=6), en Isère (n=2), dans le Bas-Rhin (n=1), à Paris (n=4), en Haute Vienne (n=2), dans les Hauts-de-Seine (n=1), dans le Pas-de-Calais (n=5) et dans le Nord (n=60) (figure 5). La majorité des souches 027 restent toujours localisées dans la partie Nord de la France.

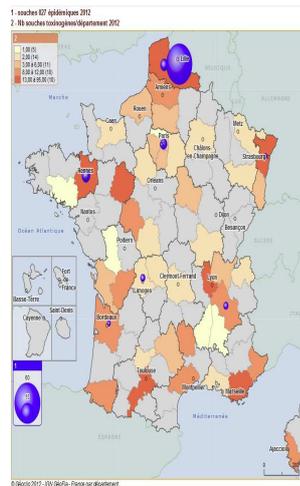


Figure 5 : Répartition des souches PCR-ribotype 027 épidémiques en fonction des départements, en 2012.

Concernant la surveillance des **autres PCR-ribotypes** : l'envoi de 10 souches de référence de PCR-ribotype défini aux différents laboratoires experts a permis de mieux caractériser les souches autres que 027 (tableau V). Le PCR-ribotype le plus fréquemment retrouvé en France, après le 027 est le 014/020/077, retrouvé sur tout le territoire (figure 6). Les souches de PCR-ribotype 078/126 arrivent en 3^{ème} position (figure 7).

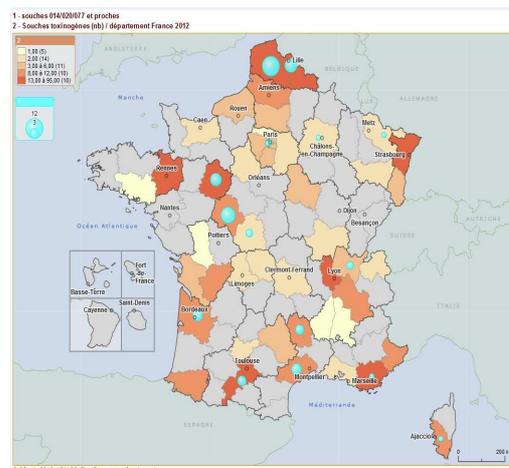


Figure 6 : Répartition des souches PCR-ribotype 014/020/077 ou proches du PCR-ribotype 014/020/077 en fonction des départements en 2012.

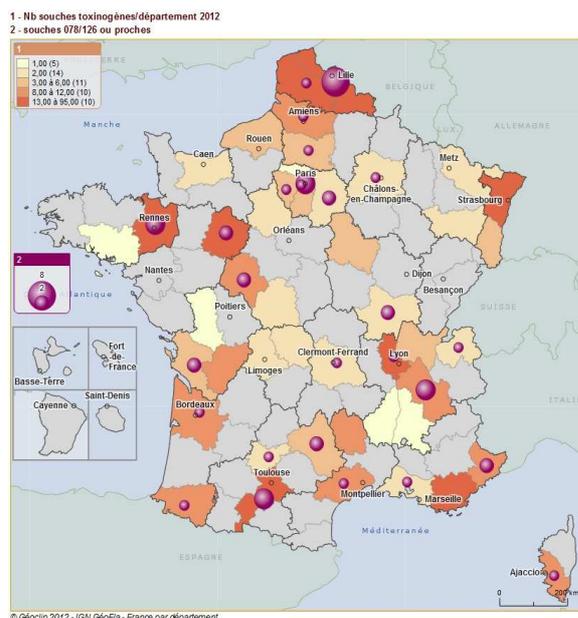


Figure 7 : Répartition des souches PCR-ribotype 078/126 ou proches du PCR-ribotype 078/126 en fonction des départements en 2012.

Les 10 PCR-ribotypes recherchés par les laboratoires représentent 58,3% des souches toxigènes. Les souches 027, 014/020/077 et 078/126 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 47,6% des souches toxigènes (Tableau V, figure 9). Cependant il faut noter que pour 82 souches (19,5%) l'identification du PCR-ribotype n'a pas été faite. Cette proportion élevée de souches pour lesquelles le PCR-ribotype n'a pas été déterminé s'explique en partie par les changements de personnels au laboratoire expert de Nice (départ à la retraite de F. Girard-Pipau, changement de chef de service).

Tableau V : Répartition des souches en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France en 2012

PCR-ribotype*	Nombre de souches 2012	Nombre de souches 2011	Nombre de souches 2010
027	91 (21,7%)	139 (25,6%)	96 (19,1%)
014/020/077	55 (13,1%)	84 (15,5%)	77 (15,3%)
078/126	54 (12,9%)	76 (14%)	72 (14,3%)
002	16 (3,8%)	36 (6,6%)	30 (6%)
001	10 (2,4%)	12 (2,2%)	14 (2,8%)
005	9 (2,1%)	11 (2%)	ND
015	3 (<1%)	10 (1,8%)	ND
017	5 (1,2%)	3 (<1%)	0 (<1%)
106	2 (<1%)	3 (<1%)	5 (1%)
053	0 (<1%)	0 (<1%)	1 (<1%)
autres	93 (22,1%)	112 (20,6%)	179 (35,6%)
ND (non 027)	82 (19,5%)	57 (10,5%)	29 (5,8%)
Total	420	543	503

*PCR-ribotype de la souche ou très proche de celui-ci

ND : non déterminé (PCR-ribotype non 027, mais identification non faite)

Parmi les PCR-ribotypes autres, les PCR-ribotypes 012/048 (7 souches), 087 (6 souches) et 050 (5

souches) sont les plus fréquemment retrouvés en 2012 mais ne sont pas caractérisés par tous les laboratoires.

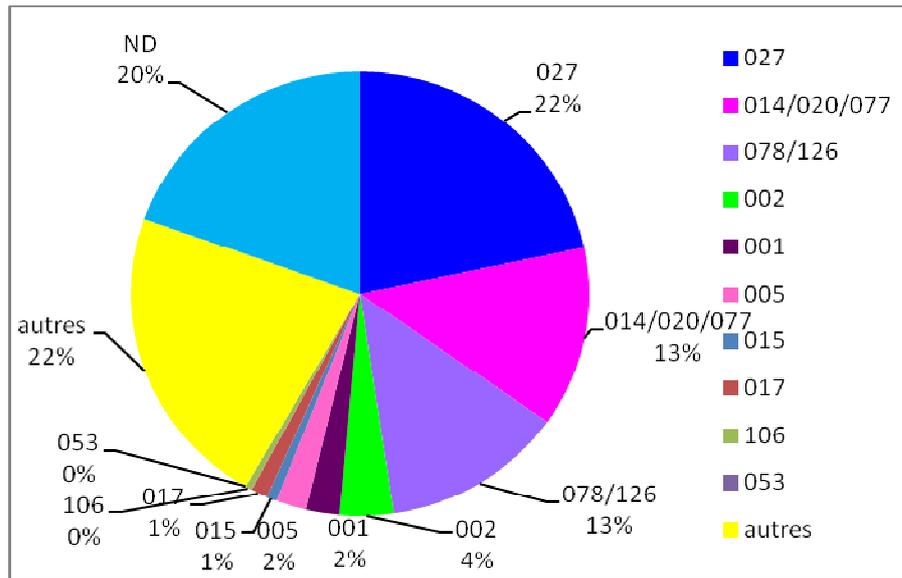


Figure 8 : répartition des PCR-ribotypes en 2012

Le toxinotypage a été réalisé sur 60 souches. Il a permis d'identifier 2 souches de toxinotypes rares : toxinotypes XIa et XIb. Ces toxinotypes rares ont pour particularité de ne produire que la toxine binaire. Les toxines A et B ne sont pas produites. Ces souches ne peuvent être détectées que par les tests ciblant la toxine binaire en plus des toxines A et B. Le test de diagnostic par PCR, Xpert *C. difficile* (Cepheid), est un des seuls tests commercialisés capables de détecter ce type de souche à l'heure actuelle.

Au cours de l'année 2012 une diminution de la proportion de souches possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (Tableau VI).

Tableau VI: Evolution de la proportion de souches productrices de toxine binaire, 2007-2012

	2012	2011	2010	2009	2008	2007
Nb de <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	343	453	444	421	461	656
Nb <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	150	223	207	188	193	264
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positives (%)	43,7	49,2	46,6	44,7	41,9	40,2
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	87	127	95	116	85	145
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs hors souches 027 (%)	24,6	29,4	32,1	23,6	28,7	23,3

3.1.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

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). Ce site permet à chaque laboratoire expert ou associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats. Ce site est consultable dans sa totalité par l'Institut de Veille Sanitaire, le CNR des Anaérobies et son laboratoire associé. Les C-CLIN, l'ARS et les laboratoires experts ont un accès restreint aux données de leur région. Ce site est régulièrement mis à jour.

L'émergence du clone épidémique 027 de *C. difficile* dans une nouvelle région est immédiatement signalée à l'InVS.

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

Comme l'année précédente, le CNR et son laboratoire associé ont réuni le **1er juin 2012** à Paris les représentants des laboratoires experts et de l'InVS.

3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES BACTERIES ANAEROBIES AUX ANTI-INFECTIEUX

3.2.1. Surveillance de la résistance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux (CNR)

Les laboratoires ne nous demandent que très 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.

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*).

En 2012, parallèlement aux tests phénotypiques nous avons effectué sur **104 souches** un antibiogramme standard selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les résultats sont repris dans le tableau 7-1. Les données d'antibiorésistance des 49 souches de *Clostridium difficile* sont données tableau 7-2

Amoxicilline et association amoxicilline/ac. clavulanique

Les seules résistances observées ont été classiquement retrouvées dans le genre *Bacteroides* et le genre *Fusobacterium* mais aussi chez 2 souches de *Capnocytophaga sputigena* (résistance au contact) et aussi *Odoribacter splanchnicus* et *Parabacteroides merdae*.

Imipénème

Parmi les 6 souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* étudiées, une seule présentait une résistance à cet antibiotique [diamètre de 15mm (diamètres critiques 17-24mm)]. Une souche de *Fusobacterium necrophorum* avait une résistance intermédiaire (diamètre 20mm).

Moxifloxacine

Quatre souches de *Fusobacterium* avaient une résistance intermédiaire (diamètres compris entre 15 et 20mm). Une souche d'*Actinomyces israelii* et 3 souches d'*Egerthella lenta* étaient résistantes (6 à 15mm). Deux souches d'*Actinobaculum* étaient intermédiaires (diamètres 20mm). Sept souches de *Clostridium* résistantes ou intermédiaires.

La résistance à la moxifloxacine est relativement fréquente chez *Clostridium difficile* (voir l'antibiogramme spécifique à cette espèce effectué dans le cadre de la surveillance de l'émergence éventuelle de clones épidémiques – tableau 7-2). Trente-trois souches sur 49 testées présentaient une sensibilité intermédiaire ou une résistance à cet antibiotique.

Clindamycine

Des résistances à la clindamycine ont été trouvées pour les bactéries Gram négatif chez 3 souches de *Bacteroides* du groupe fragilis, *Desulfovibrio desulfuricans* (1), *Dialister* (1), *Odoribacter splanchnicus* (1) et *Parabacteroides merdae* (1).

Chez les bactéries à Gram positif (hors *Clostridium difficile*) des résistances à la clindamycine ont été trouvées dans le genre *Actinobaculum* (2 souches), *Actinomyces* (3), *Propionibacterium* (1), *Anaerococcus* (1), *Eggerthella* (1), *Lachnospiraceae* sp. (1) et chez 7 souches de *Clostridium* appartenant à 5 espèces (Tableau 7-1).

Métronidazole

Une souche de *Anaerococcus vaginalis* (diamètre 6mm), une souche de *Capnocytophaga* (diamètre 6mm) et deux souches de *Dialister* (6 et 20mm) étaient résistantes au métronidazole

Sensibilité aux antibiotiques des *Bacteroides* du groupe fragilis

Les *Bacteroides* du groupe fragilis (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*...) sont parmi les principales espèces de bactéries anaérobies présentant des résistances aux antibiotiques nombreuses et préoccupantes pour le clinicien.

Afin de mieux caractériser les souches présentant des résistances notamment aux bêta-lactamines, nous avons introduit en routine au CNR plusieurs systèmes PCR permettant de mieux préciser le ou les mécanismes impliqués dans cette résistance.

Mise en évidence par PCR des gènes suivants (Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (2010) 66 :343-348) :

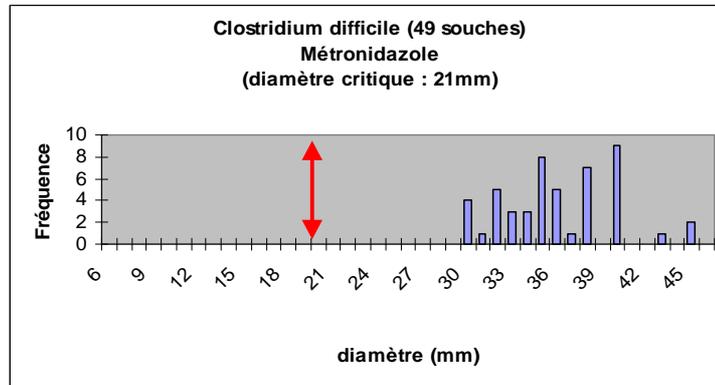
- *cepA* (céphalosporinase)
- *cfxA* (bêta-lactamase active sur la céfoxitine)
- *cfiA* (carbapénémase)
- système PCR permettant de détecter la présence de séquence d'insertion (IS) dont la présence (par l'apport d'un promoteur) est nécessaire à l'expression du gène *cfiA*. En l'absence d'IS (donc pas de promoteur), le gène est détecté mais n'est pas exprimé.

De plus la séquence ADNr 16S est systématiquement déterminée. Ruimy et al. ont démontré en 1996 d'après les séquences ADNr 16S l'existence au sein de l'espèce *Bacteroides fragilis* de 2 groupes. Ces auteurs avaient montré que les souches *cfiA+* appartenaient au groupe II alors que les souches *cfiA-* appartenaient à l'autre groupe.

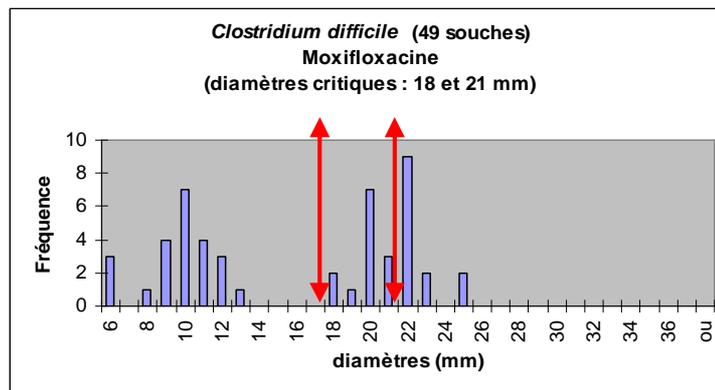
Sensibilité aux antibiotiques chez *Clostridium difficile*

Chez les souches de *Clostridium difficile* étudiées au CNR, les proportions des souches intermédiaires + résistantes sont données dans le tableau 7-2.

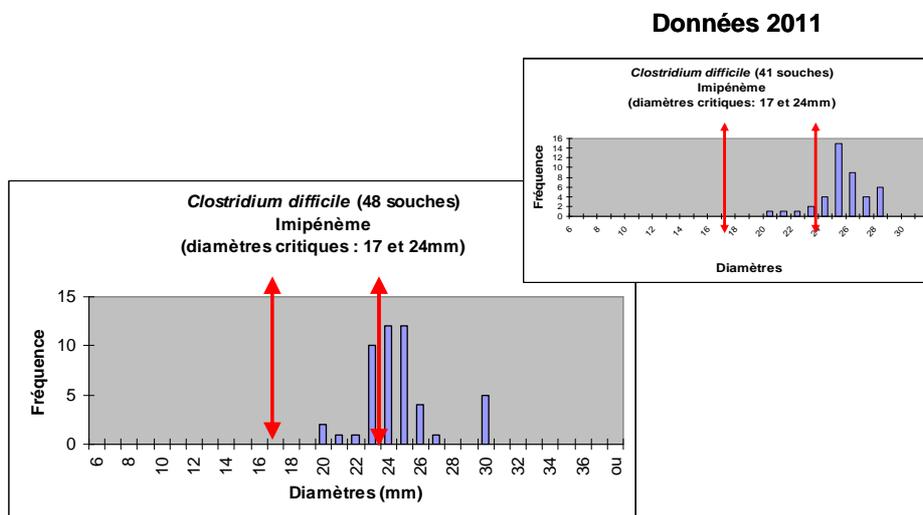
Le **métronidazole** reste très actif *in vitro* avec des diamètres supérieurs ou égaux à 30mm (diamètre critique : 21mm).



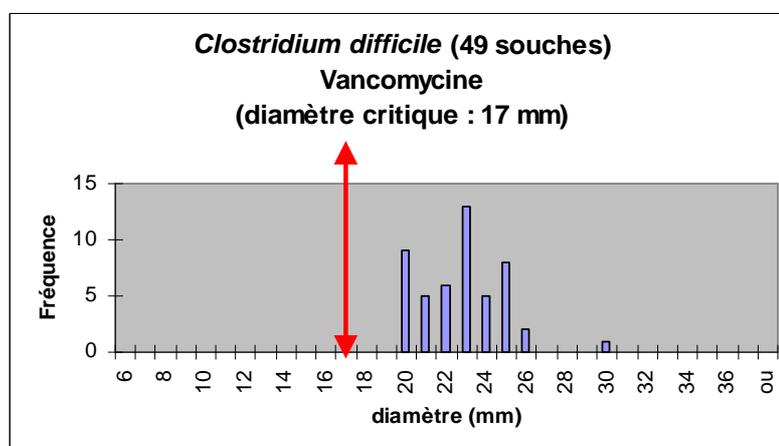
Pour la **moxifloxacine** les souches I+R sont rencontrées dans les PCR ribotypes 027, 078/126 et les autres PCR ribotypes (Tableau 7-2)



Pour l'**impénème** on peut confirmer en 2012 par rapport aux données 2011 une dérive des souches vers une sensibilité intermédiaire (3 souches 078/126 et 11 souches non 027- non 078/126). (tableau 7-2).



Toutes les souches testées (49) étaient sensibles à la **vancomycine** avec des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 20mm.



3.2.2. Surveillance de la résistance de *C. difficile* aux anti-infectieux (Laboratoire associé)

La sensibilité des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, au métronidazole, à la tétracycline et à la vancomycine (diamètres) a été testée pour 418, 411, 416, 392, 413 et 396 souches de *C. difficile* toxigènes respectivement, en 2012. Une détermination de la CMI du métronidazole et de la vancomycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 28 et 22 souches respectivement.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22mm) de 44,5%, pour la clindamycine (diamètre < 15mm) de 87,8%, pour la moxifloxacine (diamètre < 21mm) de 42,3%, pour la tétracycline (diamètre < 19) de 5,3% (Tableau VII). Ces taux de résistance sont relativement stables ces dernières années.

Toutes les souches toxigènes étaient sensibles à la vancomycine (diamètre ≥ 17 mm, ou CMI ≤ 2 mg/l selon l'Eucast).

Aucune souche toxigène ne présentait de résistance au métronidazole (diamètre < 21mm, ou CMI > 2 mg/l selon l'Eucast). Il n'est cependant pas rare de voir des colonies dans le diamètre du métronidazole notamment pour les souches de PCR-ribotype 027 ou 001 ; les CMI de ces souches restent ≤ 2 mg/l. Ce phénomène est à surveiller. Par ailleurs, 2 souches non toxigènes étaient résistantes au métronidazole (CMI à 16 et > 256 mg/l).

Tableau VII : Pourcentage de résistance (R+I) des souches toxigènes de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine et à la tétracycline depuis 2007.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline
% de souches avec un diamètre	<22mm	<15mm	<21mm	<19mm
2007	41,1	81,2	41,7	ND
2008	41,3	81,9	38,9	ND
2009	43,8	79,5	43,1	2,5*
2010	40,5	91,3	41,3	5,3
2011	51,3	90,4	53,3	2
2012	44,5	87,8	42,3	5,3

ND : non déterminé

* : la détermination de la sensibilité à la tétracycline a été mise en place au cours de l'année 2009 (résultats partiels)

3.3. SURVEILLANCE DU BOTULISME

Le volume global d'activité concernant la surveillance du botulisme en 2012 est le suivant:

Botulisme humain		
	- sérums (recherche de toxine botulique)	149
	- selles (recherche de toxine botulique et de C. botulinum)	55
	- sérums (recherche d'anticorps neutralisants de toxine botulique)	25
Echantillons agro-alimentaires		
	- en relation avec une suspicion de botulisme humain	20
	- autres	35
Botulisme animal		
	- échantillons	145
Echantillons d'aliment pour animaux et échantillons environnementaux		
	- échantillons	208
TOTAL		637

3.3.1. Botulisme humain

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

Analyse des cas de botulisme humain

Un total de 149 sérums et de 55 selles ou liquides gastriques de patients suspects de botulisme ont fait l'objet d'identification de botulisme en 2012 (Figure).

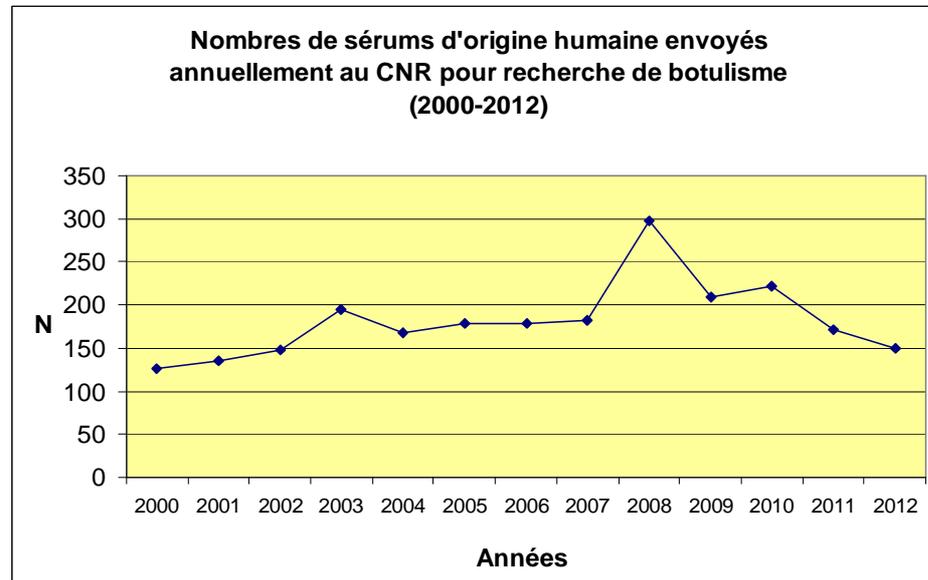


Figure : Evolution du nombre de sérums analysés au CNR pour l'identification du botulisme de 2000 à 2012.

La présence de toxine botulique est recherchée dans le sérum ainsi que dans les échantillons d'aliment par le test de létalité sur souris et de sero-protection à l'aide d'anticorps neutralisants spécifiques. Des tests *in vitro* alternatifs au test de létalité chez la souris sont en cours de développement. Notamment, nous évaluons les tests d'endopeptidase avec détection par ELISA pour la mise en évidence et l'identification des toxines botuliques A, B et E. Des essais ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de M Seagar à Marseille pour la détection dans des sérums artificiellement et naturellement contaminés avec de la toxine botulique B en utilisant le test d'endoprotéase avec détection par SPR (Biacore), et en collaboration avec N. Becher au CEA Saclay pour la détection dans des sérums artificiellement et naturellement contaminés avec de la toxine botulique A par un test d'endoprotéase et détection par spectrométrie de masse. Ces essais réalisés en parallèle du test de référence, c'est à dire le test souris, ont été prometteurs. Pour des raisons de commodité dans notre laboratoire nous avons adapté ces tests à une détection par ELISA. Dans la mesure où les échantillons de sérum sont en volume suffisant, nous mettons en route les deux types de tests, *in vivo* et *in vitro*, pour évaluer ces nouvelles méthodologies dans les conditions d'analyses de routine.

C. botulinum est recherché dans les selles et les aliments suspects par culture d'enrichissement amplification génique, et caractérisation des toxines produites selon un protocole développé au laboratoire. La détection de *C. botulinum* directement dans l'échantillon par extraction d'ADN et PCR en temps réel a été développée. Etant donné que la sensibilité de cette approche n'est pas toujours suffisante elle est dans tous les cas accompagnée de la recherche de *C. botulinum* après culture d'enrichissement. L'isolement des souches de *C. botulinum* est entrepris pour chaque échantillon positif de façon à obtenir une caractérisation détaillée des souches et du type de botulisme en cause.

Au cours de l'année 2012, 9 cas de botulisme plus un suspect (7 foyers plus un suspect) ont été identifiés (Tableau 8). Ces données sont sensiblement identiques à celles des années précédentes:

Année	Foyers (cas) déclarés
2012	8 (10)
2011	9 (17)
2010	8 (26)
2009	25 (10)
2008	6 (9)
2007	6 (11)
2006	7 (8)

Tableau 8. Foyers et cas déclarés de botulisme humain en France de 2006 à 2012

Selon le type de toxine botulique, les foyers et cas de botulisme se répartissent en 4 foyers (5 cas) de botulisme de type A, 3 foyers (4 cas) de botulisme de type B et un foyer (un cas) de suspicion de botulisme non confirmé au CNR. Les nombres de foyers et cas sont sensiblement inférieurs à ceux de l'année précédente et se situent dans la moyenne de ceux des 5 dernières années. La prédominance des formes de botulisme de type A par rapport à celles de type B qui a été constatée en 2011 se poursuit en 2012.

La forme la plus fréquente de botulisme en France est le botulisme d'origine alimentaire par intoxication (7 foyers sur 8). Dans un autre cas, il s'agissait de botulisme infantile.

L'origine alimentaire a été identifiée dans 4 foyers parmi les 7 dont le diagnostic a été confirmé. Dans deux foyers il s'agissait d'un jambon de préparation familiale, dans un autre d'une conserve familiale d'aubergine préparée au Maroc, et dans un autre cas d'une préparation industrielle de pâté d'origine bulgare. Dans deux foyers, l'origine du botulisme était un aliment préparé hors de France et consommé dans notre pays.

Un foyer (un cas) de botulisme de type B a été identifié en janvier 2012 dans le département du Bas Rhin. Il s'agissait d'une jeune personne isolée (homme, 20 ans) d'origine Bulgare qui avait consommé une préparation industrielle (pâté) d'origine bulgare. Ce jeune homme présentait une paralysie oculomotrice, mydriase, aréactive, dysphagie, sécheresse de la bouche, dysurie, constipation. La toxine botulique de type B a été retrouvée dans le sérum (2 MLD/ml) et dans un échantillon de selles (200 MLD/g). Une souche de *C. botulinum* de type B a été détectée par PCR des selles ainsi que de l'échantillon de pâté. Par contre, l'aliment ne contenait pas de toxine botulique à un taux détectable (< 4 MLD/g). La souche de *C. botulinum* n'a pas pu être isolée de ces prélèvements.

Un cas de botulisme infantile de type A s'est manifesté dans la région de Montpellier en janvier 2012 chez une fillette de 5 mois (hypotonie, ne s'alimente plus, dysphagie, ptosis, diarrhée puis constipation, paralysie des membres sévères). Un premier diagnostic de cytopathie mitochondriale avait été avancé. Les selles contenaient de la toxine botulique de type A (environ 6000 MLD/g) et une souche de *C. botulinum* détectable par PCR. La toxine botulique n'a pas été détectée dans un échantillon de sérum (<1 MLD/ml) prélevé environ 24 h après le début des symptômes. La souche de *C. botulinum* isolée des selles a été identifiée comme étant de type A1(B) (B silencieux). L'ingestion de miel a été suspectée comme pouvant être à l'origine de l'intoxication, mais un échantillon de miel détenu par la famille s'est révélé négatif dans la recherche de *C. botulinum*.

En février 2012, un cas de botulisme de type A a été identifié chez une fillette de 11 ans (trouble de l'accommodation, dysphagie et dysphonie, faiblesse des membres inférieurs puis supérieurs, constipation, énurésie). La toxine botulique n'a pas été détectée dans un échantillon de sérum (<1 MLD/ml). *C. botulinum* de type A a été détecté par PCR dans un échantillon de selles, mais n'a pas pu être isolé. Les selles ne contenaient pas de toxine botulique détectable. Les repas étaient pris en famille ou à la cantine scolaire, et aucun autre cas n'a été observé dans l'entourage.

En mars 2012, un cas de botulisme de type A a été identifié chez une personne de 61 ans vivant seule dans le département de la Saône et Loire et ayant l'habitude de consommer des conserves industrielles périmées. La toxine botulique de type A a été détectée (8 à 16 MLD/ml) dans un échantillon de sérum prélevé 15 jours environ après le début des symptômes. *C. botulinum* de type A a été détectée par PCR dans un échantillon de selles également prélevé 15 j après le début des symptômes. La souche isolée des selles a été identifiée comme appartenant à un sous type intermédiaire entre A2 et A5 par séquençage du gène de la neurotoxine botulique. Aucun échantillon d'aliment ne nous est parvenu pour analyse.

En août 2012, un foyer de botulisme de type B a été observé dans le Puy de Dôme. Une femme de 43 ans a manifesté des troubles de l'accommodation et de la déglutition, une sécheresse de la bouche, et des nausées. La toxine botulique de type B a été détectée dans un échantillon de sérum prélevé 6 jours environ après le début des symptômes. Des conserves familiales de betterave et un jambon de préparation familiale ont été suspectés d'être à l'origine de l'intoxication. La toxine botulique de type B a été identifiée dans le jambon (environ 12 000 MLD/g) et *C. botulinum* de type B a été identifié par PCR. La souche n'a pas pu être isolée. Trois autres personnes ayant participé aux mêmes repas n'ont pas manifesté de symptômes.

En octobre 2012, un foyer de botulisme de type A a été identifié dans la Sarthe dans une famille de trois personnes. Le père (39 ans) s'est plaint de vertiges suite à des troubles de l'accommodation et de vomissements. Il a été hospitalisé en réanimation 24 à 30 heures après le repas contaminant pour arrêt cardiaque. Les signes de paralysie se sont aggravés, au 5^e jour il était en quadriplégie totale et avait un ptosis marqué. Il a été réanimé et ventilé. La mère (39 ans) allaitait un enfant de 22 mois qui recevait aussi une alimentation solide. La mère a présenté des signes modérés de trouble de l'accommodation. L'enfant n'a présenté aucun signe clinique. La toxine botulique de type A a été retrouvée à un titre très élevé (80 MLD/ml) dans le sérum du père (prélèvement 4 jours après le début des symptômes). Un échantillon de liquide gastrique s'est révélé négatif. La toxine botulique n'a pas été détectée dans le sérum de la mère ni dans un prélèvement de lait maternel. Une conserve familiale d'aubergines préparée au Maroc a révélé la présence de toxine botulique de type A (800 MLD/g) ainsi que de *C. botulinum* A par PCR. La souche isolée des aubergines s'est révélé être une souche de type A(B) (B silencieux).

En novembre 2012, un cas de botulisme a été notifié sur la base des signes cliniques chez une personne de 25 ans à Lyon. La toxine botulique n'a pas été détectée dans un échantillon de sérum prélevé 2 jours après le début des symptômes. Mais une toxicité a été mise en évidence dans ce sérum qui n'a pas été neutralisé par les anticorps anti toxines botuliques A, B, E et F. Ce résultat oriente le diagnostic vers une neuropathie auto-immune comme le Guillain Barré.

Un foyer de botulisme de type B s'est manifesté dans le Puy de Dôme en novembre 2012. Deux personnes (65 et 25 ans) parmi 17 convives ont manifesté des signes de diplopie, mydriase, sécheresse de la bouche, constipation. La toxine botulique de type B a été retrouvée dans un échantillon de sérum de ces deux personnes (4 MLD/ml) prélevé 8 jours environ après le début des symptômes. Un échantillon de selles de la personne de 65 ans s'est révélé

négatif. La recherche de toxine botulique dans le sérum d'une autre personne asymptomatique s'est révélé négatif. Un jambon de préparation familiale qui a été consommé par les convives contenait de la toxine botulique de type B à un titre élevé (20 000 MLD/g) et *C. botulinum* B a été détecté par PCR. La souche isolée était un *C. botulinum* B non protéolytique. Il faut noter que le titre en toxine dans le jambon après traitement par la trypsine était identique à celui trouvé sans trypsinisation bien que la souche soit non protéolytique.

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 autoimmunes comme le syndrome de Guillain Barré ou de Miller-Fisher, la myasthénie, ou des accidents vasculaires (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 2012, 31 demandes d'analyse de botulisme ont été réorientées vers un diagnostic de neuropathies auto-immunes (Guillain-Barré, Miller Fisher), d'accident vasculaire cérébral, ou d'intoxication à l'atropine (Tableau 8-2). 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 le 2^o diagnostic.

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 10).

Un total de 25 échantillons de sérum a été analysé, et la présence d'anticorps neutralisants a été détectée dans 7 d'entre eux vis-à-vis de la toxine botulique A et aucun vis-à-vis de la toxine botulique B.

3.3.2. 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 et appartenant aux Agences régionales de santé et Directions départementales de la protection des populations (ex-Services Vétérinaires et Directions des Affaires Sociales) 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 au Tableau 9-1.

3.3.3. Botulisme animal

Le diagnostic de botulisme animal est de plus en plus réalisé par les laboratoires vétérinaires départementaux ou régionaux, auxquels nous avons transféré la méthodologie du moins à certains d'entre eux. Les demandes d'analyse de botulisme animal que nous recevons proviennent de laboratoires vétérinaires départementaux ou privés et concernent essentiellement des confirmations d'examen réalisés en première intention et de typage de botulisme. Notre rôle consiste principalement en une activité de référence basée sur des confirmations ou infirmations de premières analyses et de typage de botulisme. Les analyses concernant le botulisme animal sont résumées au Tableau 11.

Botulisme bovin. Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. En 2012, des foyers sévères affectant un grand nombre d'animaux par troupeau se sont déclarés. Des échantillons nous ont été adressés pour établir le diagnostic biologique. Un total de 63 échantillons, représentant 31 foyers et 37 cas, 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 ou suspecté dans 8 foyers (12 cas). Il s'agit principalement de botulisme de type mosaïque D/C (5 foyers sur 8) et secondairement D ou C. Comme l'année précédente le type mosaïque D/C semble prédominant chez les bovins en France.

Botulisme des oiseaux sauvages. 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 chaque année, essentiellement en saison chaude et sèche. L'année 2012, avec une période estivale aux températures modérées, n'a pas connu d'épisodes de botulisme aviaire particulièrement importants. Un total de 19 échantillons représentant 8 foyers et 15 cas ont été analysés. Le botulisme a été confirmé ou suspecté dans 4 foyers (10 cas). Le fait marquant est que d'après l'analyse génétique des souches isolées ou de l'ADN préparé des cultures d'enrichissement, les souches de *C. botulinum* des oiseaux sauvages correspondaient principalement au type mosaïque C/D, c'est à dire possédant un gène de neurotoxine hybride entre les types C et D. Les souches de *C. botulinum* mosaïque C/D sont distinctes de celles de type D/C retrouvées notamment chez les bovins. Une contamination croisée entre les deux espèces ou une source environnementale commune aux deux espèces semble peu probable.

Botulisme des oiseaux d'élevage. Le botulisme est relativement fréquent ces dernières années 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. En 2012, 44 échantillons provenant de 26 élevages (53 cas) ont été analysés. Le botulisme a été confirmé dans 11 élevages et suspecté dans un parmi les 26. Le diagnostic biologique du botulisme chez les volailles repose sur la mise en évidence et le typage de la toxine botulique dans le sérum, ce qui représente un test relativement fiable, et/ou la recherche de *C. botulinum* et son typage dans le contenu intestinal. Le typage de la toxine par séroneutralisation ne permet pas de caractériser les sous types C/D ou D/C mais uniquement les types C ou D, alors que l'analyse des souches ou de leur ADN dans les cultures d'enrichissement par PCR, apporte la précision du type et sous type. Parmi 49 échantillons de sérum analysés, la toxine botulique a été détectée dans 29: 8 type D, 2 type C ou D. Un total de 32 contenus intestinaux a été exploré, 13 ont été testés positifs: 12 de type C/D, 1 de type D ou C/D. La toxine botulique hybride C/D est neutralisée à la fois par les sérums anti-C et

anti-D ou uniquement par le sérum anti-D. Comme pour les oiseaux sauvages, le type le plus fréquent chez les volailles d'élevage est le variant C/D. 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.

3.4. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPEES ET DES PHENOMENES ANORMAUX

Laboratoire associé *Clostridium difficile*

Depuis août 2009, l'identification de 10 PCR-ribotypes régulièrement retrouvés en France a été mise en place. Les souches de référence correspondant aux PCR-ribotypes 001, 002, 014/020/077, 017, 027, 053, 078/126 et 106 ont été envoyées aux différents laboratoires experts et le serveur de résultat de l'Institut Pasteur a été modifié afin d'intégrer dans les résultats l'identification de ces différents PCR-ribotypes. En 2011, les PCR-ribotypes 005 et 015 ont été ajoutés et adressés aux laboratoires experts.

Deux souches très particulières ont été détectées par le test Cepheid GeneXpert *C. difficile* (gène codant pour la toxine binaire positif mais gène codant pour la toxine B négatif). Elles ont été isolées chez des patients atteints d'infection à *C. difficile* hospitalisés respectivement à Créteil et à Versailles. Ces souches, rares, ont la particularité de ne produire que la toxine binaire, mais pas les toxines A et B. Elles ont été identifiées comme appartenant aux toxinotypes XIa et XIb. C'est la première fois en France, à notre connaissance, que de telles souches sont rapportées dans des cas d'infection à *C. difficile*. Ces souches sont à surveiller.

3.5. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX EN PARTICULIER EUROPEENS

- **F. Barbut** est membre du comité exécutif de l'ESGCD (European Study Group on *C. difficile*) et occupe les fonctions de trésorier depuis 2009.
- **F. Barbut** participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'ECDC sur la surveillance des infections à *C. difficile* (Bauer et al. Lancet 2011).
- **F. Barbut et C. Eckert** participent au projet ECDIS-net (supporting capacity building of *C. difficile* infections at European level) et collaborent au WP4 (diagnostic) et au WP2 (épidémiologie).
- **F. Barbut et C. Eckert** participent à l'étude EUCLID (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLOstridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea)
- **F. Barbut** participe au projet ClosER (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes)

3.6. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

1. Projet ECDIS-net (supporting capacity building of *C. difficile* infections at European level).

L'objectif de ce réseau européen est d'améliorer la capacité des laboratoires des Etats Membres européens, de la Norvège, de l'Islande et du Liechtenstein à détecter et surveiller les infections à *Clostridium difficile*, de construire et maintenir une base de données pour une nomenclature de référence des PCR-ribotypes et de développer et améliorer les protocoles de surveillance des infections à *C. difficile*.

Financement : ECDC.

Diagnostics and typing of *Clostridium difficile* infections in Europe.

Kuijper EJ, SM van Dorp, MPM Hensgens, A Virolainen, E Nagy, P Mastrantonio, K Ivanova, F

Fitzpatrick, **F Barbut**, V Hall, T Eckmanns, C Suetens, MH Wilcox, DW Notermans, on behalf of the **ECDIS-Net participants**.

(ICDS 2012, Communication orale INV9)

Enhancing laboratory capacity for *Clostridium difficile* detection in Europe.

Notermans DW, A. Virolainen, E. Nagy, P. Mastrantonio, K. Ivanova, F. Fitzpatrick, **F. Barbut**, V. Hall, A. Kola, C. Suetens, M. Wilcox, E.J. Kuijper for the **ECDIS-net participants**.

(22nd ECCMID, London, 2012. Poster P2286)

2. Etude EUCLID (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea).

Cette étude est coordonnée par M. Wilcox, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, UK avec le support de coordinateurs nationaux (F. Barbut pour la France) et le soutien financier des laboratoires Astellas..

Il s'agit d'une étude non interventionnelle dont les objectifs sont de mieux définir le poids de l'infection à *C. difficile* en Europe et la nature des souches qui circulent. Le laboratoire *Clostridium difficile* associé au Centre National de Référence des anaérobies est chargé de mettre en place et de coordonner cette étude en France. Il s'agit d'une enquête bi-annuelle de prévalence des infections à *C. difficile*. Le premier volet s'est déroulé en décembre 2012. Soixante-douze laboratoires français sont impliqués dans cette étude de surveillance et ont envoyé un jour donné dans les semaines 49 et 50, toutes les selles diarrhéiques au CNR quelle que soit la demande du clinicien. La recherche de *C. difficile* et de ses toxines a été recherchée par le CNR sur l'ensemble des selles reçues.

3. Etude ClosER (Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent *Clostridium difficile* Ribotypes).

Cette étude est coordonnée par M. Wilcox, Leeds, UK et E. Kuijper, Leiden, Pays Bas sous l'égide de l'ESGCD (European Study Group on *Clostridium difficile*).

Il s'agit d'une étude européenne multi centrique, prévue sur 3 ans pour surveiller la résistance aux antibiotiques des différents PCR-ribotypes. Cette enquête fait suite au lancement de la fidaxomicine et est financé par Astellas Pharma. Le laboratoire de l'hôpital Saint Antoine a envoyé 25 souches de *C. difficile* à Leeds afin de déterminer la sensibilité des souches de *C. difficile* vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques dont la fidaxomicine.

4. Sensibilité du codage CIM-10 pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* : une étude multicentrique.

Barbut F., B. Coignard, L. Cavalie, D. Petiot, L. Landraud, Y. Gendreike, F. Girard-Pipau, H. Jean Pierre, M. Lehmann, A. Le Monnier, B. Jourdan, G. Birgand, JC. Buzzi, L. Souply, G. Frey, N. Khanfer, A. Bestion, F. Mory, H. Tronel, L. Lemée, L. Froment, C. Eckert et H. Marchandin.

(RICAI 2012, Poster 397, publié dans Emerg. Infect. Dis. 2012)

Contexte : Le codage des ICD par la Classification Internationale des Maladies (CIM-10) est une méthode de surveillance intéressante pour suivre les tendances évolutives des infections à *Clostridium difficile* (ICD). Une étude rétrospective monocentrique a précédemment montré que la sensibilité du codage s'améliorait avec le temps, passant de 26% (2000-2005) à 39% (2006-2010) (Jones *et al.*, EID, 2012).

Objectifs : Evaluer et comparer dans plusieurs centres la sensibilité de la surveillance des ICD basée sur le codage par la CIM-10 par rapport à une surveillance réalisée à partir des données du laboratoire.

Méthodes : 10 centres hospitaliers (8 CHU et 2 CHG) ont participé à cette étude rétrospective (année 2010). Chaque centre a fourni ses données générales d'activité (nombre de journées d'hospitalisations (JH) et d'admissions, nombre de recherches de *C. difficile*), sa stratégie diagnostique des ICD utilisée au laboratoire, le nombre de séjours (hospitalisations complètes) mentionnant une ICD (code A04.7) en diagnostic principal ou associé (données issues des DIM) et le nombre d'ICD diagnostiquée au laboratoire. Les compte-rendus d'hospitalisation (CRH) des patients pour lesquels le codage et les résultats microbiologiques étaient discordants (CIM10+/Bact- ou CIM10-/Bact +) ont été relus pour étudier les discordances.

Résultats : Selon les données microbiologiques, l'incidence des ICD variait de 1,78 à 7,68 cas pour 10000 JH (médiane 4,55, IQR= 2,98-6,24). La médiane de sensibilité du codage par le PMSI était 54,05 % (IQR: 43,6%-66,7%). La densité de prescription variait de 4,5 à 10,8 recherches de *C. difficile* pour 10000 JH et était corrélée à l'incidence ($R^2=0.75$). La fréquence avec laquelle l'ICD était mentionnée dans le CRH des cas Bact+/CIM- variait de 32% à 65% (défaut de codage). Sur les 106 dossiers CIM10+/Bact-, le codage était majoritairement lié à une erreur d'interprétation des résultats (souche non toxigène).

Conclusion : La sensibilité du codage des ICD est inférieure à celle retrouvée dans les études nord-américaines (71% à 78%). L'extrapolation de ces résultats aux 8033 séjours codés A04.7 dans la base de données nationale PMSI 2010 permet d'estimer à environ 14560 le nombre total de cas d'ICD hospitalisées en France.

5. Augmentation des séjours hospitaliers avec infection à *Clostridium difficile*, France, 2002-2010 : une analyse des données nationales PMSI

Coignard B., R. Mas, J. Lambert, **F. Barbut**

(RICAI 2012, Discussion- Poster 85)

Depuis l'émergence du clone 027 en 2006, les infections à *Clostridium difficile* (ICD) font l'objet d'une surveillance via le signalement des cas groupés ou sévères à l'hôpital, un centre national de référence et une étude nationale d'incidence (ICD-Raisin, 2009). L'analyse de la base nationale PMSI (court-séjour) a permis de compléter ces données.

Ont été retenus les séjours hospitaliers ≥ 24 h avec une ICD codée (A04.7) en diagnostic principal ou associé (SH-ICD); les réhospitalisations avec ICD dans un délai de 2002 à 2010, 38486 SH-ICD étaient recensés dans 1145 établissements de santé (ES). L'âge médian (74 ans) et le sex-ratio H/F (0,75) des patients était stable; 5191 (13,5%) SH-ICD conduisaient à un décès. De 2002 à 2005, l'incidence annuelle des SH-ICD était stable (3,4 à 4,1 pour 100000 habitants) puis augmentait jusqu'à 12,4 en 2010 (+25%/an de 2005 à 2010). De 2002 à 2010, le nombre d'ES avec ≥ 1 SH-ICD augmentait de 358 à 756. L'incidence des SH-ICD augmentait de 0,5 à 1,9 chez les PMSI permet de suivre l'évolution de l'incidence des ICD. L'augmentation observée peut s'expliquer par la diffusion de clones épidémiques, mais aussi une amélioration du codage, une sensibilisation accrue des cliniciens et une meilleure sensibilité des tests diagnostiques. Si les données de 2009 sont cohérentes avec celles de l'étude ICD-Raisin, l'augmentation persiste en 2010 en l'absence d'épidémies majeures et justifie un rappel des recommandations de prévention.

4. ALERTES

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 fait l'objet d'une déclaration par fax à l'InVS. En outre, des contacts téléphoniques ou par courrier électronique ont lieu régulièrement entre l'InVS et le CNR 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.

Clostridium difficile (Laboratoire associé)

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (ARS et C-CLIN) des épidémies et des cas sévères d'infections (*cf* 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 expert de leur région 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 l'InVS. De plus chaque responsable des C-

CLIN a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

L'année 2012 a été marquée par le suivi de l'épidémie d'infections à *C. difficile* de PCR ribotype 027 dans la région Nord Pas-de-Calais et par sa dissémination limitée dans d'autres régions de France. Les souches de PCR-ribotype 078/126 ainsi que les PCR-ribotypes fréquents en France font également l'objet d'un suivi.

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

5.1. ENSEIGNEMENTS

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme

Cours (M. Popoff)

Cours "Le botulisme" dans le cadre du DU Toxine botulique organisé par S. Lorenzo, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, 21 mars 2012.

Cours "Botulisme" dans le cadre du DU Master 2 Pro "Risques sanitaires NRBC", organisé par le Prof. JD Cavallo, Hôpital du Val de Grâce, Paris 26 septembre 2012.

Cours Master M2 "Interactions toxiques dans les écosystèmes et biotechnologies liées aux toxines" du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris (18 octobre 2012)

Interactions toxines bactériennes-cellules intestinales.

Clostridium neurotoxigènes et leurs toxines, propriétés, activités et méthodes de détection

Cours "Mécanismes moléculaires de l'action des exotoxines bactériennes" Master M2 "Ecologie microbienne, Pathologie des microorganismes et Anti-infectieux" Faculté de Pharmacie Paris XI, Chatenay Malabry, (2 octobre 2012).

Laboratoire associé

F. Barbut

Master 2, semestres P5, P6, P7, Spécialité Microbiologie (Paris VI)

DIU « Physiopathologie et thérapeutique des maladies infectieuses » (Paris VI)

DU « Hygiène Hospitalière, Prévention et Lutte contre les Infections Nosocomiales » (Université de Picardie Jules Verne)

DU « Techniques de biologie moléculaire applicables au diagnostic médical » (Paris VI)

Cours assurés à l'**IFTAB**

DU Réanimation en Pathologie Infectieuse (DURPI) Bichat Claude Bernard

C. Eckert

Master 1, UE de Microbiologie 1 M1 Santé, DCEM1 (Paris VI)

Master 2 IMVI, Spécialité Microbiologie, Module épidémiologie (Paris V, VI, VII)

DES (Faculté de Pharmacie, Paris V)

DESC « Pathologie infectieuse et tropicale » Séminaire n°4 – module 7 : Infections associées aux soins

DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière (Paris V, VI, VII)

5.2. STAGIAIRES

CNR/Unité BAT

- Deneve-Larrazet Cécile, 05/01/2009 au 28/12/2012 : post-doc "Étude de la régulation de la synthèse de toxine tétanique chez *C. tetani*"
- Varela-Chavez Carolina, 06/04/2010 au 05/08/2013 : post-doc "Caractérisation de la toxine de *Clostridium sordellii*"
- Connan Chloé, 02/11/2010 au 31/10/2013 : thèse sur « Caractérisation de la voie d'entrée intestinale des toxines botuliques"
- Refes Yacine 1/10/2012 au 07/2013 : étudiant M2 Mécanisme d'action des toxines formant des pores: toxine epsilon de *C. perfringens* et toxine alpha de *C. septicum*.
- Morineaux Valérie thèse

Laboratoire associé

- Maéva Chioukh, mémoire de fin d'étude, Institut de formation de technicien de laboratoire
- Aké Grace Sika, BTS bioanalyse et contrôle, ESTBA
- Laëtitia Ramé, Master QUESS (Qualité Environnement Sécurité Sanitaire), UPMC
- Arminé Tarloin, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine
- Ophélie Said, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine
- Nolwenn Pocard, externe en pharmacie, Hôpital Saint Antoine

5.3. DIFFUSION AUX PROFESSIONNELS DE SANTE

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/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-bacteries-anaerobies-et-du-botulisme/activites-de-service>

- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à l'InVS et aux C-CLIN. Ce site permet à chaque laboratoire expert ou 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 l'InVS: <http://www.invs.sante.fr/surveillance/icd/index.htm> (laboratoire associé)
- Collaboration à la plaquette d'information destinée au patient (<http://www.cclinparisnord.org/Usagers/PlaquettePATIENT.pdf>) [2006] (laboratoire associé)
- 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://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/) [2006] (laboratoire associé)

5.4. ACTIVITES DE CONSEIL

Le CNR est régulièrement contacté par téléphone par des cliniciens, biologistes de laboratoires hospitaliers ou de ville sur le diagnostic bactériologique des affections à anaérobies, conduite à tenir, traitement notamment choix des antibiotiques. Egalement, le CNR est régulièrement consulté par des vétérinaires, biologistes de laboratoires vétérinaires, industriels de l'agro-alimentaire sur les risques d'affections à bactéries anaérobies, le diagnostic et la conduite à tenir des face à ces affections et plus particulièrement botulisme et entérotoxémies.

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition des numéros de téléphone (01 40 01 13 88 / 01 40 01 14 63) et des adresses email (frederic.barbut@sat.aphp.fr, catherine.eckert@sat.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.

5.5. ACTIVITÉ D'EXPERTISES.

CNR

Réunions

Participation à la réunion sur le programme NRBC, CEA Saclay 18 décembre 2012

Expertises

Des activités d'expertise sont menées en collaboration avec le Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, iBiTecs, CEA Saclay, sur la caractérisation d'anticorps monoclonaux neutralisants de la neurotoxine botulique.

Laboratoire associé

F. Barbut ou C. Eckert ont été régulièrement en contact avec B. Coignard et J.-M. Thiolet (InVS) pour l'interprétation de situations épidémiologiques. Par ailleurs le dossier thématique concernant les infections à *C. difficile* sur le site de l'InVS est régulièrement réactualisé en collaboration avec J.-M. Thiolet.

1. Une année de diagnostic des infections à *Clostridium difficile* en milieu hospitalier selon un algorithme en 2 temps

Lalande V., G. Deniziaut, L. Surgers, C. Jost et F. Barbut

(RICAI 2012 Poster P403)

Actuellement, le diagnostic bactériologique des infections à *Clostridium difficile* (ICD) a pour objectif principal d'obtenir un résultat le jour du prélèvement pour une prise en charge optimale des patients infectés. Des algorithmes en 2 (voire 3) étapes sont préconisés selon les recommandations américaines et européennes: la première étape consistant à « screener » les selles à l'aide d'une méthode ayant une excellente valeur prédictive négative (VPN) et la seconde étape consistant à tester les échantillons positifs par une méthode spécifique de mise en évidence des toxines. Nous avons évalué cette stratégie appliquée en routine dans un laboratoire hospitalier.

Méthodes : Pendant 12 mois, nous avons comparé un algorithme diagnostic en deux temps aux techniques de référence. Le screening des selles diarrhéiques était réalisé par une technique unitaire immuno-enzymatique détectant la glutamate déshydrogénase (GDH) (C. DIFF Quik chek®, Alere), suivi en cas de résultat positif par une technique d'amplification de la toxine A (Illumigène®, Méridian). Deux méthodes de référence ont été réalisées: la recherche de toxine libre par l'étude de l'effet cytopathogène d'un filtrat de selles (ECP) et la culture toxigénique (CT) associant la culture sur milieu sélectif et la détermination du pouvoir toxigène des souches. En cas de discordance entre la primoculture et le résultat de la GDH, une culture enrichie était réalisée.

Résultats : 2346 selles diarrhéiques consécutives et non répétitives ont été testées selon les

deux stratégies. L'ECP et la CT étaient positifs dans respectivement, 117 cas (5%) et 302 cas (12.9%) avec 66% des souches de CD toxigènes. La GDH était positive pour 302 échantillons (12.9%), parmi eux 169 étaient positifs par amplification de la toxine A (7,2%), sept résultats étaient invalides et 20 tests faussement négatifs. Pour onze échantillons positifs en culture, le test GDH était négatif, avec dans 9 cas des souches toxigènes. Comparées à la CT, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives négatives et positives du test GDH et de l'algorithme en 2 temps étaient respectivement de 96% et 83%, de 99% et 100%, de valeur prédictive négative de 99% et 98% et de 96% et 98%.

Conclusion : Comme rapporté dans la littérature, le test GDH a une très bonne VPN (99%) permettant de l'employer comme un test unitaire rapide de screening. Dans notre étude, la stratégie en deux temps a une très bonne VPN (83%) et VPP (100%) permettant une prise en charge rapide des patients présentant une ICD. La sensibilité de la combinaison des deux tests par rapport à la CT est plus faible que dans la littérature. Pour ces cas, la charge bactérienne et la quantité de toxines libres sont faibles, l'interprétation sera faite en fonction des signes cliniques.

2. Un diagnostic rapide permet-il d'améliorer la prise en charge des patients suspects d'infections à *Clostridium difficile* ?

Barbut F., C. Eckert, B. Visseaux, M. Cuingnet, C. Mesquita, N. Pradier, L. Surgers, A. Thiriez, N. Ait-Ammar, A. Aifaoui, E. Grandsire, et V. Lalande

(ECCMID 2012, Poster P2279, ICCAC 2012, Poster D-154, soumis à Clinical Microbiology and Infection)

Contexte : Un diagnostic rapide et sensible des infections à *C. difficile* (ICD) est essentiel pour la prise en charge du patient et la mise en place des mesures de prévention. L'objectif de cette étude était de comparer l'impact de 3 stratégies diagnostiques sur la prise en charge des patients.

Méthodes: Une étude prospective comparant 3 périodes de 3 mois a été réalisée à l'hôpital universitaire Saint Antoine (750 lits): P1 (diagnostic basé sur le test de cytotoxicité des selles et la culture toxigénique), P2 (diagnostic basé sur l'utilisation du Xpert *C. difficile*, Cepheid) et P3 (diagnostic basé sur un algorithme en 2 temps : détection de la GDH puis Illumigene *C. difficile*, Meridian). La qualité de prise en charge d'un patient a été évaluée par le délai de validation des résultats des coprocultures, le délai de prescription d'un traitement spécifique, le délai de mise en place de mesures d'isolement (pour les patients positifs), la fréquence d'un traitement empirique (pour les patients négatifs)

Résultats : 1122 selles (P1 n=359, P2 n=374, P3 n=389) ont été étudiées : 36 (10,0%), 47 (12,6%) et 49 (12,5%) étaient positives respectivement pendant les périodes P1, P2 et P3. Le temps de restitution d'un résultat positif était respectivement de 75±62, 15±15 et 31,4±38,7 heures pendant les périodes P1, P2 et P3 (p<0,001) et de 85±23, 15±17 et 17±23 heures lorsque le résultat était négatif (p<0,001).

La fréquence des selles redondantes dans les 7 jours était plus faible durant P2 et P3 comparée à P1 (13,3% et 15,3% vs 21,8%, p=0.01).

Les patients atteints d'ICD étaient traités plus précocement durant P2 et P3 comparé à P1 (0,5 ± 0,5 jours, 1,0±1,8 d vs 2,0±1,7 jour, p<0,001). La durée d'hospitalisation après le diagnostic d'ICD était plus longue en P1 comparée à P2 et P3 (médiane : 10,5 jours vs 8 j and 9 j, p=0,13). Chez les patients sans ICD, le nombre de traitement empirique diminuait de 15,8% pendant P1 à 7,4% en P2 et 5,6% en P3 (p=0,0001). Le nombre de jours de traitement injustifié était respectivement de 228, 65 et 71 en P1, P2, et P3.

Conclusion : Un diagnostic rapide d'ICD améliore la prise en charge des patients.

6. ACTIVITES DE RECHERCHE

6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN RELATION AVEC LE CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME

Développement d'un système de typage de type MLST chez *Clostridium butyricum*

Des souches de *Clostridium butyricum* sont régulièrement isolées de selles de grands prématurés atteints d'entérococolite ulcéro-nécrosante (ECUN) et sont suspectées d'être responsables de la survenue de cette pathologie qui est souvent une urgence chirurgicale. Il serait intéressant de pouvoir comparer des souches de cette espèce isolées d'enfants atteints d'ECUN et d'enfants sains. Actuellement aucun système de typage n'existe. La technique MLST (Multilocus Sequence Typing) outre son intérêt dans les études de génétique de population permet également de disposer d'un outil de typage performant.

Des couples d'amorces ont été dessinées permettant d'amplifier des fragments internes de plusieurs gènes de ménage chez *Clostridium butyricum* ainsi que chez les espèces apparentées *C. beijerinckii* et « *C. neonatale* ». Sept gènes candidats ont déjà été identifiés et les premiers résultats montrent une certaine variabilité de séquence qui devrait permettre une bonne discrimination des souches entre elles.

6.2. ACTIVITES DE RECHERCHE DU LABORATOIRE ASSOCIE

Le laboratoire a été labellisé **Groupe de Recherche Clinique-UPMC** en janvier 2012 pour son projet **Epidiff** (Infections à *Clostridium difficile* (ICD): diagnostic, épidémiologie clinique et réponse de l'hôte).

1. *Clostridium difficile* dans les crudités, France

Eckert C., B. Burghoffer, F. Barbut

(ICDS 2012, Poster P102, ICCAC 2012 Poster K-925, accepté J. Med. Microbiol.)

Contexte: Plusieurs publications ont rapporté ces dernières années la présence de *C. difficile* dans l'alimentation (légumes, viandes, crustacées). Une première étude réalisée en France en 2007-2008 avait porté sur de la viande hachée et avait montré un taux de contamination par *C. difficile* de la viande hachée de bœuf de 1,9% (Boutier *et al*, EID, 2010). La prévalence était faible comparée à celle retrouvée dans d'autres pays. L'objectif de cette étude était d'estimer la prévalence de la contamination par *C. difficile* dans les crudités.

Méthodes: 104 salades prêtes à l'emploi et crudités achetées entre septembre 2010 et mars 2011 dans 5 supermarchés de Paris et de la région parisienne ont été analysées. 20 g de chaque aliment ont été écrasés et cultivés dans 75 ml de BHI pré-réduit supplémenté avec de la céfoxitine, de la cyclosérine et du taurocholate. Après 72 h d'incubation en anaérobiose, des dilutions sériées du bouillon BHI ont été ensemencées sur TCCA (Bouillon Cœur cervelle supplémenté avec 5% de sang de cheval défibriné, 0,1% de taurocholate, de la cyclosérine à

250 µg/ml, de la céfoxitine à 10 µg/ml). Le bouillon BHI a également été ensemencé sur TCCA après un choc alcoolique. Les souches isolées ont été identifiées par des méthodes conventionnelles (coloration de Gram, odeur, galeries rapid ID32A, bioMérieux) et caractérisées par PCR-ribotypage et par des PCR pour la détection de *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA* et *cdtB*; la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par diffusion en milieu gélosée.

Résultats: Une souche toxigène de *C. difficile* a été retrouvée dans 3 échantillons (2.9%): dans 2 salades prêtes à l'emploi (1 cœur de laitue et de la mâche) et dans des germes de petits pois. Ces 3 souches appartenaient aux PCR-ribotypes 001, 014/020/077 et non déterminé et étaient négatives pour la toxine binaire. Elles étaient sensibles à la vancomycine et au métronidazole.

Conclusion: La prévalence de la contamination dans les crudités prêtes à l'emploi est plus faible que celle rapportée dans une précédente étude de Bakri et al. (EID, 2009) (7.5%). Deux des PCR-ribotypes isolés dans cette étude (001 et 014/020/077) sont les principaux PCR-ribotypes responsable d'infection à *C. difficile* chez l'homme. D'autres études sont nécessaires pour investiguer le rôle de la nourriture dans la colonisation ou l'infection à *C. difficile* chez l'homme.

2. Participation au comité de pilotage de SERODIFF

Investigateur principal : M. Greder, Versailles, responsable scientifique A. Le Monnier, Paris

F. Barbut fait partie du comité de pilotage.

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 dont l'hôpital Saint Antoine) démarrera en 2013 et est financé par Sanofi Pasteur. Il prévoit d'inclure 300 patients et 600 témoins. Le CNR sera chargé de typer les souches de *C. difficile*. L'hôpital Saint Antoine participe à ce projet et est également en charge de constituer une coprothèque.

6.3. ACTIVITES DE RECHERCHE DE L'UNITE BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES

Implication de systèmes à deux composants dans la régulation de la toxinogénèse chez *C. botulinum* A (Travail de Master2 et thèse, C. Connan) (PlosOne 2012, 7: e41848)

Nous avons précédemment montré que la synthèse de la neurotoxine chez *C. botulinum* était hautement régulée et qu'un gène (*botR/A*) situé dans le locus botulique codant pour un facteur sigma alternatif contrôlait positivement la transcription du gène de la neurotoxine. L'analyse du génome de la souche Hall de *C. botulinum* type A a révélé la présence de 30 paires de gènes prédits pour coder des systèmes de régulation à deux composants et 9 gènes orphelins potentiellement régulateurs. Un total de 34 souches mutantes par répression de gène régulateur à l'aide d'un système d'ARN anti-sens, a été obtenu. Deux mutants de systèmes à deux composants ont montré une croissance plus rapide que la souche sauvage accompagnée d'une lyse rapide des bactéries et une production réduite de toxine. Ces deux systèmes à deux composants ont probablement des effets pléiotropes impliquant le contrôle de la synthèse de paroi bactérienne. Trois autres systèmes à deux composants régulent négativement la synthèse de toxine botulique indépendamment de BotR/A. La synthèse de toxine botulique A est sous le contrôle d'un réseau complexe de régulation comprenant au moins 3 systèmes à deux composants.

Passage de la toxine botulique A à travers la barrière intestinale (Travail de thèse de C. Connan, financement DGA et programme Européen FP7) (Plos Pathogens 2012, 8: e1002583)

Le passage de la barrière intestinale constitue la première étape de l'intoxication botulique par voie alimentaire, qui est encore peu connue. Nous avons, dans un premier temps, étudié le trafic de la neurotoxine botulique A dans un modèle de monocouche de cellules intestinales et nous avons montré que le transport de la toxine botulique A consistait en un mécanisme de transcytose dépendante de récepteurs spécifiques (gangliosides GT1b, GD1b et la protéine SV2) qui sont les récepteurs de cette toxine sur les cellules neuronales. Il semble que les récepteurs pour la toxine botulique A soient les mêmes sur les cellules neuronales et sur les cellules intestinales.

Le passage de la barrière intestinale a été analysé dans un modèle semi *in vivo* en utilisant des anses intestinales de souris ligaturées à chaque extrémité et maintenues en survie dans du milieu de Krebs-Ringer oxygéné. La toxine botulique A a été injectée dans la lumière intestinale et les contractions musculaires longitudinales en réponse à des stimulations électriques ont été enregistrées à l'aide d'un tensiomètre. L'administration de toxine botulique A dans l'anse intestinale s'accompagne d'une diminution marquée des contractions musculaires spontanées et d'une abolition quasi-complète des contractions évoquées électriquement. L'addition de carbachol, un activateur des récepteurs acétylcholine, après l'action de la toxine botulique A induit des contractions musculaires indiquant que la toxine botulique injectée dans une anse intestinale est capable de traverser la barrière intestinale et de bloquer les terminaisons cholinergiques des motoneurons intestinaux. Les effets paralysants de la toxine botulique sont significativement diminués lorsque la toxine est préincubée avec le domaine recombinant L4 de la protéine SV2C qui a été montré comme étant le site de liaison à la toxine botulique A. Ce résultat supporte que SV2 ou une protéine apparentée jouerait le rôle de récepteur pour la toxine botulique au niveau de la barrière intestinale.

Le passage de la toxine botulique A à travers la barrière intestinale a été suivi en utilisant le domaine Hc de la toxine, qui correspond au domaine de liaison au récepteur, marqué avec une molécule fluorescente (Hc-Cy3) et le modèle d'anse intestinale de souris

semi *in-vivo*. Hc-Cy3 a été injecté dans la lumière d'anses intestinales et à différents temps d'incubation, les anses ont été préparées pour l'observation en microscopie confocale. Dans ces conditions, Hc-Cy3 reconnaît préférentiellement certaines cellules des cryptes intestinales au niveau de la muqueuse intestinale. Ces cellules sont des cellules neuroendocrines (co-marquage avec la chromogramine, marqueur de cellules neuroendocrines, et plus spécifiquement avec la sérotonine), qui sont distinctes des cellules de Paneth (absence de co-marquage avec la lectine UEA-1). Dans le modèle de monocouches de cellules polarisées cultivées sur filtre, la lignée de cellules neuroendocrines STC-1 permet le passage de la toxine botulique A, cependant avec une moindre efficacité que la lignée mICCL2, qui est aussi une lignée neuroendocrine de cellules de cryptes intestinales mais dans un stade moins différencié que les STC-1. La préincubation de Hc-Cy3 avec le domaine L4 de SV2C prévient l'entrée de Hc-Cy3 dans les 2 types cellulaires, soutenant que SV2 est aussi impliqué dans l'entrée de la toxine dans les cellules intestinales. Nous avons également montré que ces cellules contiennent une protéine réactive aux anticorps anti-SV2.

Dans le modèle d'anse intestinale semi *in vivo*, Hc-Cy3 reconnaît les extrémités des neurones cholinergiques du plexus sous muqueux et myentérique ainsi que dans la musculature. Ceci est en accord avec le fait que la toxine botulique A bloque la sécrétion d'acétylcholine au niveau des motoneurones. Mais, Hc-Cy3 marque aussi d'autres types de neurones dans la sous-muqueuse intestinale comme des neurones à sérotonine, glutamate ou VIP, bien qu'à une moindre fréquence que les neurones cholinergiques. Les effets de la toxine botulique sur ce type de neurones ne sont pas connus, ils pourraient être utilisés par la toxine pour son transport vers les motoneurones cibles dans le reste de l'organisme.

Interaction des toxines clostridiales de grande taille avec la membrane cellulaire (financement NRBC/CEA, travail de C. Varela-Chavez, post doc)

La toxine LT de *C. sordellii* appartient comme les toxines A et B de *C. difficile* au groupe des toxines clostridiennes de grande taille qui inactivent les GTPases de la famille Rho/Ras par glucosylation et qui ont un rôle majeur dans les pathologies générées par ces bactéries. Nous avons montré au préalable que la toxine LT reconnaît spécifiquement la phosphatidylserine (PS) et que son activité enzymatique était supérieure d'un facteur environ 100 quand son substrat, Rac ou Ras, était ancré dans des membranes lipidiques enrichies en PS par rapport au substrat en solution (J. Biol. Chem. 2004, 279: 49876-49882). Le site de liaison à la PS est localisé dans le domaine enzymatique de la toxine (acides aminés N-terminaux 1-543) et que les 10 premiers acides aminés étaient importants pour cette liaison. En effet le domaine enzymatique recombinant délété des 11 premiers acides aminés montre une affinité très basse pour la PS. L'objectif de ce travail est de caractériser le site de liaison à la PS sur les toxines clostridiennes de grande taille et d'analyser le rôle de cette liaison à la PS dans l'activité des toxines. Des mutants ont été obtenus dans la partie N-terminale du domaine enzymatique de LT. Ces domaines ainsi que le domaine enzymatique sauvage sont obtenus en tant que protéines recombinantes et purifiées. Leur affinité de liaison à la PS est mesurée par ELISA et par "surface plasmon resonance" (Biacore). Ainsi on a pu déterminer les constantes d'affinité de ces domaines, sauvage et mutés, pour la PS. Certains de ces mutants ont perdu en grande partie leur capacité de liaison à la PS. Un test d'électroporation de protéines a été mis au point pour internaliser ces domaines dans des cellules Vero et analyser leurs effets biologiques. Les mutants qui perdent leur liaison à la PS perdent également leur capacité à altérer le cytosquelette d'actine indiquant que la liaison à la PS est une condition indispensable pour l'activité intracellulaire de cette toxine. D'autres mutants sont en cours d'étude ainsi que l'analyse cristallographique du domaine enzymatique de LT avec la PS de façon à définir le site structurel d'interaction avec la PS.

Régulation de la toxinogénèse chez *Clostridium tetani* (financement SANOFI-PASTEUR, C. Deneve post-doc)

L'objectif est de comprendre le système de régulation de la synthèse de toxine tétanique chez *C. tetani* de façon à améliorer la production de toxine tétanique (TeNT) au niveau industriel pour la préparation de vaccin. Le gène de TeNT est précédé d'un gène régulateur (TetR) que nous avons précédemment caractérisé. Ces deux gènes sont localisés sur un plasmide de grande taille chez *C. tetani*. La première partie de ce travail a consisté à mesurer l'expression des gènes *tet* et *tetR* par RT-PCR au cours de la cinétique de croissance de souches de *C. tetani* hautement et faiblement toxinogènes et dans différents milieux. Le génome de *C. tetani* contient une vingtaine de gènes régulateurs potentiels. L'analyse de ces gènes régulateurs sur la synthèse de TeNT est en cours par construction de souches mutantes de *C. tetani* chez lesquelles un plasmide recombinant portant un système d'expression d'ARN antisens pour chacun des gènes d'intérêt a été introduit.

Activité de la formation de pores par la toxine epsilon de *C. perfringens* et autres toxines apparentées (financement IP, S. Pauillac)

La toxine epsilon de *C. perfringens* (ETX) est une toxine très active qui agit en formant des pores dans les membranes de cellules cibles. ETX est une des toxines qui a la plus puissante activité létale après les neurotoxines botuliques. De ce fait, elle est considérée comme une arme biologique redoutable, et elle est l'agent d'entérotoxémie foudroyante chez les animaux, principalement chez les ovins. Nous avons montré que ETX agit en formant des pores dans les membranes des cellules cibles induisant leur perméabilisation aux anions et cations monovalents suivie d'une entrée retardée de calcium (J Biol Chem 2001, 276: 15736-15740). Une étude est en cours pour analyser les changements ioniques (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^-) dans les cellules traitées par ETX ou des mutants dans le domaine du pore à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques de chaque ion et en temps réel. L'objectif est de comprendre quels sont les premiers événements générés par ETX induisant la cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la mort par nécrose.

Programme européen sur les anticorps neutralisants des toxines botulique A, B et E (2010-2014) 7 partenaires dont le CRSSA comme coordinateur (C. Mazuet, M. Popoff)

L'objectif est l'obtention d'anticorps recombinants neutralisants des toxines botuliques A, B et E. Pour cela, des macaques sont immunisés à l'aide d'antigènes recombinants et des bibliothèques de fragments d'anticorps (scFv) sont établies et testées par la technique du phage display. Les anticorps ayant une affinité élevée pour chacune des toxines botuliques sont ensuite testés pour leur activité neutralisante.

Notre rôle consiste dans la préparation et la purification d'antigènes recombinants (domaine Hc et chaîne légère) des principaux sous-types des toxines botuliques A, B et E, la préparation et la calibration des sous-types des toxines botuliques A, B et E pour les tests de neutralisation, les essais de neutralisation *in vivo* chez la souris, le génotypage et la caractérisation génétique d'une collection de souches de *C. botulinum* A, B et E incluant les différents sous-types.

7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

7.1. CNR ET UNITE DES BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES

7.1.1. Publications dans des revues nationales

Bouvet P, Gregory A, Bellon L, Marmouset C. 2012. Fetal *Leptotrichia goodfellowii* bacteremia. **Med Mal Infect** 42:174-175.

7.1.2. Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- Hoarau G, Pelloux I, Gayot A, Wroblewski I, Popoff MR, Mazuet C, Maurin M, Croizé J. Two cases of infant botulism in Grenoble, France: no honey for infants. **Eur J Pediatr** 2012, 171: 589-591.
- Kaiser E., Böhm N., Ernst K., Langer S., Schwan C., Aktories K., Popoff M., Fischer G., Barth H. FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium botulinum* C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. **Cell. Microbiol.** 2012, doi: 10.1111
- Couesnon A., Molgo J., Connan C., Popoff M. R. Preferential entry of *botulinum* neurotoxin A Hc domain through intestinal crypt cells and targeting to cholinergic neurons of the mouse intestine. **Plos Pathogens** 2012, 8: e1002583
- Seyer A., Fenaille F., Féraudet-Tarisse C., Volland H., Popoff MR, Tabet JC, Junot C., Becher F. Rapid quantification of clostridial epsilon toxin in complex food and biological matrixes by immunopurification and ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Chem** 2012, 84:5103-5109.
- Türkcan S, Masson JB, Casanova D, Mialon G, Gacoin T, Boilot JP, Popoff MR, Alexandrou A. Observing the confinement potential of bacterial pore-forming toxin receptors inside rafts with nonblinking Eu(3+)-doped oxide nanoparticles. **Biophys J.** 2012, 102: 2299-2308.
- Connan C, Brueggemann H, Mazuet C, Raffestin S, Cayet N, Popoff MR. Two component systems are involved in the regulation of *botulinum* neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A strain Hall. **PlosOne** 2012, 7: e41848
- Bouvet P, K'ouas G, Le Coustumier A, Popoff MR. *Clostridium celerecrescens*, often misidentified as "*Clostridium clostridiforme*" group, is involved in rare human infection cases. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2012, 74: 299-302.
- Mazuet C, Ezan E, Volland H, Popoff MR, Becher F. Two outbreaks of type A botulism in France, toxin detection in patients' serum by mass spectrometry. **J. Clin. Microbiol.** 2012, 50: 4091-4094.
- Bezrukov SM, Liu X, Karginov VA, Wein AN, Leppla SH, Popoff MR, Barth H,

Nestorovich EM. Interactions of high-affinity cationic blockers with translocation pores of *B. anthracis*, *C. botulinum*, and *C. perfringens* binary toxins. **Biophys. J.** 2012, 103: 1208-1217.

- Harper CB, Popoff MR, McCluskey A, Robinson PJ, Meunier FA. Targeting membrane trafficking in infection prophylaxis: dynamin inhibitors. **Trends Cell Biol** 2012, doi: 10.1371
- Wigelsworth DJ, Ruthel G, Schnell L, Herrlich P, Blonder J, Veenstra TD, Carman RJ, Wilkins TD, Van Nhieu GT, Pauillac S, Gibert M, Sauvonnnet N, Stiles BG, Popoff MR, Barth H. CD" promotes intoxication by the clostridial Iota-family toxins. **PlosOne** 2012, 7: e51356.
- Plassart C, Mauvais F, Heurte J, Sautereau J, Legeay C, Bouvet P. 2012. First case of intra-abdominal infection with *Clostridium disporicum*. **Anaerobe** **19**:77-78.

7.1.3. Chapitres de livre

Popoff M. R., Mazuet C. *Clostridium botulinum*: history, strain and neurotoxin diversity. In *Clostridium botulinum*, A spore forming organism and a challenge to food safety. Series: Advances in food safety and food microbiology. Christine Rasetti-Escargueil and Suzanne Surman-Lee (Eds), Nova Science Publishers, Inc. New York 2012, 1-36

7.1.4. Congrès, workshops

- 2° Séminaire du Département de Microbiologie IRBA (Institut de Recherche de Biologie des Armées) Val de Grâce, Paris, 15-16 octobre 2012: conférence
M. Popoff "Passage de la toxine botulique à travers la barrière intestinale"
- Toxins2012, Miami USA 5-7 décembre 2012 organisé par G. Schiavo, M. Hallet, J Jankovic, MP conférencier invité: " Trafficking of botulinum neurotoxin A in the intestinal mucosa"
- 20° Rencontres en Toxinologie (RT20) Société Française d'Etudes en Toxinologie (SFET), Institut Pasteur, Paris, 10-11 décembre 2012
MP co-organisés
conférence sur invitation "Evolution of toxin genes in Clostridium"
chairman de session

7.1.5. Séminaire

M. Popoff - "Botulisme, Intoxications alimentaires à *Clostridium perfringens*", Centre de Recherche et d'Etude pour l'Alimentation, Paris 14°, 17 octobre 2012.

7.2. PUBLICATIONS DU LABORATOIRE ASSOCIÉ

7.2.1. Publications dans des revues de langue française

Barbut F., V. Lalande, L. Beaugerie et C. Eckert. Infections digestives à *Clostridium difficile*. Mini-revue Hépatogastro, accepté.

Barbut F., Meynard JL, E. Maury, L. Surgers, C. Eckert. Infections digestives à *C. difficile* : diagnostic et traitement. Infectiologie en réanimation, Springer eds, 2012, 441-460

7.2.2. Publications dans des revues internationales

Eckert C., B. Coignard, M. Hebert, C. Tarnaud, C. Tessier, A. Lemire, B. Burghoffer, D. Noel, F. Barbut. On behalf of the ICD-Raisin Working Group. Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: The ICD-RAISIN 2009 national survey. Médecine et Maladies infectieuses, 2013 accepté.

Debast SB, Bauer MP, Sanders IM, Wilcox MH, Kuijper EJ; **on behalf of the ECDIS Study Group.** Antimicrobial activity of LFF571 and three treatment agents against *Clostridium difficile* isolates collected for a pan-European survey in 2008: clinical and therapeutic implications. J Antimicrob Chemother. 2013 Feb 18.

Eckert C., B. Burghoffer, V. Lalande, et F. Barbut. Evaluation of the chromogenic agar chromID(R) *C. difficile*. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):1002-4.

Fitzpatrick F, **F. Barbut.** Breaking the cycle of recurrent *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Infect. 2012 Dec;18 Suppl 6:2-4.

Barbut F, V. Lalande, C. Eckert. New molecular methods for the diagnosis of *Clostridium difficile* infections. Drugs Today (Barc). 2012 Oct;48(10):673-84.

Antunes A, E. Camiade, M. Monot, E. Courtois, **F. Barbut, NV. Sernova, DA. Rodionov, I. Martin-Verstraete, B. Dupuy.** Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. Nucleic Acids Res. 2012 Nov;40(21):10701-18.

Barbut F, M. Rupnik. Editorial commentary: 027, 078, and others: going beyond the numbers (and away from the hypervirulence). Clin Infect Dis. 2012 Dec;55(12):1669-72.

Jones G., N. Taright, PY Boelle, J. Marty, V. Lalande, C. Eckert, F. Barbut. Accuracy of ICD-10 codes for surveillance of *Clostridium difficile* infections, France. Emerg Infect Dis. 2012 Jun;18(6):979-81.

Barbut F, Yezli S, Otter JA. Activity *in vitro* of hydrogen peroxide vapour against *Clostridium difficile* spores. J Hosp Infect. 2012 Jan;80(1):85-7.

7.2.3. Communications nationales

Barbut F., B. Coignard, L. Cavalié, D. Petiot, L. Landraud, Y. Gendreike, F. Girard-Pipau, H. Jean Pierre, M. Lehmann, A. le Monnier, B. Jourdan, G. Birgand, J.C. Buzzi, L. Souply, G. Frey, N. Khanafer, A. Bestion, F. Mory, H. Tronel, L. Lemée, L. Froment, C. Eckert, H. Marchandin. Sensibilité du codage CIM-10 pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* : une étude multicentrique. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Poster 397.

Eckert C., O. Said, N. Poccardi, C. Rambaud, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut. Évaluation des performances du Vidas[®] *C. difficile* GDH et du C. diff Quik Chek Complete[®] en comparaison avec la culture de *Clostridium difficile*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Poster 399.

Lalande V., L. Barrault, C. Eckert, F. Barbut. Évaluation d'un nouveau test d'amplification FOCUS Simplex[®] *C. difficile* Universal Direct dans le diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD). Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Poster 402.

Lalande V., G. Denizaut, L. Surgers, C. Jost, F. Barbut. Une année de diagnostic des infections à *Clostridium difficile* en milieu hospitalier selon un algorithme en deux temps. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Poster 403.

Coignard B., R. Mas, J. Lambert, F. Barbut. Augmentation des séjours hospitaliers avec infection à *Clostridium difficile*, France, 2002-2010 : une analyse des données nationales PMSI. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Poster 85.

Eckert C. Nouveaux outils diagnostiques, nouvelles stratégies diagnostiques ? Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Communication orale 39.

F. Barbut. Épidémiologie et facteurs de risque des infections à *C. difficile*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse 2012 Communication orale 38.

Eckert C. Nouvelles méthodes et stratégies diagnostiques symposium Astellas « Infections à *Clostridium difficile* : les nouveaux défis ». Communication orale. Journées Nationales d'infectiologie 2012 Tours.

7.2.4. Communications internationales

Eckert C., B. Burghoffer, F. Barbut. *Clostridium difficile* in Ready-to-eat Raw Vegetables, France. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy San Francisco 2012 poster K-925.

Barbut F., C. Eckert, L. Surgers, V. Lalande, pour le GRCn°2 EPIDIFF. Does a Rapid Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection (CDI) Impact on Quality of Patient's Management? 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy San Francisco 2012 poster D-154

Eckert C., C. Rambaud, V. Lalande, F. Barbut. Performances of a New Test to Detect GDH in Stool Samples. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy San Francisco 2012 poster D-157.

Lemire A., C. Tessier, C. Eckert, F. Barbut. Characterization of three new toxinotypes of *Clostridium difficile*. 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Poster P91.

Eckert C., C. Rambaud, V. Lalande, F. Barbut. Detection of glutamate dehydrogenase in stool samples: evaluation of the Immunoquick *C. difficile* GDH assay (PRO-LAB). 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Poster P99.

Eckert C., P. Schaaf, C. Ménard, C. Elias, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut. Evaluation of Vidas® *Clostridium difficile* toxin A&B on colonies 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Poster P100.

Eckert C., P. Schaaf, C. Ménard, C. Elias, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut. Isolation of *Clostridium difficile* in 24 hours with ChromID® *C. difficile* agar, a new chromogenic medium. 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Poster P101.

Eckert C., B. Burghoffer, F. Barbut. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile*, France. 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Poster P102.

Kuijper EJ, SM van Dorp, MPM Hensgens, A Virolainen, E Nagy, P Mastrantonio, K Ivanova, F

Fitzpatrick, **F Barbut**, V Hall, T Eckmanns, C Suetens, MH Wilcox, DW Notermans, on behalf of the **ECDIS-Net participants**. Diagnostics and typing of *Clostridium difficile* infections in Europe. 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Bled, 2012 Communication orale INV9.

Lalande V., L. Surgers, A. Thiriez, N. Ait Amar, A. Aifaoui, E. Grandsire, C. Eckert, F. Barbut. Detection of *Clostridium difficile* in stool by the search for glutamate dehydrogenase, evaluation of a new immunoassay test unit. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. Poster P2263

Barbut F., C. Eckert, B. Visseaux, M. Cuingnet, C. Mesquita, N. Pradier, L. Surgers, A. Thiriez, N. Ait-Ammar, A. Aifaoui, E. Grandsire, V. Lalande. Impact of a rapid diagnosis on the management of patients suspected of *Clostridium difficile* infection. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. Poster P2279

Eckert C., A. Lemire, C. Rambaud, V. Lalande, F. Barbut. Evaluation of RIDA®GENE *Clostridium difficile* and Toxin A/B (R-Biopharm) real-time PCR for diagnosing *Clostridium difficile* infections. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. Poster P2270.

Eckert C., P. Schaaf, C. Ménard, C. Elias, B. Burghoffer, V. Lalande, F. Barbut. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation of *Clostridium difficile*. 22nd

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. For publication only R2623.

Notermans DW, A. Virolainen, E. Nagy, P. Mastrantonio, K. Ivanova, F. Fitzpatrick, **F. Barbut**, V. Hall, A. Kola, C. Suetens, M. Wilcox, E.J. Kuijper for the **ECDIS-net participants**. Enhancing laboratory capacity for *Clostridium difficile* detection in Europe. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. Poster P2286.

Barbut F. Breaking the cycle of recurrent *C. difficile* infections, Astellas Pharma EU symposium. Panel discussion and summary. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, 2012. Communication orale.

7.2.5. Conférences sur invitation

Barbut F. Infections à *Clostridium difficile*: actualités. 40^{ème} Congrès International de la Société de Réanimation de Langue Française 18, 19 et 20 janvier 2012 - CNIT Paris.

Barbut F. - Physiopathologie des infections à *C. difficile* : rôle de l'immunité et nouvelles perspectives thérapeutiques. 6^{èmes} journées du REIVAC. 20 janvier 2012, Paris.

Barbut F. Epidemiology and diagnosis of CDI. 2nd Paris International Conference on Intensive care. Sepsis, 7 juin 2012, Paris.

Barbut F. Infections due to *C. difficile* and other emerging multi drugs resistant bacteria. Journées Internationales Anios, 2 juillet 2012, Versailles.

Barbut F. New trends in *C. difficile* infections. BD NAAT work. 5 juillet 2012, Berne, Suisse.

Barbut F. Epidemiology and updates on *C. difficile* diagnosis. Patient safety. Updates on Infectious diseases and antibiotic use. 15-16 octobre 2012, Abu Dhabi, Emirats Arabes Unis

Barbut F. *C. difficile*: a growing problem. Journées sur les infections à *C. difficile*. 19 octobre 2012, Brno, République Tchèque,

Barbut F. Clinical efficacy, safety and tolerability of *C. difficile*. ACE (awareness of *C. difficile* through education) meeting. 30 novembre-1^{er} décembre 2012. Budapest. Hongrie

Barbut F. CDI: current and future management. ACE (awareness of *C. difficile* through education) meeting. 30 novembre-1^{er} décembre 2012, Budapest, Hongrie.

7.2.6. Autre

Barbut F. Formation sur les anaérobies. bioMérieux. 14-16 novembre 2012

Staff de service sur les infections à C. difficile :

Barbut F. Réanimation polyvalente, CH d'Argenteuil, 5 janvier 2012

Barbut F. Hépatogastroentérologie, Hôpital Beaujon, 21 mars 2012

Barbut F. Réanimation médicale, Pitié Salpêtrière, 25 avril 2012

Barbut F. Réanimation médicale, Hôpital Foch, 17 septembre 2012

Barbut F. MIT, Saint Antoine, 11 avril 2012

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2012-2013

8.1. PROGRAMME DU CNR

8.1.1. Identification des souches de bactéries anaérobies

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

8.1.2. Diagnostic du botulisme

Le CNR poursuit ses activités de diagnostic de botulisme à partir des échantillons biologiques et alimentaires qui lui sont envoyés. De plus, nous réalisons l'isolement des souches de *C. botulinum* à partir des échantillons de selles et/ou d'aliments détectés positifs, ainsi que leur caractérisation par génotypage et séquençage du gène de la neurotoxine.

8.1.3. Activités de Recherche en relation avec le CNR

- **Développement de tests alternatifs de dosage des toxines botuliques**

La mise au point des tests de détection des toxines botuliques A, B et E basés sur l'activité protéolytique des substrats spécifiques (SNAP25 pour les toxines botuliques A et E, et VAMP2 pour la toxine botulique B) et révélation par des anticorps spécifiques de la forme clivée en format ELISA sera poursuivie. L'objectif est de remplacer les tests de létalité chez la souris par des tests *in vitro* pour la détection et l'identification des toxines botuliques dans les échantillons biologiques et alimentaires. La contrainte est d'obtenir une sensibilité de détection aussi élevée avec les tests *in vitro* par rapport au test souris, notamment dans les échantillons de sérum humain.

- **Caractérisation génétique des souches de *C. botulinum* isolées au CNR (suite)**

Les souches récemment isolées de cas de botulisme humain sont en cours d'analyse pour le génotypage du locus botulique, séquençage du gène de la neurotoxine botulique pour déterminer le sous-type, et MLST pour évaluer la variabilité génétique de ces souches.

- **Caractérisation des souches de bactéries anaérobies atypiques adressées au CNR**

Certaines souches adressées au CNR sont issues de cas pathologiques très particuliers comme des septicémies ou chocs toxiques foudroyants, ou bien présentent des caractères atypiques. En plus des tests habituellement réalisés pour l'identification de ces souches, des analyses plus approfondies sont entreprises sur certaines d'entre elles pour mieux appréhender leur pouvoir pathogène ou leur mode de transmission. Ces analyses comprennent: mise en évidence de toxine ou activité toxique particulière, séquençage partiel du génome, analyse de la variabilité génétique par MLST quand cette souche est apparentée à un groupe particulier de bactéries anaérobies, résistance aux antibiotiques, étude détaillée des caractères biochimiques .

- **Programme SERODIF (Rôle pronostique de la réponse immunitaire de l'hôte dans les infections à *C. difficile*, leurs complications et les rechutes)**

L'objectif est d'étudier la relation entre le profil de réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'un panel d'antigènes de *C. difficile* et la survenue d'une infection à *C. difficile*, décrire les caractéristiques de la réponse immunitaire, identifier un profil de réponse immunitaire à valeur pronostique (formes graves et rechutes) et évaluer le poids de l'immunité parmi l'ensemble des facteurs de risque d'une infection à *C. difficile*.

Le CNR est chargé de la production/purification des toxines A, B et CDT pour leur utilisation comme antigène dans les analyses de réponse anticorps des patients qui seront effectuées par l'Unité de ML Gougeon Immunité antivirale, Biothérapie et Vaccin.

8.2. PROGRAMME DU LABORATOIRE ASSOCIÉ

Virulence : Projet CDIFFGEN (Pathogenomics, ERAnet), dernière année

L'objectif de ce projet européen est de mieux comprendre pourquoi certaines souches de *C. difficile* ont un potentiel de virulence plus important que d'autres. Ce potentiel de virulence est défini soit par la capacité des souches à entraîner des infections plus sévères (souche 027) ou à prédominer dans certains pays (souches 001 et 106 en Angleterre, souche 053 en Autriche, souche 078 en France) ou à être plus fréquemment responsables d'épidémies (souches 017). Nous nous proposons de comparer ces souches à d'autres souches n'ayant pas le même potentiel de virulence mais proches d'un point de vue phylogénétique (même séquence type en MLST ; PCR ribotype ayant un coefficient de similarité >85%) en utilisant des approches génomiques (génomique comparative) et transcriptomiques (expression des gènes, microarray). Si des gènes s'avèrent intéressants des mutants knock-out seront construits (ClostronSystem) et leur pathogénèse sera étudiée (B. Dupuy, IP Paris). Nous avons reçu un financement européen de 146 k€ pour ce projet qui est piloté par M. Rupnik. A ce titre, F. Barbut a participé aux travaux de génomique comparative et de transcriptomique du projet CDIFFGEN dans le laboratoire de Bruno Dupuy (Unité des toxines et pathogénie bactérienne, Institut Pasteur).

Epidémiologie : Projet de réseau européen pour la surveillance des infections à *C. difficile* (ECDIS-net) "Supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level"

L'objectif de ce réseau européen est d'améliorer la capacité des laboratoires des Etats Membres européens, de la Norvège, de l'Islande et du Liechtenstein à détecter et surveiller les infections à *Clostridium difficile*, de construire et maintenir une base de données pour une nomenclature de référence des PCR-ribotypes et de développer et améliorer les protocoles de surveillance des infections à *C. difficile*.

A ce titre Catherine Eckert a participé les 14 et 15 mars 2012 au Workshop "Isolation and identification of *Clostridium difficile* from feces samples and PCR-ribotyping" à Leiden, Pays-Bas.

Epidémiologie : EUCLID (EUropean, multi-centre, prospective bi-annual point prevalence study of *CLostridium difficile* Infection in hospitalised patients with Diarrhoea)

Cette étude est organisée sous l'égide de l'Université de Leeds (Pr M. Wilcox) et financé par le laboratoire Astellas. Il s'agit d'une étude non interventionnelle dont les objectifs sont de mieux définir le poids de l'infection à *C. difficile* en Europe et la nature des souches qui circulent. Le principe de cette étude est de collecter auprès de 65 établissements de santé, tous les échantillons de selles envoyés pour coprocultures (indépendamment d'une demande spécifique de recherche de *C. difficile*) au cours de 2 journées (une journée entre les 3 et 7 décembre 2012, et une autre journée entre les 1^{er} et 5 juillet 2013, afin de tenir compte de la saisonnalité de l'infection).

Catherine Eckert a participé à la réunion de lancement qui s'est tenue à Amsterdam le 16 novembre 2012.

Epidémiologie : Les infections à *Clostridium difficile* chez des patients hospitalisés dans un centre hospitalo-universitaire (Hôpital Edouard Heriot, Lyon) - Thèse d'université de N. Khanafer.***Etude réalisée en partenariat avec les HCL (2011-2013).***

L'objectif principal de cette thèse est de décrire le pronostic des patients infectés par *C. difficile* (rémission, complications, décès) grâce à :

- une revue extensive de la littérature en utilisant les critères ORION (*Outbreak Reports and Intervention Studies of Nosocomial Infection*)
- la description de l'histoire naturelle d'ICD chez des patients hospitalisés à HEH
- la modélisation la transmission de l'ICD

Le rôle du laboratoire associé est d'assurer la caractérisation moléculaire des souches de *C. difficile* isolées.

Marqueurs épidémiologiques : étude du locus de pathogénicité (PaLoc) de 5 souches de *C. difficile* de profils particuliers.

Grâce au typage systématique par toxinotypage des souches reçues par le laboratoire associé, nous avons identifié 5 nouveaux variants toxiques (absence d'amplification par PCR de plusieurs gènes du locus de pathogénicité). Ces souches sont toxigènes (observation d'un effet cytopathogène en culture cellulaire et/ou détection des toxines dans les selles par des tests immuno-enzymatiques). L'utilisation de différents jeux d'amorces a permis de confirmer l'absence d'une partie des gènes du PaLoc. Le séquençage de l'intégralité du PaLoc est actuellement en cours à l'Institut Pasteur et permettra de mieux comprendre l'organisation génétique des gènes codant pour les toxines et leurs régulateurs.

Diagnostic : Evaluation d'un nouveau test diagnostic pour la mise en évidence du gène de la toxine A de *C. difficile* dans les selles : AmpliVue (Quidel Molecular)

Le test *C. difficile* AmpliVue est basée sur une technologie d'amplification isotherme Biohelix® appelée amplification hélicase-dépendante qui permet de détecter le gène de la toxine A directement dans les selles. La détection est de type immunochromatographique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de ce nouveau test.

Diagnostic : Evaluation de nouveaux tests pour la détection de la glutamate déshydrogénase dans les selles: GDH ELISA assay (Savyon) et GDH assay (Certest)

L'objectif de cette étude sera d'évaluer les performances de ces 2 tests (en termes de spécificité et de sensibilité) comparativement à la culture sur milieu sélectif.

Physiopathologie: Etude Sérodiff (Rôle pronostique de la réponse immunitaire de l'hôte dans les infections à *C. difficile*, leurs complications et les rechutes)

L'objectif est d'étudier la relation entre le profil de réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'un panel d'antigènes de *C. difficile* et la survenue d'une ICD, décrire les caractéristiques de la réponse immunitaire, identifier un profil de réponse immunitaire à valeur pronostique (formes graves et rechutes) et évaluer le poids de l'immunité parmi l'ensemble des facteurs de risque d'ICD

Durée totale de l'étude : durée 18 mois dont 15 mois d'inclusion dans les 17 centres participants (5 à 10 inclusions/mois/centre).

9. ANNEXES

TABLEAU 1

Nombre de demandes d'identification de souches d'origine humaine
par département

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

DEPARTEMENT	NOMBRE
6	1
7	1
8	1
11	1
13	1
16	14
17	3
20	1
27	1
28	7
29	1
31	4
33	7
34	1
37	2
42	7
44	6
46	1
47	4
54	11
56	1
57	4
59	3
60	3
63	1
64	5
66	2
67	2
69	3
71	3
72	1
73	1
74	6
75	6
76	2
77	6

79	2
80	2
83	1
85	2
92	2
94	3
95	2
97	14
98	3
TOTAL	155

TABLEAU 2**Répartition des souches d'origine humaine par site d'infection****Période du 01/01/2012 au 31/12/2012**

LOCALISATION	NOMBRE
Appareil digestif	1
Cardiologie	2
Coproculture	76
Gynécologie	0
Hémoculture	26
Infection ORL (amygdale, sinus, etc...)	5
Infections cutanées et musculaires (abcès, suppurations, gangrènes)	10
Infections hépatiques/pancréatiques	2
Infections intra-abdominales (pus, redon, etc...)	5
Infections osseuses	3
Infections péri-rectales, périnéales	1
Infections pleuro-pulmonaires	8
Infections post-opératoires	0
Ophthalmologie	2
Système lymphatique	3
Système nerveux central	3
Urologie/néphrologie	6
Non précisé	2
TOTAL	155

TABLEAU 3

Répartition des souches d'origine humaine par genre

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

GENRE	NOMBRE
ACTINOBACULUM	3
ACTINOMYCES	7
ANAEROCOCCUS	2
BACILLUS	1
BACTEROIDES	5
CAPNOCYTOPHAGA	2
CATABACTER	1
CLOSTRIDIUM	91
DESULFOVIBRIO	1
DIALISTER	3
EGGERTHELLA	5
EUBACTERIUM	1
FLAVONIFRACTOR	2
FUSOBACTERIUM	5
LACHNOSPIRACEAE	1
LACTOBACILLUS	1
ODORIBACTER	1
OSCILLIBACTER	1
PARABACTEROIDES	1
PARVIMONAS	1
PEPTONIPHILUS	1
PORPHYROMONAS	1
PROPIONIBACTERIUM	3
ABSENCE DE BACTERIES ANAEROBIES	3
ABSENCE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE	1
ABSENCE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	2
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	4
COQUE AEROBIE	1
CULTURE POLYMICROBIENNE, IDENTIFICATION NON REALISABLE	1
EXAMEN ANNULE	1
SOUCHE NON REPARTIE EN SUB CULTURE	2
TOTAL	155

TABLEAU 4

Répartition des souches d'origine humaine par espèce

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

ESPECE	NOMBRE
ACTINOBACULUM SCHAALII	3
ACTINOMYCES EUROPAEUS	1
ACTINOMYCES GRAEVENITZII	2
ACTINOMYCES ISRAELII	2
ACTINOMYCES NEUII	2
ANAEROCOCCUS VAGINALIS (ancien Peptostreptococcus vaginalis)	2
BACILLUS LICHENIFORMIS	1
BACTEROIDES FRAGILIS	3
BACTEROIDES HEPARINOLYTICUS (PREVOTELLA HEPARINOLYTICA)	1
BACTEROIDES THETAOTAOMICRON	1
CAPNOCYTOPHAGA SPUTIGENA	2
CATABACTER HONGKONGENSIS	1
CLOSTRIDIUM ARGENTINENSE	1
CLOSTRIDIUM BARATII	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM de type A	2
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	7
CLOSTRIDIUM CADAVERIS	1
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	49
CLOSTRIDIUM INNOCUUM	2
CLOSTRIDIUM PARAPUTRIFICUM	4
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	18
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	1
CLOSTRIDIUM SORDELLII	1
CLOSTRIDIUM SP. ABSENCE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	1
CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM	1
CLOSTRIDIUM TETANI	1
DESULFOVIBRIO DESULFURICANS	1
DIALISTER MICRAEROPHILUS	1
DIALISTER PNEUMOSINTES	2
EGGERHELLA LENTA (ancien EUBACTERIUM LENTUM)	5
EUBACTERIUM SP.	1
FLAVONIFRATOR PLAUTII	2
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM subspecies FUNDULIFORME	4

FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	1
LACHNOSPIRACEAE	1
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS	1
ODORIBACTER SPLANCHNICUS (ex Bacteroides splanchnicus)	1
OSCILLIBACTER-LIKE	1
PARABACTEROIDES MERDAE (ancien Bacteroides merdae)	1
PARVIMONAS MICRA (ancien MICROMONAS MICROS)	1
PEPTONIPHILUS GORBACHII	1
PORPHYROMONAS SOMERAE	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	3
ABSENCE DE BACTERIES ANAEROBIES	3
ABSENCE DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE	1
ABSENCE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	2
ABSENCE DE SUBCULTURE EN ANAEROBIOSE	4
COQUE AEROBIE	1
CULTURE POLYMICROBIENNE, IDENTIFICATION NON REALISABLE	1
EXAMEN ANNULE	1
SOUCHE NON REPARTIE EN SUB CULTURE	2
TOTAL	155

TABLEAU 5

Souches d'origine vétérinaire : répartition par espèce

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

ESPECES	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	2
CLOSTRIDIUM COCHLEARIIUM	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	14
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	1
CLOSTRIDIUM SORDELLII	2
ABSENCE DE BACTERIES ANAEROBIES	2
BACTERIE ANAEROBIE FACULTATIVE	2
TOTAL	24

TABLEAU 6

Souches d'origine industrielle ou de collection : répartition par espèce

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

ESPECE	NOMBRE
ALISTIPES FINEGOLDII	1
ALISTIPES PUTREDINIS	1
BACILLUS CEREUS ENTEROTOXIQUES	2
LACHNOSPIRACEAE	1
TOTAL	5

Tableau 7-1 : Résistance (R+) aux antibiotiques des souches isolées en 2012
Antibiogramme standard réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

Bactéries à Gram + hors *Clostridium difficile* (47 souches) – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

Espèce/genre	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxifloxacine
<i>Actinobaculum schaalii</i>	3	3 (*)	0	0	0	2	0	0	0
<i>Actinomyces spp.</i>	7	5 (*)	1 (<i>A. israelii</i> : 6mm)	0	0	3	0	0	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	3	3 (*)	0	0	0	1	0	0	0
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	2	1 (6mm)	0	0	0	1	0	0	0
<i>Catabacter hongkongensis</i>	1	0	0	0	0	0	0		0
<i>Clostridium spp. (hors C. difficile)</i>	21	0	0	0	1 (<i>C. cadaveris</i> : 6 mm)	5 (**)	0	0	7
<i>Eggerthella lenta</i>	5	0	0	0	0	1	0	2/3 (15 et 18mm)	3 (6, 15, 15mm)
<i>Flavonifractor plautii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Oscillibacter-like</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parvimonas micra</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Espèces naturellement résistantes

(**) *C. baratii* (12mm), *C. butyricum* (15mm), *C. innocuum* (6mm), *C. sordelli* (15mm), *C. sporogenes* (6mm)

Bactéries à Gram – (18 souches) – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

Genre/espèce	N	Métronidazole 16µg	Amoxicilline	Amox-ac. Clav.	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Chloramphénicol	Moxifloxacine
<i>Bacteroides spp. (*)</i>	4	0	3 (*)	2	1 <i>B. fragilis</i> : 15mm)	2	4	4	0
<i>Bacteroides heparinolyticus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	2	1 (6mm)	2	1	0	0	0	NT	0
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	1	0	0	0	0	1	1	NT	0
<i>Dialister spp.</i>	2	2 (6mm)	0	0	0	1	0	NT	0
<i>Fusobacterium spp.</i>	5	0	1 <i>(F. necrophorum)</i>	1 <i>(F. necrophorum)</i>	1	0	5	NT	4 <i>(15, 20, 20 et 20 mm)</i>
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	0
<i>Parabacteroides merdae</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	0
<i>Porphyromonas somerae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) détails des espèces et leur génotype

	β-lactamase	cepA	cfxA	cfiA	Notes
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	-	-	15mm pour l'imipénème
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	+	-	
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	-	-	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+				

Tableau 7-2 : Antibiogramme spécifique à *Clostridium difficile* – nombre de souches résistantes ou intermédiaires

PCR ribotypes	N	Métronidazole 16µg	Tétracycline	Erythromycine	Imipénème	Clindamycine	Vancomycine 30µg	Moxifloxacine
027	1	0	0	1	0	1	0	1
078/126	12	0	2	10	3	10	0	10
Autres (*)	36	0	8	13	11	34	0	22
Tous types	49	0	10	24	14	45	0	33

- (*) A+B+CDT- ; tcdC non délété : 30 souches
 A+B+CDT+ ; tcdC avec délétion de 18bp ; non 027 : 4 souches
 A+B+CDT+ ; tcdC non délété : 1 souche
 souche non toxigène : 1 souche

BOTULISME HUMAIN

Tableau 8-1 : Nombre de cas et de foyers

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

N° DOSSIER	PRELEVEMENT	DPT	Sexe	FOYER	Nbre de cas	Typage de la toxine botulique dans le sérum				Titre toxine (DL/ml)	Autres prélèvements	Aliment suspect	Souche isolée
						A	B	E	Autre				
2012/00049	Sérum	67	M	Type B	1	-	+	-		2	2012/00071: Selles PCR B+ (200 DL/gr)	Paté industriel d'origine bulgare 2012/00082 Absence de toxine préformée (< 4 DL/gr) PCR BoNT/B positive	Aucune
2012/00066	Sérum	34	F	Type A Infantile	1					Absence (< 1)	2012/00067: Selles PCR A+B+ (4 000 à 10 000 DL/gr) 2012/00125: Selles PCR A+ (toxine négative)	Miel (négatif) 2011/00068	C. botulinum A1b 2012/00088
2012/00094	Sérum	75	F	Type A	1	-	-	-		Absence (< 1)	2012/00100: Selles PCR A+ / Absence de toxine préformée	?	Aucune
2012/00193	Sérum	21	M	Type A	1	+	-	-		8<16	2012/00194: Selles PCR A+ (toxine préformée non recherchée)	Nombreuses conserves industrielles périmées non reçues	C. botulinum A2/A5 2012/00217
2012/00542	Sérum	03	F	Type B	1 (3 asymptomatiques)		+		A+B: -	>= 1		2012/00543: Conserve familiale de betterave (négatif) 2012/00544: Jambon (préparation familiale) 8 000 < 16 000 DL/gr PCR BoNT/B+	Aucune
2012/00684	Sérum	72	M	Type A	2	+	-	-		80	2012/00686: Liquide gastrique (négatif)	Conserve familiale d'aubergines fabriquées au Maroc 2012/00680 (restes assiette): 480 DL/gr PCR A+B+ 2012/00681 (restes bocal): 800 DL/gr PCR A+B+	C. botulinum A(B) 2012/00714
2012/00685	Sérum		F			-	-	-		Absence (< 1 DL/ml)	2012/00718: Lait maternel (négatif)		
2012/00716	Sérum		F					Absence (< 1 DL/ml)	2011/00717: Selles (négatif)				
2012/00704	Sérum	69	M	Suspicion (botulisme établi cliniquement)	1	-	-	-	-	Absence (< 1 DL/ml)		Conserve familiale de légumes (négatif) 2012/00705	Aucune
2012/00766	Sérum	63	M	Type B	2 (15 asymptomatiques)	-	+	-		4	2012/00816: Sérum négatif (convive asymptotique) 2012/00771: Selles (négatif)	Jambon (préparation familiale) 200 000 DL/gr PCR B+ (2012/00768)	C. botulinum B 2012/00815
2012/00767	Sérum		M			-	+	-		4	2012/00756: Sérum du 23/11 positif (vol insuffisant)		
TOTAL			6M/5F	7 (8)	9 (10)								

Tableau 8-2: Suspicion de neuropathies auto-immunes et autres neuropathies
Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Numéro de dossier	Département LAM	Type
201200064	33	Miller Fisher
201200073	06	Suspicion
201200074		
201200075	14	AVC
201200087		
201200093		
201200085	79	Guillain Barré
201200092		
201200140	34	Suspicion
201200145	93	Gougerot-Sjögren
201200148		
201200149		
201200251	74	Miller Fisher
201200254	13	Suspicion
201200263	94	Guillain Barré
201200267	29	Suspicion
201200290	79	Guillain Barré
201200296	94	Guillain Barré
201200332	69	Suspicion
201200342		
201200341	67	Miller Fisher
201200430	85	Polyradiculonévrite
201200451	75	Suspicion
201200453	60	Suspicion
201200517	94	Autre neuropathie
201200549	49	Suspicion
201200596	83	Intoxication à l'atropine
201200597	83	Intoxication à l'atropine
201200612	13	Intoxication à l'atropine
201200788	36	Guillain Barré
201200823	43	Suspicion

TABLEAU 9-1

Botulisme : échantillons agro-alimentaires reliés à une suspicion de botulisme

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Numero de dossier	Laboratoire	Prélèvements	Nombre	Type	Echantillon positif	Titre en toxine (DL/gr)	Souche isolée
2012/00068	CHU MONTPELLIER	MIEL	1	A	0		
2012/00082	DDPP67 - STRASBOURG	Pâté bulgare	1	B	1	< 4	
2012/00248	CLAMART	Haricots verts en conserve	1		0		
2012/00260	DDPP 74 - SEYNOD	Piment oiseau à l'huile	1		0		
2012/00322	CH DU KREMLIN-BICETRE	Sardines	1		0		
2012/00396	LABM SAINT-PAUL - VERDUN	Pâté	1		0		
2012/00461	Groupe Hospitalier Public Sud Oise - CREIL	Oreille et pied de cochon séchés	1		0		
2012/00543	CH DE VICHY	Betterave	2	B	1	8 000 à 16 000	
2012/00544		Jambon					
2012/00605	LDA 13 - MARSEILLE	Pesto	6	Intoxication à l'atropine	0		
2012/00606		Anchois					
2012/00607		Sauce piquante antillaise					
2012/00608		Caviar d'aubergines					
2012/00609		Purée de tomates					
2012/00610		Anchoiade					
2012/00627	CHU DE GRENOBLE	Mirabelles	1		0		
2012/00680	DDPP 72 - LE MANS	Aubergines + huile d'olive (assiette)	2	A	2	480	2012/00714
2012/00681		Aubergines + huile d'olive (bocal)				800	
2012/00705	GROUPEMENT HOSPITALIER NORD - LYON	Conserve familiale de légumes	1	Suspicion Botulisme établi cliniquement	0	Négatif (Aliment non consommé)	
2012/00768	LABORATOIRE DE BACTERIO CLERMONT-FERRAND	Jambon	1	B	1	200 000	2012/00815
TOTAL			20		5		

TABLEAU 9-2

BOTULISME : Echantillons agro-alimentaires alimentation humaine (non reliés à une suspicion de botulisme)

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Nombre	Toxine après			TYPE				
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C	D	E
30	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 9-3

BOTULISME : Echantillons agro-alimentaires (alimentation animale)

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Nombre	Toxine après			TYPE				
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C	D	E
204	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 9-4

BOTULISME : Echantillons environnementaux

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Nombre	Toxine après			TYPE				
	Extraction	Culture	PCR	A	B	C	D	E
4	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

TABLEAU 10

Recherche d'anticorps neutralisants dirigés contre la toxine botulique

Période du 01/01/2012 au 31/12/2012

Recherche positive	7 (7 type A / 0 type B)
Recherche négative	16
Non conformités	2
TOTAL	25

TABLEAU 11

BOTULISME ANIMAL.
Répartition par espèce

Période du 01-1-2012 au 31-12-2012

ESPECE	Nombre total D'échantillons		Foyers positifs (cas)			Foyers négatifs	Nbre total de foyers (nbre total de cas)
OISEAUX SAUVAGES	19	63	4 (10)	C/D	3	4	8 (15)
				D	1		
OISEAUX ELEVAGE	44		11 (11)	D	2	6	26 (53)
				C ou D	1		
			C/D	5			
			D ou C/D	3			
BOVINS	63		8 (12)	C	1	23	31 (37)
				C ou D	2		
				D/C	5		
CHEVAL/ANE/PONEY	11		0			8	8 (9)
CHIENS/CHATS	7		1 (1)	C ou D	1	5	6 (6)
OVINS	7		0			2	2 (5)
POISSON	1		0			0	1 (1)
TOTAL	152		24 (34)			48	82 (126)