

Rapport d'activité annuel 2014



**Centre National de Référence
des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella***

Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques

et

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

Responsables :

CNR-IP :

François-Xavier WEILL
Simon LE HELLO
Malika GOUALI
Benoit GARIN
Secrétariat

colishig@pasteur.fr/salmonella@pasteur.fr

Tél : 01 45 68 83 45 francois-xavier.weill@pasteur.fr
Tél : 01 40 61 37 24 simon.le-hello@pasteur.fr
Tél : 01 45 68 83 44 malika.gouali@pasteur.fr
Tél : 01 45 68 83 45 benoit.garin@pasteur.fr
Tél : 01 45 68 83 39 Télécopie : 01 45 68 88 37

Laboratoire associé (HRD) :

Stéphane BONACORSI
Patricia MARIANI-KURKDJIAN
Secrétariat

Tél : 01 40 03 57 92 stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr
Tél : 01 40 03 23 41 patricia.mariani@rdb.aphp.fr
Tél : 01 40 03 23 40 Télécopie : 01 40 03 24 50

Résumé analytique	1
1/ <i>Salmonella</i>.....	2
1.1 Missions et organisation du CNR.....	2
1.2 Activités d'expertise	2
1.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014	2
1.2.1.1 Liste des techniques développées et en développement.....	2
1.2.1.2 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	3
1.2.2 Activités d'expertise <i>Salmonella</i> en 2014.....	4
1.2.2.1 Activité de sérotypage <i>Salmonella</i> , CNR-ESS, 2010-2014	4
1.2.2.2 Activité de typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), CNR-ESS, 2010-2014	4
1.2.2.3 Activité de typage par la méthode MLVA, CNR-ESS, 2010-2014	5
1.2.2.4 Activité de typage par la méthode MLST, CNR-ESS, 2006-2014	5
1.2.2.5 Activité de typage de <i>S. enterica</i> sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques par la méthode CRISPOL, 2010-2014.....	5
1.3 Activités de surveillance des <i>Salmonella</i>	6
1.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>Salmonella</i>	6
1.3.1.1 Le réseau de laboratoires correspondants du CNR-ESS pour <i>Salmonella</i>	6
1.3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées.....	7
1.3.1.3 Analyse de la distribution des différents sérotypes et analyse des tendances	7
1.3.1.3.1 Nombre annuel de souches de <i>Salmonella</i> d'origine humaine CNR-ESS, 1988-2014.....	7
1.3.1.3.2 Répartition des 20 principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> , 2000, 2005, 2010, 2013-2014	9
1.3.1.3.3 Proportion de souches de <i>Salmonella</i> par rapport aux fiches d'information	10
1.3.1.3.4 Nombre d'isollements annuels des sérotypes prévalents en France, 1983-2014	11
1.3.1.3.5 Sites de prélèvement des souches de <i>Salmonella</i> reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2014	11
1.3.1.3.6 Tranches d'âge des patients des <i>Salmonella</i> reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2014.....	12
1.3.1.3.7 Nombre de souches de <i>Salmonella</i> reçues au CNR-ESS par région, 2005-2014	12
1.3.1.3.8 Représentativité et l'exhaustivité de surveillance de <i>Salmonella</i> en France, 2008	13
1.3.1.3.9 Le sérotype Typhi en 2014	15
1.3.1.3.10 Le sérotype Paratyphi A en 2014	17
1.3.1.3.11 Le sérotype Paratyphi B en 2014	18
1.3.1.4 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....	18
1.3.1.4.1 Relevés périodiques envoyés à l'InVS	18
1.3.1.4.2 Notifications de cas groupés à <i>Salmonella</i> signalés au CNR-ESS entre 2005 et 2014.....	19
1.3.1.4.3 Les différents foyers de cas groupés à <i>Salmonella</i> signalés au CNR-ESS en 2014	19
1.3.2 Contribution à la surveillance de la résistance aux antibiotiques	20
1.3.2.1 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhimurium de 1993 à 2014	20
1.3.2.2 Résistance aux antibiotiques du sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) de 2007 à 2014	22
1.3.2.3 Résistance aux antibiotiques du sérotype Enteritidis de 1993 à 2014	23
1.3.2.4 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhi de 1997 à 2014	24
1.3.2.5 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi A de 2005 à 2014	25
1.3.2.6 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi B de 2000 à 2014	26
1.3.2.7 Résistance aux antibiotiques du sérotype Agona de 2009 à 2014	27
1.3.2.8 Résistance aux antibiotiques du sérotype Blockley en 2010-2014	27
1.3.2.9 Résistance aux antibiotiques du sérotype Brandenburg de 1997 à 2014.....	28
1.3.2.10 Résistance aux antibiotiques du sérotype Corvallis de 2010 à 2014	28
1.3.2.11 Résistance aux antibiotiques du sérotype Derby de 2000 à 2014	29
1.3.2.12 Résistance aux antibiotiques du sérotype Heidelberg de 1997 à 2014	30
1.3.2.13 Résistance aux antibiotiques du sérotype Indiana de 2010 à 2014.....	31
1.3.2.14 Résistance aux antibiotiques du sérotype Infantis de 1997 à 2014.....	31
1.3.2.15 Résistance aux antibiotiques du sérotype Kentucky de 2001 à 2014.....	32
1.3.2.16 Résistance aux antibiotiques du sérotype Montevideo entre 2011 et 2014.....	34
1.3.2.17 Résistance aux antibiotiques du sérotype Newport de 1997 à 2014	34
1.3.2.18 Résistance aux antibiotiques du sérotype Virchow de 1997 à 2014	35
1.3.2.19 <i>Salmonella</i> présentant une résistance particulière aux antibiotiques au CNR-ESS en 2014	36
1.3.2.19.1 Souches résistantes aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération.....	36

a- Salmonella productrices de b-lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2014.....	36
b- Salmonella productrices de céphalosporinases plasmidiques reçues au CNR-ESS en 2014.....	37
c- Salmonella productrices de carbapénémases reçues au CNR-ESS en 2009-2014.....	38
1.3.2.19.2 Souches résistantes à la ciprofloxacine.....	38
a- Sérotype Typhimurium résistantes à la ciprofloxacine au CNR-ESS entre 2002 et 2014.....	38
b- Sérotype Kentucky résistantes à la ciprofloxacine au CNR-ESS, 2000-2014.....	39
1.3.2.19.3 Souches de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine d'origine plasmidique en 2014	41
1.3.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	42
1.3.4 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés à <i>Salmonella</i> en 2014	42
1.3.5 Contribution à la diffusion des données de surveillance et production du CNR	44
2/ <i>Escherichia coli</i>	46
2.1 Missions du CNR.....	46
Voir annexe 1.....	46
2.2 Activités d'expertise pour l'année 2014	46
2.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014	46
2.2.2 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ESS-LA en 2014	46
2.2.3 Bilan des activités concernant les EHEC	47
2.2.3.1 Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou de souches ..	47
2.2.3.2 Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2014	47
2.2.3.3 Analyse sur des souches de <i>E. coli</i> d'origine humaine productrices de Shiga-toxines	47
2.2.3.4 Analyse des variants des gènes <i>stx</i> (CNR-ESS-LA)	50
2.2.3.5 Autres facteurs de virulence.....	51
2.2.3.6 Analyse des prélèvements dans l'entourage de patients présentant un SHU (LA-RD).....	52
2.2.3.7 Sérotypage moléculaire des souches de EHEC non sérotypables.....	52
2.2.3.8 Sérodiagnostic des SHU (CNR-ESS)	53
2.2.4 Bilan des activités concernant les <i>E. coli</i> extra-intestinaux (LA-RD)	55
2.2.4.1 Etude des facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> responsables de méningites	55
2.2.4.2 Facteurs de pathogénicité des souches de <i>E. coli</i> extra-intestinales autres que les méningites	55
2.2.5 Analyse de l'évolution des tendances de l'activité du CNR-ESS-LA	57
2.3 Activités de surveillance des <i>Escherichia coli</i>.....	58
2.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à EHEC	58
2.3.1.1 Réseau partenaire.....	58
2.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances.....	58
2.3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux.....	61
2.3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches EHEC (LA-RD)	61
2.3.2.2 Sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E. coli</i> responsables de pathologies extra-	61
intestinales (LA-RD)	61
2.3.2.3 Collaboration avec le CNR de la Résistance aux antibiotiques Clermont-Ferrand	62
2.3.3 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à EXPEC	63
2.3.4 Participation aux réseaux de surveillance	64
2.3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....	64
2.3.4.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens	65
2.3.5 Détection et investigation des cas.....	65
3/ <i>Shigella</i>.....	71
3.1 Missions et Organisation du CNR	71
Voir Annexe 1	71
3.2 Activités d'expertise	71
3.2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2014.....	71
3.2.2 Activités d'expertise pour l'année 2014.....	71
3.2.2.1 Inventaire global des souches reçues au CNR-ESS en 2014.....	71
3.2.2.2 Analyse des 843 souches reçues de France métropolitaine en 2014	72
3.2.2.3 Souches reçues des DOM-TOM	75
3.2.2.4 Souches reçues de l'Etranger.....	75

3.2.2.5 Bilan des fiches d'information reçues au CNR-ESS	75
3.3 Activités de surveillance	76
3.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	76
3.3.1.1 Réseau partenaire.....	76
3.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances.....	76
3.3.2 Surveillance de la résistance des shigelles aux anti-infectieux.....	78
3.3.2.1 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de <i>Shigella</i> (CNR-ESS)	78
3.3.2.1.1 Surveillance globale	78
3.3.2.1.2 Surveillance de <i>Shigella sonnei</i>	81
3.3.2.1.3 Résistances émergentes chez <i>Shigella</i> spp.	82
3.3.3 Participation aux réseaux de surveillance	84
3.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....	84
3.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	84
4/ Alerte	85
5/ Activités d'information, de formation et de conseil	86
5.1 Réunions et missions	86
5.2 Enseignement / formation	86
5.3 Accueil de stagiaires	87
5.4 Information et conseil aux biologistes et praticiens	89
6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR-ESS-LA	90
6.1 Activités de recherche et d'expertise en lien direct avec les missions et activités du CNR. ...	90
6.1.1 <i>E. coli</i>	90
6.1.2 <i>Shigella</i> (CNR-ESS)	92
6.1.2.1 Génétique et génomique évolutive de <i>Shigella</i>	92
6.1.2.2 Génomique épidémiologique de <i>S. sonnei</i>	93
6.1.2.3 Etude de la structure des populations et suivi de clones internationaux de <i>S. flexneri</i>	93
6.1.2.4 Etude de l'évolution génomique de <i>S. dysenteriae</i> de type 1	93
6.1.2.5 Méthodes de typage des souches de <i>Shigella</i>	94
6.1.3 <i>Salmonella</i> (CNR-ESS)	95
6.1.3.1 Contribution au développement de nouvelles méthodes de typage et sous-typage.....	95
6.1.3.1.1 La méthode MLST	96
6.1.3.1.2 Inventaire des séquences des gènes <i>fliC</i> et <i>fljB</i> codant pour les antigènes flagellaires H ..	96
6.1.3.1.3 Etude du polymorphisme des régions CRISPR pour typage.....	96
6.1.3.1.4 Génomique épidémiologique	97
6.1.3.1.5 Etude du polymorphisme des régions CRISPR de sérotype Typhimurium.....	98
6.1.3.1.6 Coévolution entre CRISPR et le core genome chez 1000 souches de <i>S. Typhimurium</i>	98
6.1.3.1.7 Génomique évolutive de différents sérotypes de <i>Salmonella</i>	98
6.1.3.2. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>Salmonella</i>	99
6.2 Liste des publications et communications 2014 pour le CNR-ESS-LA.....	100
6.2.1 Publications nationales.....	100
6.2.2 Publications internationales	100
6.2.3 Congrès/Communications nationales et internationales	102
6.2.3.1 Communications nationales	102
6.2.3.2 Communications internationales.....	103
6.2.4 Conférences sur invitation.....	103
7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	103
7.1 <i>Salmonella</i>	103
7.2 <i>Escherichia coli</i>	104
8/ Programme d'activités 2015-2016.....	105
8.1 Apporter une expertise microbiologique	105

8.1.1 Infections à <i>E. coli</i>	105
8.1.1.1 Infections à <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques	105
8.1.1.2 <i>E. coli</i> responsables d'infections extra-intestinales (LA-RD)	106
8.1.2 Infections à <i>Shigella</i>	107
8.1.3 Infections à <i>Salmonella</i>	108
8.2 Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'InVS	110
8.3 Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel.....	113
ANNEXE 1	119
Organigramme	
Annexe 1. Missions et organisation du CNR	119
1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR	119
1.2 Les équipes.....	121
1.2.1 Le CNR-ESS : Effectif / Qualification du Personnel.....	121
1.2.2 Le laboratoire associé (LA-RD) : Effectif / Qualification du Personnel.....	123
1.3 Les locaux et équipements.....	123
1.3.1 CNR-ESS (Institut Pasteur)	123
1.3.2 LA-RD	126
1.4 Démarche qualité	127
ANNEXE 2	128
Annexe 2. Capacités techniques du CNR.....	128
2.1 Pour <i>Salmonella</i>	128
2.1.1 Liste des techniques de référence	128
2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles.....	129
2.1.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence	130
2.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	130
2.2 Pour <i>Escherichia coli</i>	131
2.2.1 Liste des techniques de référence	131
2.2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	134
2.2.3 Collection de souches	134
2.2.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS-LA	135
2.3 Pour <i>Shigella</i>	135
2.3.1 Liste des techniques de référence	135
2.3.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	137
2.3.3 Collection de souches	137
2.3.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS	137
2.4 Sélection de 10 publications représentatives de l'année 2014.....	138

SOMMAIRE

FIGURES

Figure 1. Nombre annuel de souches de <i>Salmonella</i> d'origine humaine, CNR-ESS, 1983-2014	7
Figure 2. Répartition des souches de <i>Salmonella</i> et des fiches d'information au CNR-ESS, 2000-2014 ..	8
Figure 3. Evolution des principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> isolés chez l'homme, 1983-2014.....	11
Figure 4. Exhaustivité/représentativité régionale du réseau du CNR-ESS.....	14
Figure 5. Evolution du nombre de souches du sérotype Kentucky détectées au CNR-ESS selon leur profil de résistance	40
Figure 6. Répartition des différents sérogroupe de EHEC isolés en 2014.....	48
Figure 7. Distribution des différents profils de virulence des souches de EHEC isolées en.....	48
Figure 8. Evolution de l'activité du CNR-ESS pour <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> de 2006 à 2014.....	57
Figure 9. Prévalence en fonction de l'âge et du sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive.	58
Figure 10. Répartition régionale des isollements de EHEC en 2014.....	59
Figure 11. Répartition départementale des isollements de EHEC en 2014.....	60
Figure 12. Répartition par département du nombre de souches de <i>Shigella</i> et d'information sur les <i>Shigella</i> reçues en 2014	77
Figure 13. Distribution globale des sérogroupe de <i>Shigella</i> reçues au CNR-ESS depuis 2007 en France métropolitaine et DOM-TOM	78
Figure 14. Evolution de la résistance aux antibiotiques chez <i>Shigella</i> spp de 2008 à 2014	80
Figure 15. Analyses des tendances des résistances à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez <i>S. sonnei</i> biotype g.....	81
Figure 16. Evolution du nombre de <i>Shigella</i> CIP ^R au CNR-ESS entre 2006 et 2014	83

Résumé analytique

Depuis le 1^{er} janvier 2012, le CNR des *Salmonella* et le CNR des *Escherichia coli* et *Shigella* ne forment plus qu'un seul CNR, celui des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS).

Le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Robert Debré, Paris (LA-RD) demeure le laboratoire associé au CNR pour les activités *E. coli*.

Dans le présent rapport, le terme CNR-ESS-LA sera utilisé pour décrire des activités ou des données communes aux deux laboratoires et les termes CNR-ESS et LA-RD seront utilisés séparément pour décrire les activités spécifiques de chacun des laboratoires.

Salmonella

Au cours de l'année 2014, le CNR-ESS a enregistré 10680 isollements humains de *Salmonella* en France, dont 10106 en France métropolitaine et 574 dans les DOM, TOM et à Monaco. Parmi ces isollements, 9077 (contre 9131 en 2013) ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et 1603 (contre 1736 en 2013) provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

L'année 2014 a également été marquée par la détection et l'investigation microbiologique de 3 épidémies humaines d'amplitude européenne (sérotype Enteritidis lié aux œufs allemands, sérotype Kedougou lié à la consommation de reblochon et sérotype Chester en lien avec le Maroc), et de 3 épidémies régionales ou nationales entraînant le retrait-rappel d'aliments contaminés, et par les réponses aux sollicitations européennes dans le cadre d'augmentation de cas de salmonelloses à l'échelon de plusieurs états membres.

Le système de surveillance du CNR-ESS a permis de suivre l'émergence des clones de salmonelles résistants à la ciprofloxacine, aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes.

E. coli

L'activité concernant *E. coli* en 2014, tous types de prélèvements confondus, a connu une légère diminution par rapport à 2013. En effet, le CNR-ESS a reçu, un total de 2080 prélèvements contre 2294 en 2013 avec un nombre de prélèvements de selles plus important pour faire le diagnostic direct des infections à *E. coli* mais moins de souches isolées et de sérums de patients comme en témoignent les résultats ci-dessous :

- Souches : - 17,6 % (926 en 2014 versus 1124 en 2013)
- Selles : + 1,9 % (750 en 2014 versus 736 en 2013)
- Sérums : - 6,9 % (404 en 2014 versus 434 en 2013)

L'année 2014 a été marquée par l'absence d'épidémie à l'exception de cas groupés à *E. coli* entérohémorragique O55 ayant touché trois membres d'une même famille résidant dans la région de Brest ainsi qu'un cas à Montpellier . L'origine de la contamination n'a pu être identifiée.

Shigella

Durant l'année 2014, le CNR-ESS a reçu 1225 souches de *Shigella* envoyées comme appartenant au genre *Shigella*. Sur ces 1225 souches, 1180 ont été confirmées comme étant des *Shigella*, toutes d'origine humaine. Parmi ces 1180 souches, 843 provenaient de France métropolitaine (de 831 patients), 103 (de 97 patients) des DOM-TOM et 234 de l'étranger.

De plus, 184 fiches d'information correspondant à 177 patients ont été envoyées au CNR-ESS pour signaler une infection à *Shigella*.

En compilant les informations et souches et après élimination des doublons, des souches non humaines, des souches adressées de l'étranger, **un total de 1105 souches de *Shigella* isolées en métropole et dans les DOM-TOM a été répertorié au CNR-ESS en 2014.**

Salmonella

1/ *Salmonella*

1.1 Missions et organisation du CNR

Les missions et organisation du CNR sont présentées en annexe 1 du présent rapport.

1.2 Activités d'expertise

Les techniques de référence et disponibles au CNR sont présentées en annexe 2 du présent rapport.

1.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014

1.2.1.1 Liste des techniques développées et en développement

Le **sérotypage classique par agglutination** reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2600 sérotypes. De nombreuses techniques moléculaires permettent de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique. Ces techniques prennent une place de plus en plus importante au CNR. Il s'agit de :

- **L'analyse MLST** (Multilocus sequence typing). Cette méthode est basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes conservés (dits gènes de ménage) après amplification génique. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 2446 souches de *Salmonella* (consultée le 07 avril 2015) appartenant aux sous-espèces I ou *enterica* (n=1863), II ou *salamae* (n=240), IIIa ou *arizonae* (n=52), IIIb ou *diarizonae* (n=176), IV ou *houtenae* (n=68) et VI ou *indica* (n=15) de l'espèce *enterica* et à l'espèce *bongori* (n=32), couvrant 662 sérotypes. Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Université de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/>) qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman et al. PloS Pathogens 2012) et le 07 avril en 2015, 1952 séquençotypes.

- **Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB***. Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 1166 souches (consultée le 07 avril 2015) qui ont été analysées simultanément pour leur contenu allélique des gènes *fliC* et/ou *fliB* et pour leurs types MLST.

- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 7100 spacers différents ont été décrits par cette méthode ; ils sont accessibles sur le site web dédié (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Cette méthode originale a été mise au point au CNR-ESS (Fabre et al. PloS One 2012). Au 08 avril 2015, le CNR-ESS avait inventorié les CRISPR types de 1465 souches appartenant à 208 sérotypes. Il existe une corrélation nette entre sérotype, CRISPR type, lysotype et MLST type.

Ces techniques moléculaires précitées sont corrélées au sérotypage classique, et de plus peuvent permettre de **sous-typer les souches**. Trois autres applications ont été développées au CNR pour une utilisation plus directement liée au sous-typage :

- **L'analyse MLVA** (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour les sérotypes Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011) et pour Enteritidis (en cours d'harmonisation). Des schémas MLVA pour d'autres sérotypes comme Derby, Dublin, Typhi, Paratyphi A et Newport existent et/ou sont en cours de validation.
- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques basée sur le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein par le CNR-ESS en 2009, repose sur la détection de 68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes (68 spacers et 4 variants de spacers) fixées sur des microbilles grâce à la technologie xMAP de Luminex®. Cette technique est utilisée en temps réel pour le sérotype Typhimurium depuis le 01 janvier 2014 et en 1^{ère} intention pour toute investigation de ce même sérotype ainsi qu'à ses variants monophasiques et immobiles. La base de données de l'UBPE sur BioNumerics® comprend 974 profils différents obtenus après analyse de 12357 souches (au 08 avril 2015).
- **L'analyse après séquençage du génome entier (WGS, whole genome sequencing)** prend une place prépondérante dans l'investigation des populations homogènes chez *Salmonella*. Des outils et logiciels en cours de développement dans le monde entier permettent d'entrevoir son utilisation dans l'investigation des épidémies par une analyse des sites nucléotidiques polymorphiques (SNPs, single nucleotide polymorphisms), du génome accessoire (prophages, plasmides, îlots de virulence, ..), du résistome (l'ensemble des gènes de résistances aux antibiotiques) et du virulome (l'ensemble des gènes de virulence). *In silico*, il est théoriquement possible d'extraire toutes les cibles habituellement recherchées, (wg) sérotype, (wg) MLST, (wg) CRISPR, les plasmides, etc... En 2014, le CNR-ESS a investigué 3 épidémies nationales ou internationales par cette méthode avec la contribution de la Génopole de l'Institut Pasteur (Pfl, C. Bouchier). Une centaine de génomes ont alors été séquencés : sérotypes Havana (n=29), Kedougou (n=35) et Chester (n=36) (voir paragraphe 1.3.4).

1.2.1.2 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- **L'analyse MLVA** pour le sérotype Typhimurium est standardisée et harmonisée depuis 2011 et pour le sérotype Enteritidis est en cours d'harmonisation internationale. Le CNR-ESS aide à la mise en place et à l'harmonisation de cette technique pour les laboratoires français et étrangers sur demande.
- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques est utilisée en routine au CNR-ESS et ponctuellement au Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES, Maisons- Alfort). Cette technique a également été transférée à l'University College de Cork dans le cadre d'une collaboration scientifique.

1.2.2 Activités d'expertise *Salmonella* en 2014

Le CNR-ESS a réalisé le sérotypage systématique de la totalité des souches de *Salmonella* reçues des laboratoires collaborateurs de son réseau et a enregistré les informations envoyées par les laboratoires collaborateurs ayant sérotypé localement leurs souches.

En 2014, le CNR-ESS a enregistré **10680** isollements humains de *Salmonella* en France, dont 10106 en France métropolitaine et 574 dans les départements et territoires d'outre-mer (DOM-TOM) et à Monaco. Parmi ces isollements, **9077** (contre 9131 en 2013) ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et 1603 (contre 1736 en 2013) provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

Le CNR-ESS a également réalisé le sérotypage de **83** souches de *Salmonella* dans le cadre de collaborations internationales avec la Belgique, le Cameroun, Israël, le Maroc, le Niger et la Suisse). Il a également réalisé le sérotypage de **185** souches non humaines isolées chez l'animal, dans des aliments ou dans l'environnement, en France (majoritairement Institut Pasteur de Guadeloupe et le laboratoire de sécurité des aliments de l'ANSES, Maisons-Alfort) ou à l'étranger, dans le cadre de collaborations (Brésil, Israël, Maroc).

Il est à noter que 99 souches envoyées pour sérotypage de *Salmonella* se sont avérées être des bactéries autre que *Salmonella* (non comptabilisées) et que pour les souches humaines, il a été comptabilisé 498 doublons, soit 5% des souches reçues.

1.2.2.1 Activité de sérotypage *Salmonella*, CNR-ESS, 2010-2014

	2010	2011	2012	2013	2014
Souches d'origine humaine reçues au CNR et sérotypées	7463	8849	8870	9131	9077
Fiches d'information sur les souches d'origine humaine sérotypées par les laboratoires	1942	2220	1768	1736	1603
Total souches d'origine humaine	9405	11069	10638	10867	10680

1.2.2.2 Activité de typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), CNR-ESS, 2010-2014

Année	2010	2011	2012	2013	2014
Nombre de souches de <i>Salmonella</i> typées par PFGE	403	251	205	257	140

Cette activité, initiée en 2003, est variable d'une année sur l'autre en fonction des investigations d'épidémies. Le CNR-ESS utilise les conditions de migration et le marqueur préconisés par le protocole PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) ce qui permet de comparer les profils entre les laboratoires sur le plan national (notamment avec l'ANSES dans le cadre de la comparaison des souches humaines et non humaines) et international.

1.2.2.3 Activité de typage par la méthode MLVA, CNR-ESS, 2010-2014

Année	2010	2011	2012	2013	2014
Nombre de souches de <i>Salmonella</i> typées par MLVA	280	869	113	43	515

Cette méthode a été mise en route au CNR-ESS pour le sérotype Typhimurium en 2005 et pour le sérotype Enteritidis en 2006. Elle a été validée sur une collection de souches représentatives de la biodiversité et bien caractérisées sur le plan épidémiologique. Cette méthode implique la caractérisation de 5 loci (par PCR puis électrophorèse capillaire) par souche analysée. Le CNR-ESS est impliqué dans la standardisation et l'harmonisation de cette technique à l'échelle internationale. L'emploi de cette technique pour le sérotype Typhimurium est en constante diminution au CNR-ESS du fait de l'utilisation en premier lieu de la technique CRISPOL. Elle reste cependant indispensable lors d'investigation de populations génétiquement homogènes en complément des techniques PFGE et CRISPOL.

1.2.2.4 Activité de typage par la méthode MLST, CNR-ESS, 2006-2014

La technique de Multilocus Sequence Typing (MLST) qui consiste pour *Salmonella* en l'analyse de séquences de 7 gènes de ménage est utilisée en méthode alternative par le CCOMS dans la description du répertoire des sérotypes tels que décrits par le schéma de White-Kauffmann-Le Minor. Cette technique peut décrire plusieurs séquençotypes au sein même de certains sérotypes (dits alors polyphylétiques).

Le CNR et le CCOMS *Salmonella* ont ainsi effectué 2446 typages par MLST appartenant à 662 sérotypes différents depuis 2006.

1.2.2.5 Activité de typage de *S. enterica* sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques par la méthode CRISPOL, 2010-2014

Un sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et des variants monophasiques ou immobiles de Typhimurium basé sur le polymorphisme des régions CRISPR à l'aide de la technologie xMAP de Luminex a été développé au CNR-ESS et dénommée CRISPOL. Depuis 2010, les souches humaines sont régulièrement testées dans le cadre de l'investigation et en routine.

Année d'isolement	2010	2011	2012	2013	2014
Nombre de souches typées par CRISPOL	1403	4052	109	1152	1004

Ainsi pour 2011, la totalité des 4052 souches a été testée. Cette année 2011 servira de base épidémiologique pour la distribution des CRISPOL types (CT). Seules les souches de Typhimurium et variants nécessitant une investigation ont été testées en 2012. Une « crispolisation » en temps réel du premier et dernier semestres a été effectuée pour 2013 et 2014. La base de donnée du CNR-ESS comprend un total de 974 profils CRISPOL pour 12357 souches de sérotypes Typhimurium et ses variants monophasiques, principalement de sérotype 4,5,12:i:- et de rares souches immobiles de Typhimurium.

1.3 Activités de surveillance des *Salmonella*

1.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *Salmonella*

1.3.1.1 Le réseau de laboratoires correspondants du CNR-ESS pour *Salmonella*

L'Unité des Entérobactéries à l'Institut Pasteur (Paris) a été renommée en 2001 « Unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes » (BBPE) puis Laboratoire des Bactéries Pathogènes Entériques (LBPE) le 1^{er} janvier 2008 et, depuis le 1^{er} janvier 2010 Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques (UBPE). Cette unité a développé, depuis le début des années 1950 sous l'impulsion de Léon Le Minor, un réseau de laboratoires collaborant sur une base volontaire à la surveillance des infections dues aux entérobactéries (*Salmonella*, EPEC et *Shigella*). De nombreux directeurs de laboratoires de biologie médicale (LBM) correspondants sont des anciens élèves des cours de l'Institut Pasteur.

Ce réseau de surveillance par les LBM est unique en France pour plusieurs raisons:

- son ancienneté (depuis l'après-guerre),
- le nombre important et stable de LBM participants (autour de 1400),
- l'adhésion volontaire des LBM au système de surveillance des infections dues aux *Salmonella*, soit par l'envoi de souches pour sérotypage, soit par l'envoi de compte rendu de sérotypage si celui-ci a été fait dans le laboratoire expéditeur (fiche d'information).

La participation des LBM est essentielle à la surveillance des infections dues aux *Salmonella* survenant en France. Sa pérennité dans la durée est une préoccupation de tous les instants pour les biologistes du CNR-ESS: conseils techniques par téléphone ou réponse aux demandes précises des LABM (bibliographie, données épidémiologiques...). Le nombre de sérums nécessaires au sérotypage complet d'une souche de *Salmonella* (environ 200), le coût des sérums, la gestion difficile des stocks de sérums sur le plan de l'assurance-qualité et le renvoi des résultats le plus rapidement possible aux LBM fait que le CNR-ESS est une entité incontournable pour le sérotypage en routine.

En 2014, 1177 LBM de France métropolitaine et des DOM-TOM (contre 1280 en 2013) ont adressé des souches au CNR-ESS. Ils se répartissent en **307 laboratoires de centres hospitaliers** (contre 328 en 2013) envoyant 2966 souches (contre 3016 en 2013) et **870 LBM privés** (contre 952 en 2013) envoyant 6111 souches (contre 6115 en 2013). Le nombre de laboratoires du réseau est stable depuis 2003 pour les centres hospitaliers mais en diminution pour les LBM (1411 laboratoires, 331 CH et 1080 LBM). Le regroupement d'activité des laboratoires qui s'est amplifié ces dernières années depuis l'ordonnance du 13 janvier 2010 (obligeant les laboratoires à être accrédité selon la norme NF EN ISO/CEI 15189) a pour conséquence une diminution des LBM en France. Cette diminution est confirmée au regard des inscriptions au CNQ en bactériologie générale (1604 laboratoires participants au CNQ *E. coli* de 2014). Ainsi en 2014, 1177 sur 1604 laboratoires ayant la capacité d'effectuer la bactériologie ont envoyé des souches au CNR-ESS (73%).

C'est le laboratoire spécialisé Biomnis centralise le plus grand nombre de souches transférées au CNR-ESS avec 496 souches en 2014, mais ce chiffre est en constante diminution (696, 797 et 999 en 2013, 2012 et 2011, respectivement).

1.3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

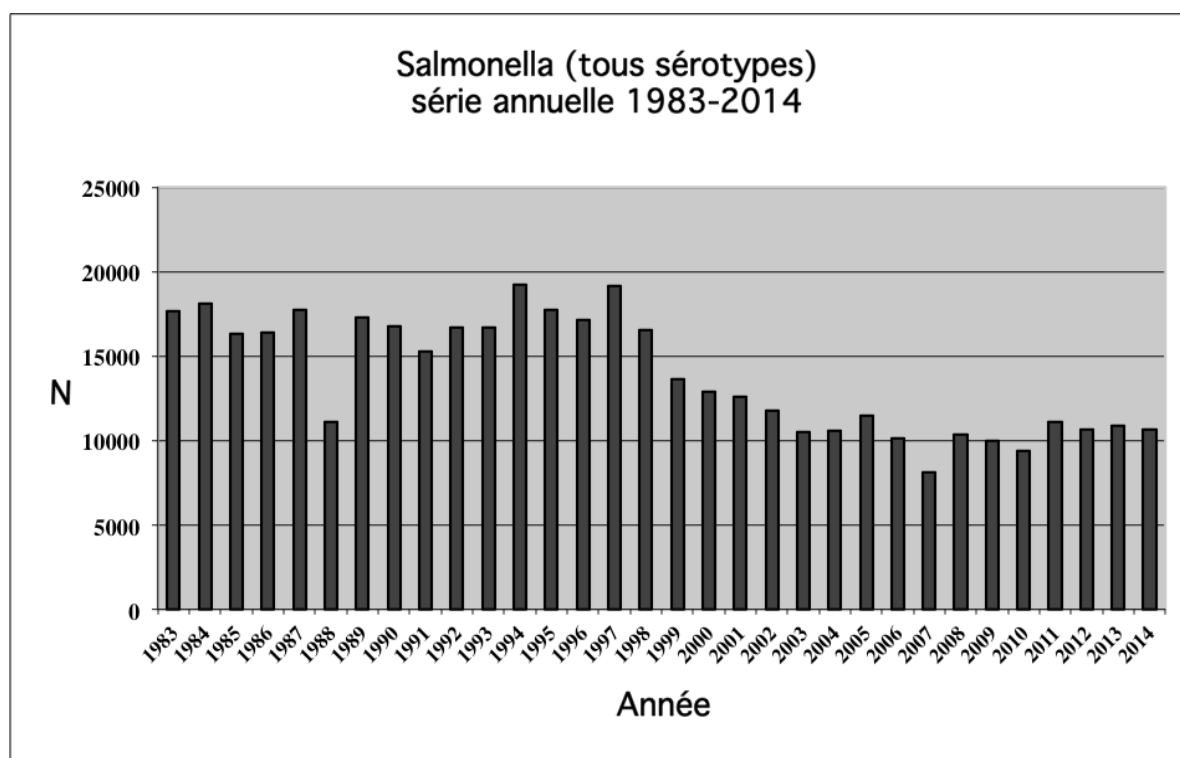
Le CNR-ESS participe à la surveillance des salmonelloses en **sérotypant toutes les souches** de *Salmonella* envoyées par les laboratoires collaborateurs et en collectant les informations sur les souches dont le sérotype a été déterminé par le laboratoire correspondant.

1.3.1.3 Analyse de la distribution des différents sérotypes et analyse des tendances

En **2014**, le CNR-ESS a enregistré **10680** isollements humains de *Salmonella* en France métropolitaine, dans les DOM-TOM et à Monaco. Parmi ces **10680** isollements, **9077** ont été des souches sérotypées par le CNR-ESS et **1603** provenaient de fiches d'information adressées au CNR-ESS par les laboratoires collaborateurs.

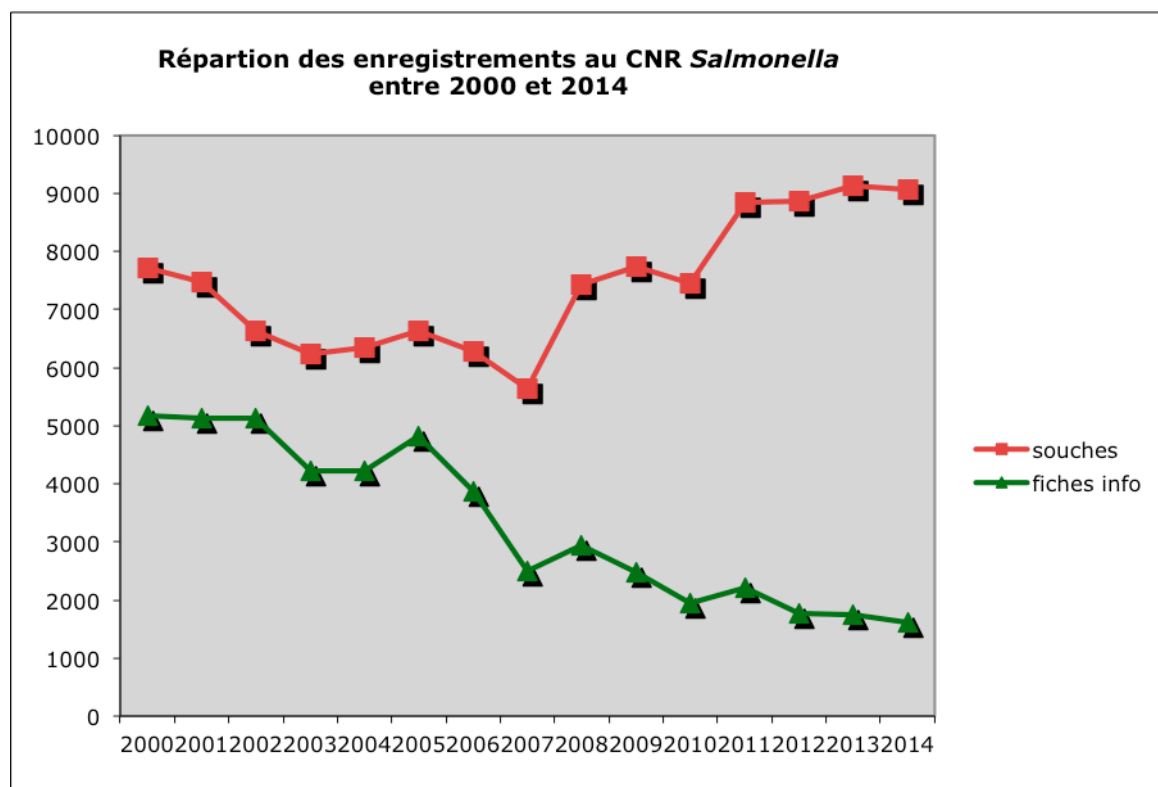
1.3.1.3.1 Nombre annuel de souches de *Salmonella* d'origine humaine répertoriées au CNR-ESS, 1988-2014

Figure 1. Nombre annuel de souches de *Salmonella* d'origine humaine, CNR-ESS, 1983-2014



Depuis 2003, le nombre d'enregistrements de *Salmonella* au CNR-ESS est stable, autour de 10000. Cependant, la proportion de souches reçues est en perpétuelle augmentation par rapport au nombre de fiches d'information.

Figure 2. Répartition des souches de *Salmonella* et des fiches d'information au CNR-ESS, 2000-2014



1.3.1.3.2 Répartition des 20 principaux sérotypes de *Salmonella*, 2000, 2005, 2010, 2013-2014

Rang	Distribution des sérotypes (n) par année*				
	2000	2005	2010	2013	2014
1	Enteritidis (4656)	Typhimurium (3992)	Typhimurium (3027)	Typhimurium (3102)	Typhimurium (2720)
2	Typhimurium (3800)	Enteritidis (3638)	Enteritidis (1711)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (2430)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (2240)
3	Hadar (787)	Agona (274)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (1098)	Enteritidis (1575)	Enteritidis (1909)
4	Virchow (321)	Infantis (210)	Kentucky (208)	Infantis (206)	Infantis (279)
5	Heidelberg (226)	Typhi (187)	Newport (191)	Derby (178)	Kentucky (176)
6	Infantis (209)	Derby (158)	Typhi (181)	Kentucky (176)	Newport (171)
7	Brandenburg (187)	Hadar (147)	Derby (167)	Panama (137)	Typhi (153)
8	Derby (164)	Virchow (142)	Panama (148)	Typhi (134)	Derby (126)
9	Typhi (152)	Newport (133)	Infantis (128)	Newport (130)	Chester (126)
10	Newport (137)	Panama (124)	Napoli (100)	Saintpaul (111)	Panama (122)
11	Panama (125)	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (101)	Dublin (81)	Bovismorbificans (104)	Hadar (91)
12	Dublin (105)	Manhattan (95)	Hadar (76)	Napoli (90)	Napoli (88)
13	Indiana (87)	Napoli (93)	Corvallis (70)	Paratyphi A (66)	Saintpaul (79)
14	Blockley (83)	Indiana (86)	Kottbus (66)	Agona (61)	Dublin (75)
15	<u>1</u> ,4,[5],12:i:- (75)	Brandenburg (82)	Virchow (66)	Montevideo (61)	Kedougou (72)
16	Bredeney (63)	Dublin (73)	Saintpaul (64)	Dublin (60)	Oranienburg (63)
17	Bovismorbificans (58)	Manhattan (62)	Montevideo (61)	Virchow (60)	Montevideo (61)
18	Livingstone (56)	Worthington (55)	Rissen (60)	Bredeney (58)	Agona (60)
19	Montevideo (51)	Kentucky (48)	Bovismorbificans (59)	Hadar (53)	Virchow (55)
20	Agona (50)	Dublin (45)	Brandenburg (56)	Weltevreden (51)	Paratyphi A (51)

*données incluant les souches adressées au CNR-ESS *Salmonella* et les fiches d'information

Depuis 2005, le sérotype prédominant est Typhimurium alors que le sérotype Enteritidis est en baisse constante pour n'occuper que la 3ème place depuis 2011. Le sérotype de formule antigénique 1,4,[5],12:i:- (variant monophasique de Typhimurium) prend une place prépondérante parmi les isollements de salmonelles en France, en constante augmentation d'année en année depuis 2008 (principalement dû à la dissémination internationale du clone multi-résistant aux antibiotiques, 4,5,12:i:-). Le sérotype Kentucky est un sérotype émergent, associé à des souches hautement résistantes aux fluoroquinolones.

En 2014, certaines augmentations de sérotype ont été liées à des épidémies nationales et/ou internationales, il s'agit des sérotypes Chester, Enteritidis, Hadar, Kedougou et Oranienburg (voir paragraphe 1.3.4).

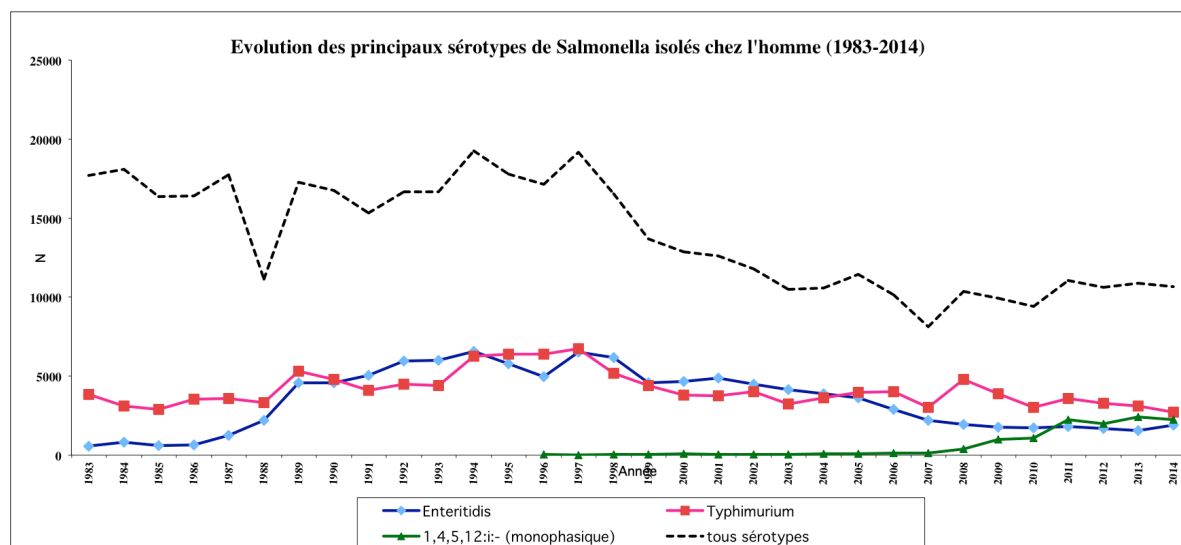
1.3.1.3.3 Proportion de souches de *Salmonella* par rapport aux fiches d'information

La part représentée par les fiches d'information (ou comptes-rendus de sérotypage) dans le total des isollements de *Salmonella* enregistrés au CNR-ESS est en constante diminution depuis 2005. Elle ne représente en 2014 que 15% des isollements enregistrés (tous sérotypes confondus) alors qu'elle était supérieure à 40% avant 2005. Les sérotypes Typhimurium et Enteritidis représentent à eux seuls 95% des fiches d'information reçues au CNR-ESS. Cette tendance est vraisemblablement liée aux coûts et à la gestion des antisérums dans le cadre d'une assurance-qualité engagée. En contrepartie, l'analyse épidémiologique en temps réel à partir des souches reçues et typées au CNR-ESS permet d'augmenter la rapidité de détection des phénomènes anormaux.

	Tous sérotypes	Enteritidis	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhi
Souches de <i>Salmonella</i> reçues en :					
2008	7439	1183	2714	409	138
2009	7464	1185	2101	996	165
2010	7463	1175	1714	1098	162
2011	8849	1265	2018	2232	146
2012	8870	1278	2000	1969	118
2013	9131	1227	1789	2408	130
2014	9077	1507	1575	2235	150
Comptes-rendus reçus en:					
2008	2939	758	2073	1	0
2009	2483	592	1766	11	5
2010	1942	536	1313	0	19
2011	2220	544	1582	16	0
2012	1768	415	1294	9	1
2013	1736	348	1313	22	4
2014	1603	402	1145	5	3
Total :					
2008	10378	1941	4787	410	138
2009	9947	1777	3867	1011	170
2010	9405	1711	3027	1098	181
2011	11069	1809	3600	2248	146
2012	10638	1693	3294	1978	119
2013	10867	1575	3102	2430	134
2014	10680	1909	2720	2240	153
Proportion comptes-rendus de sérotypage/total (%) en :					
	28,3	39	43,3	0,2	0
2008	25	33,3	45,7	1,1	2,9
2009	20,6	31,3	43,4	0	10,5
2010	20	30,1	43,9	0,7	0
2011	16,6	24,5	39,2	0,5	0,8
2012	16,0	22,1	42,3	0,9	3,0
2013	15,0	21,1	42,1	0,2	2,0
2014					

1.3.1.3.4 Nombre d'isollements annuels des sérotypes Enteritidis, Typhimurium et variant monophasique 1,4,[5],12:i:- en France, 1983-2014

Figure 3. Evolution des principaux sérotypes de *Salmonella* isolés chez l'homme, 1983-2014



1.3.1.3.5 Répartition par sites de prélèvement des souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2014

Sites de prélèvement	2005	2008	2010	2013	2014
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Selles	5659 (86,4)	6221 (83,6)	6285 (84,2)	8127 (89,0)	8203 (90,4)
Sang	435 (6,5) ¹	453 (6,1) ²	503 (6,7) ³	476 (5,21) ⁴	411 (4,5) ⁵
Urines	204 (3,1)	209 (2,8)	285 (3,8)	368 (4,0)	329 (3,6)
Pus	16 (0,2)	10 (0,1)	11 (0,1)	12 (0,1)	6 (<0,1)
Bile	5 (0,1)	1 (<0,1)	2 (<0,1)	2 (<0,1)	5 (<0,1)
LCR	1 (<0,1)	0	1 (<0,1)	4 (<0,1)	4 (<0,1)
Autres	83 (1,2)	81 (1,1)	111 (1,5)	116 (1,3)	93 (1,0)
Inconnu	151 (2,3)	464 (6,2)	265 (3,6)	26 (0,3)	26 (0,3)

^{1, 2, 3, 4, 5} Le % tient compte des souches de serotypes Typhi et Paratyphi A.

¹Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, le pourcentage est de 4,1%.

²Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, le pourcentage est de 4,2%.

³Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 4,5%.

⁴Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,6%.

⁵Pour les souches non-Typhi et non-Paratyphi A, B (dt-) et C, le pourcentage est de 3,2%.

1.3.1.3.6 Distribution par tranches d'âge des patients dont les souches de *Salmonella* ont été reçues au CNR-ESS entre 2005 et 2014

	2005 ¹	2008 ²	2010	2013	2014
Classes d'âge	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<1 an*	586 (9)	407 (5,5)	549 (7,4)	603 (6,6)	527 (5,8)
1-5 ans*	1616 (24,7)	1979 (26,6)	1928 (25,8)	2349 (25,7)	2194 (24,2)
6-14 ans	913 (13,9)	1221 (16,4)	1042 (14,0)	1274 (14,0)	1268 (14,0)
15-64 ans	2306 (34,7)	2711 (36,4)	2768 (37,1)	3329 (36,5)	3558 (39,2)
≥65 ans	937 (14,3)	1005 (13,5)	1114 (14,9)	1565 (17,1)	1524 (16,8)
Inconnu	188 (2,9)	116 (1,6)	62 (0,8)	11 (0,1)	6 (<0,1)

*Les classes d'âge <1 an et 1-5 ans ont fait l'objet de reclassement en 2009. Ainsi, les données générées pour 2005-2009 pour ces classes d'âge annulent et remplacent les données des rapports précédents.

¹Une épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Agona a été décrite en 2005 chez les enfants de moins de 1 an par consommation de poudre de lait infantile contaminée (154 cas).

²Une épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Give a été décrite en 2008 chez les enfants de moins de 1 an par consommation de poudre de lait infantile contaminée (58 cas).

1.3.1.3.7 Nombre de souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS par région, 2005-2014

	2005	2008*	2010*	2013*	2014*
Alsace	135	179 (12)	248 (21)	262 (11)	317 (4)
67-68					
Aquitaine	387	352 (2)	348 (2)	435 (2)	507 (0)
24-33-40-47-64					
Auvergne	135	149 (17)	152 (29)	206 (37)	186 (12)
03-15-43-63					
Bourgogne	148	174 (38)	131 (33)	273 (41)	219 (3)
21-58-71-89					
Bretagne	200	225 (16)	239 (22)	261 (19)	224 (4)
22-29-35-56					
Centre	230	270 (0)	265 (31)	200 (2)	220 (1)
18-28-36-37-41-45					
Champagne-Ardenne	83	116 (4)	99 (2)	135 (2)	147 (0)
08-10-51-52					
Corse	26	51 (13)	39 (10)	58 (1)	56 (1)
2A-2B					
Franche-Comté	121	173 (21)	115 (15)	139 (20)	146 (15)
25-39-70-90					
Ile-de-France	1702	1567 (5)	1422 (11)	1665 (13)	1611 (6)
75-77-78-91-92-93-94-95					
Languedoc-Roussillon	248	421 (48)	372 (53)	663 (8)	626 (7)
11-30-34-48-66					
Limousin	71	90 (1)	59 (0)	78 (0)	81 (0)
19-23-87					
Lorraine	146	188 (5)	176 (3)	262 (10)	335 (8)
54-55-57-88					
Midi-Pyrénées	428	412 (7)	379 (13)	511 (3)	522 (1)
09-12-31-32-46-65-81-82					
Nord-Pas-de-Calais	238	309 (5)	379 (4)	371 (1)	431 (2)
59-62					
Basse-Normandie	123	132 (0)	176 (0)	214 (0)	213 (0)
14-50-61					
Haute-Normandie	184	159 (0)	96 (0)	158 (4)	199 (22)
27-76					
Pays de la Loire	270	412 (41)	438 (64)	574 (51)	520 (5)
44-49-53-72-85					

Picardie 02-60-80	130	189 (0)	118 (3)	182 (7)	221 (6)
Poitou-Charentes 16-17-79-86	209	187 (0)	307 (3)	258 (2)	206 (3)
Provence-Alpes-Côte d'Azur 04-05-06-13-83-84	360	481 (100)	420 (93)	603 (61)	468 (18)
Rhône-Alpes 01-07-26-38-42-69-73-74	562	809 (371)	920 (478)	1032 (360)	1050 (351)
TOTAL Métropole	6136	7045	6898	8540	8505
Monaco	7	6 (0)	15 (0)	11 (0)	7 (0)
Guadeloupe	75	50 (10)	143 (15)	110 (6)	74 (3)
Martinique	91	63 (4)	85 (10)	55 (7)	103 (12)
Guyane	116	123 (0)	175 (0)	242 (0)	228 (0)
La Réunion	65	42 (5)	64 (0)	86 (1)	81 (0)
Mayotte	62	45 (0)	43 (0)	58 (0)	41 (0)
Polynésie française	0	21 (0)	31 (0)	20 (0)	22 (0)
St Pierre et Miquelon	0	0	1 (0)	1 (0)	0
Nouvelle-Calédonie	0	5 (0)	3 (0)	8 (0)	16 (0)

*total des souches reçues (souches envoyées par Biomnis)

La donnée « code postal du patient » est présente pour 6947 souches de *Salmonella* reçues au CNR-ESS en 2014 (76,5%). Pour les 2130 souches non renseignées, le code postal du laboratoire a été pris par défaut. Depuis juillet 2008, le laboratoire Biomnis envoie systématiquement toutes les souches de salmonelles au CNR-ESS. Le nombre de souches envoyées est en constante diminution pour atteindre 496 souches en 2014 et se concentre désormais sur une activité en Rhône-Alpes.

1.3.1.3.8 Évaluation de la représentativité et l'exhaustivité du système de surveillance de *Salmonella* en France, 2008

En 2009, une étude collaborative entre le CNR-ESS, le Contrôle National de Qualité (CNQ) de l'ANSM (ex-Afssaps) et l'InVS a été réalisée dans le but d'évaluer la représentativité et l'exhaustivité du CNR. Un questionnaire a été adressé le 8 avril 2009 à 3375 LBM de métropole et des DOM-TOM ayant déclaré pratiquer des analyses de bactériologie générale afin de recenser les cas de salmonelloses confirmées en 2008. Les résultats majeurs qu'il faut retenir sont les suivants :

- Nombre total déclaré d'isolement de *Salmonella* (une souche par patient)

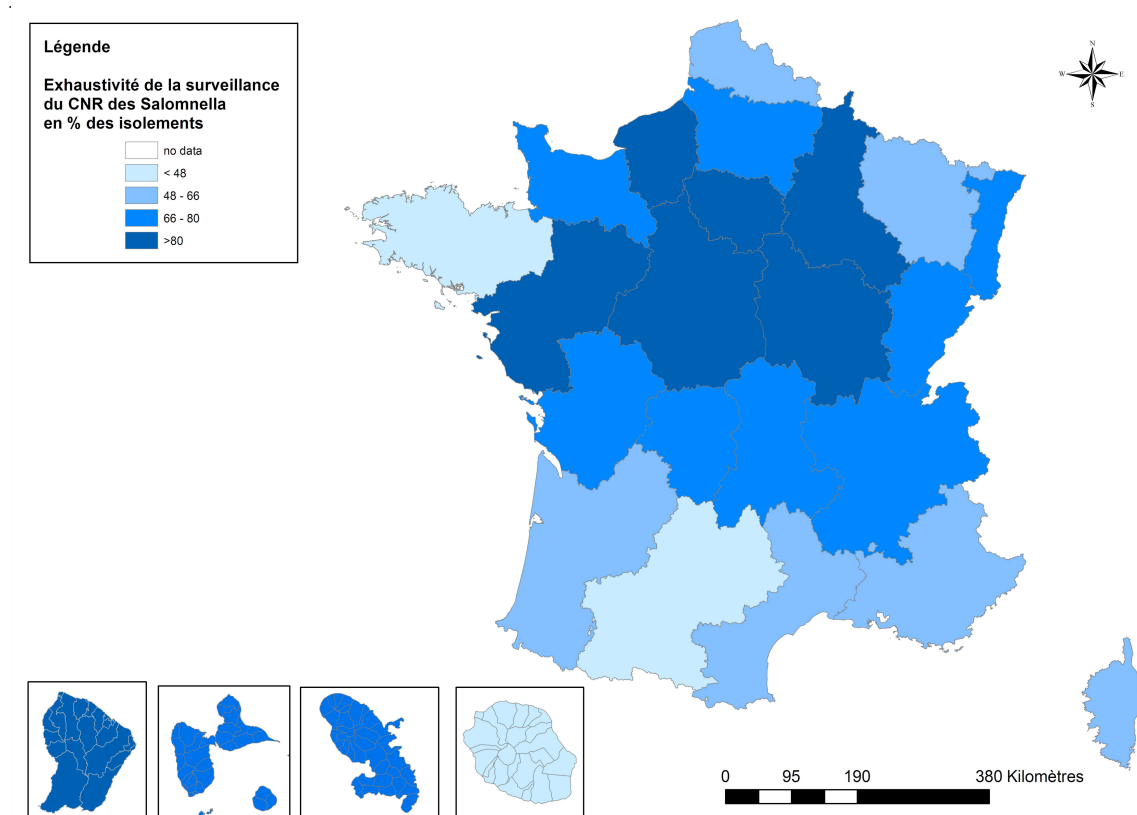
Parmi les 3217 laboratoires répondants (95,3%), 2282 ont déclaré avoir isolé au moins une souche de *Salmonella* en 2008. Au total, ces 2282 laboratoires ont déclaré avoir isolé **15665 souches de *Salmonella***, **60%** de ces souches provenant de **laboratoires privés** et près de **40%** de **laboratoires hospitaliers**.

- Exhaustivité et représentativité du CNR-ESS pour les salmonelles

Globalement, près d'une souche sur 2 (48%) isolée en France a fait objet d'un envoi au CNR et près d'une souche sur 5 (19%) isolée en France a fait objet d'une fiche reçue au CNR. Au total, **près des 2/3 des souches (66%) de *Salmonella* isolées en France ont fait l'objet d'un envoi au CNR**, soit sous forme de souches soit sous forme de fiches d'information.

Statut laboratoire	Laboratoires n	Données CNQ-AFSSAPS		Données CNR souches + fiches infos	Exhaustivité du CNR
		Laboratoires répondants n (%)	Salmonella n (%)	Salmonella n (%)	Salmonella %
Hospitalier	389	376 (15,0)	6138 (39,2)	4858 (46,7)	79,1%
Privé	2814	2117 (84,4)	9467 (60,4)	5534 (53,3)	58,5%
Autres	14	14 (0,6)	60 (0,4)	0 (0,0)	0%
TOTAL	3217	2507 (100,0)	15665 (100,0)	10392 (100,0)	66,3%

Figure 4. Exhaustivité/représentativité régionale du réseau du CNR-ESS



Ces données comprennent les souches et les fiches d'information.

1.3.1.3.9 Le sérotype Typhi en 2014

En 2014, 150 souches de *S. enterica* sérotype Typhi isolées chez 139 patients ont été répertoriées au CNR-ESS. Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination probable de 2009 à 2014.

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Afrique</i>	<i>26</i>	<i>40</i>	<i>31</i>	<i>18</i>	<i>25</i>	<i>26</i>
Afrique (sans précision)	1		2	1		
Algérie	2	3	1	1		
Angola	1				1	3
Benin	1		1			
Burkina Faso		4	1		1	1
Burundi					1	
Cameroun	1	3	2	2	2	
Cap Vert					1	
Centrafrique	1		1			1
Comores	2		1	1		2
Congo	3					
Côte d'Ivoire		5	1	1	3	2
Egypte	1	1				
Ghana						1
Guinée		7	1		1	
Kenya		1				
Madagascar		3	5	6		
Mali	1	3	4	3	3	2
Maroc	9	5	5	2	7	11
Mauritanie		1				
Mozambique					1	
Niger					1	
Nigeria	1				1	
Sénégal	1		6			3
Soudan				1		
Tchad	1	1				
Togo		1			1	
Tunisie		2			1	
<i>Asie</i>	<i>24</i>	<i>41</i>	<i>32</i>	<i>25</i>	<i>23</i>	<i>43</i>
Asie (sans précision)	1					
Afghanistan					1	
Bengladesh	2	2	7	1	1	2
Cambodge	1	1	1	1	1	
Chine					1	
Inde	9	24	18	11	15	28
Indonésie	2			2		3
Liban		1				1
Myanmar				1		
Népal			1		2	

Pakistan	9	11	4	5		8
Philippines					1	
Sri Lanka		1	1	1		1
Thaïlande				3		
Vietnam		1				
<i>Amérique</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>1</i>		
Guatemala			1			
Haïti	1				1	
Mexique	3	3	4	1	2	
République dominicaine						
<i>Europe</i>	<i>23</i>	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
Chypre						1
Espagne			1			
France ¹	23	3				
Italie		1				
<i>DOM-TOM</i>	<i>49</i>	<i>36</i>	<i>40</i>	<i>38</i>	<i>42</i>	<i>34</i>
Guadeloupe	5	1	2	1	1	1
Guyane	14	12	4	6	11	6
Martinique	1			1		
Mayotte	26	22	30	25	30	25
Polynésie française				1		
Réunion	3	1	4	4		2
TOTAL	126	124	109	82	90	104

¹ En 2009, deux épidémies à *S. enterica* sérotype Typhi sont survenues dans les départements du Nord et du Rhône lors de repas familiaux préparés par un porteur du bacille et qui ont nécessité l'hospitalisation de 18 et 5 personnes, respectivement. A noter que lors du repas du Rhône, il y avait une co-infection à sérotypes Typhi et Paratyphi A. En 2010, Un cuisinier d'un restaurant du XIXème arrondissement de Paris, porteur asymptomatique de *S. enterica* sérotype Typhi, a été la cause de 2 cas de fièvre typhoïde chez le personnel de ce même restaurant (serveuse et vigile).

1.3.1.3.10 Le sérotype Paratyphi A en 2014

En 2014, 47 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi A ont été répertoriées au CNR-ESS pour 46 patients. Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination.

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Afrique</i>	7	2	3	3	3	2
Algérie		1				
Benin	1					
Côte d'Ivoire					1	
Egypte						1
Mali				1		
Mauritanie				1		
Sénégal ¹	6	1	3	1	2	1
Tchad						
<i>Asie</i>	17	24	21	25	40	31
Asie (sans précision)				4	2	
Afghanistan			1			1
Bengladesh	2	2				
Cambodge ³					23	14
Chine		1			1	
Inde	13	10	16	14	8	4
Indonésie	1		1	2		
Laos			1			1
Myanmar				1	2	
Népal		6			2	1
Pakistan	1	3	1	2	1	1
Sri Lanka		1				1
Thaïlande		1		1	1	8
Vietnam			1	1	2	
<i>Amérique</i>		2		0	0	0
Brésil		2				
<i>Europe</i>	5				0	0
France ²	5					
TOTAL	29	28	24	28	45	33

¹ Une épidémie de *S. enterica* sérotype Paratyphi A a été notifiée en Bretagne dans une équipe de coureurs cyclistes (5 cas) ayant participé au Tour du Sénégal 2009.

² Un repas contaminant est survenu chez 5 personnes dans le département du Rhône (co-infection avec *S. enterica* sérotype Typhi).

³ Une augmentation importante de cas de fièvres paratyphoïdes à *S. enterica* sérotype Paratyphi A a été notée chez des touristes français de retour du Cambodge. Cette épidémie a été confirmée localement et sévit toujours en 2014 (Tourdjman et al. Euro Suveill 2013 et Vlieghe et al. Euro Suveill 2013).

1.3.1.3.11 Le sérotype Paratyphi B en 2014

Le sérotype Paratyphi B est associé à des fièvres paratyphoïdes ou à des diarrhées fébriles. Classiquement, les souches se différencient en fonction de leur capacité à fermenter le d-tartrate (dt). Ainsi, on peut subdiviser les souches de sérotype Paratyphi B en biotype dt- associées à une pathologie de type fièvre paratyphoïde et en biotype dt+ (ou Java) associées à de simples diarrhées. Actuellement, nous utilisons une PCR afin de confirmer les souches dt- des souches dt+ (Malorny et al. J Clin Microbiol 2003).

En 2014, 9 souches de *S. enterica* sérotype Paratyphi B de biotype dt- ont été répertoriées au CNR-ESS pour 8 patients.

Le tableau ci-dessous précise, quand il a été indiqué sur la fiche de renseignement, le lieu de la contamination.

Pays de contamination	Nombre de souches					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Afrique</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>		<i>1</i>	<i>1</i>
Algérie			1			
Egypte	1					
Maroc	1	1	1	1	1	1
Tunisie	1					
<i>Asie</i>	<i>10</i>	<i>8</i>	<i>2</i>		<i>2</i>	<i>0</i>
Inde		1			1	
Turquie	10	7	2		1	
<i>Amérique</i>	<i>1</i>	<i>3</i>				<i>1</i>
Amériques (sans précision)						
Chili		2				
Pérou	1	1				1
TOTAL	14	12	4	1	3	2

1.3.1.4 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

1.3.1.4.1 Relevés périodiques envoyés à l'InVS

Relevés hebdomadaires et déclaration obligatoire en 2014:

- **224 foyers de cas groupés** d'infections à *Salmonella* signalés par les laboratoires correspondants (**203** messages en 2013),
- informations épidémiologiques et microbiologiques diverses sur les souches étudiées au laboratoire pour les sérotypes de ***Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes** ou sur les souches impliquées dans des épidémies,
- compte-rendu hebdomadaire de l'analyse d'un algorithme R aidant à la détection d'événements épidémiques.

Relevés annuels :

Edition annuelle d'un **rapport d'activité** du CNR-ESS.

Relevés ponctuels :

- réponses du CNR-ESS à des demandes d'information émanant de l'InVS (extraction par sérotype, classe d'âge....),
- au cours d'une épidémie, extraction et expertise microbiologique.

1.3.1.4.2 Notifications de foyers de cas groupés à *Salmonella* signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS entre 2005 et 2014

En 2014, le CNR-ESS a retransmis à l'InVS par télécopie ou par courrier électronique **214** notifications de foyers de cas groupés à *Salmonella*.

Foyers de cas groupés signalés à <i>Salmonella</i> au CNR-ESS en :						
	2005	2008	2010	2012	2013	2014
Nombre total de foyers	311	304	194	233	203	224
Sérotype causal:						
Enteritidis	104	69	48	55	46	65
Typhimurium	124	125	50	61	50	47
1,4,[5],12:i:-			35	52	52	64

1.3.1.4.3 Les différents foyers de cas groupés à *Salmonella* signalés par les laboratoires collaborateurs du CNR-ESS en 2014

224 épisodes de cas groupés déclarant 944 cas (203 pour 939 cas en 2013)

Nombre de sérotypes de *Salmonella* impliqués: 42

Foyers hospitaliers : 4 (12 cas)

Foyers familiaux : 190 (782 cas)

Collectivité : 2 (5 cas)

Ecoles : 3 (16 cas)

Autre (sans précision) : 16 (76 cas)

Les sources de contamination incriminées ont été déclarées pour 56 épisodes de cas groupés (**en gras les plus importants en 2014**): crevettes (1 épisode avec 3 cas), eau (1 épisode avec 2 cas), foie gras (1 épisode avec 5 cas), fromage (8 épisodes avec 31 cas), galettes mexicaines (1 épisode avec 2 cas), huîtres (1 épisode avec 7 cas), jambon (1 épisode avec 2 cas), kebab (1 épisode pour 2 cas), lait (3 épisodes avec 15 cas), légumes (1 épisode avec 2 cas), mayonnaise (5 épisodes avec 26 cas), méchoui (1 épisode avec 5 cas), moules (2 épisodes pour 4 cas), mousse au chocolat (2 épisodes avec 7 cas), œufs (7 épisodes avec 19 cas), poissons (2 épisodes avec 7 cas), poulet (1 épisode pour 4 cas), saucisses (3 épisodes avec 23 cas), steak haché (3 épisodes avec 8 cas), tiramisu (2 épisodes avec 18

cas), viande d'agneau (1 épisode avec 3 cas), viande de cheval (1 épisode avec 2 cas), viande de porc (1 épisode pour 6 cas), viande sans précision (2 épisodes avec 7 cas), yaourt (1 épisode avec 4 cas).

1.3.2 Contribution à la surveillance de la résistance aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques est réalisée annuellement sur un échantillon représentatif des principaux sérotypes de *Salmonella*. La technique utilisée est l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (*Enterobacteriaceae*) en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM; communiqué 2013). De 16 à 32 antibiotiques sont testés. Les résultats dans ce rapport ne mentionnent que les principaux antibiotiques.

Abréviations utilisées: A, amoxicilline; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine; Azi, azithromycine; Imp, imipénème.

1.3.2.1 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhimurium de 1993 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :							
	1993 (n=297) (N=1593)	1997 (n=250) (N=2801)	2002 (n=320) (N=1756)	2005 (n=100) (N=1767)	2008 (n=102) (N=2714)	2010 (n=100) (N=1714)	2013 (n=107) (N=1698)	2014 (n=102) (N=1575)
Amoxicilline	55,2	68,4	64,5	60	61,8	70	60,7	57,8
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0,3	1	2	6	3,7	8,8
Gentamicine	0,3	0,7	0,3	0	1	4	0,9	2,0
Acide nalidixique	3	3,6	4	8	0	15	4,7	13,7
Ciprofloxacine	0	0	0,3	0	0	0	0	1
Sulfamides	58,9	70	68	61	57,8	71	62,6	60,8
Triméthoprim	0	6	5,3	10	7,8	11	5,6	18,6
Chloramphénicol	44,1	61,2	57	42	39,2	54	43,9	41,2
Tétracycline	69,6	83,2	71	65	60,8	75	70,1	56,9

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Principaux profils de résistance	% de souches possédant ce profil en :							
	1993 n=297	1997 n=250	2002 n=320	2005 n=100	2008 n=102	2010 n=100	2013 n=107	2014 n=102
AS[Sp]SuCTe*	34,3	54,6	48,8	32	30,4	30	35,5	21,5
AS[Sp]SuCTeNal*	0	1,5	3,8	5	0	15	1,9	4,9
S[Sp]Su*	1,1	0,5	2,2	0	2,9	1	4,7	6,9
ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe	0	0	0	0	0	4	0	0
ACroCazFoxSSpSuTmpCTeNal*	0	0	0	0	0	0	0	1
ACroSSpSuTmpCTe [Nal]*	0	0	0	0	0	1	1,9	5,9
ASSuTe	8,9	4,4	3,8	9	11,8	11	5,6	5,9
Te	11,8	13,7	3,8	5	3,9	7	9,3	5,9
Multi-sensible	28,6	14,1	21,5	28	29,4	19	19,6	25,5

[Sp] La spectinomycine n'était pas testée avant 2003

* phénotype associé au clone multirésistant DT104

Depuis ces dernières années, la prévalence du clone DT104, classiquement penta-résistant avec le profil AS[Sp]SuCTe, diminue en France. Environ 60% de souches de Typhimurium avaient un profil de résistance évocateur du lysotype DT104 entre 1997 et 2002, 51% en 2003, 41% en 2005 et autour des 38% depuis 2006. On note une ré-ascension de ce clone en 2010 et 2011, avec respectivement 50% et 46% des Typhimurium, et ce principalement dû à l'augmentation du phénotype penta-résistant + résistance à l'acide nalidixique. Entre 2012 et 2014, avec 40% à 45% des Typhimurium présentant les profils de résistance associés au clone DT104, on note un retour vers les taux observés entre 2006 et 2010.

Une des caractéristiques de l'année 2010 est l'avènement de souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), et notamment avec le profil « ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe » associé à une épidémie nationale (42 cas). L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance ont permis d'identifier la production concomitante de la BLSE CTX-M-1 et de la céphalosporinase CMY-2 chez ces souches (<http://www.infectiologie.com/site/jni11-com.php>).

L'estimation annuelle des souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium résistantes aux C3G peut se faire à partir des enquêtes de prévalence sus-citées ainsi qu'à partir des résultats d'antibiogramme accompagnant les souches après vérification par le CNR-ESS. L'évolution de ces souches entre 2007 et 2014 est présentée dans le tableau ci-dessous.

Principaux profils de résistance des souches résistantes aux C3G	Nombre de souches possédant ce profil en :						
	2007	2008	2009	2010	2011	2013	2014
ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe			2	42			
ACroCazSSpSulTmpCTeNal							1
ACroCazSTGSuCTeNal				1	1		
ACroCazSKTGSuTmpCTeNal	2						1
ACroSuTe				1		1	
ACroSSpSuTmpCTeNal						1	3
ACroSSpTSuTmpCTeNal							2
ACroSSpSuTmpCTe		1	1	3	1	2	1
ACroSSpSuTmp		1		1			
ACroSSpSuCTe		1		1			
ACroSTGSuCTe						1	
ACroSuTmpTe				1		1	
ACroSuTmp		3					
ACro		1			2		
ACroTe							
ACazTe			1				
ACazSSpKSulCTe			1				
ACazSSpSulCTe	1		3				
ACazSSulTe			1				
ACazFoxSKTGSuTmpCTe				1			
ACazFoxSKSuCTe				1			
ACazFoxSuTe						1	
ACazFox		1					
TOTAL	3	8	11	52	4	7	8

A noter pour 2014, le regroupement en île-de-France, des 8 souches de Typhimurium productrices de CTX-M et de QnrA (voir tableau 1.3.19.1)

1.3.2.2 Résistance aux antibiotiques du sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) de 2007 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	2007	2008	2010	2011	2012	2013	2014
	(n=50) (N=121)	(n=55) (N=410)	(n=101) (N=1098)	(n=110) (N=2143)	(n=105) (N=1852)	(n=109) (N=2271)	(n=105) (N=2235)
Amoxicilline	64	83,6	89,1	94,5	89,5	89,9	86,7
Ceftriaxone/ceftazidime	0	1,8	3	0	0	0	0
Gentamicine	2	3,6	7,9	0,9	0	0	0
Acide nalidixique	0	1,8	1	1,8	0	0,9	0
Ciprofloxacine	0	0	1	0	0	0	0
Sulfamides	40	81,8	87,1	95,5	91,4	89,9	83,8
Triméthoprim	16	25,5	19,8	4,5	3,8	2,7	6,7
Chloramphénicol	20	10,9	8,9	1,8	2,9	0,9	3,8
Tétracycline	90	90,9	92,1	97,8	93,4	95,4	86,7

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Le sérotype 1,4,[5],12:i:- (monophasique) est un sérotype qui est en très nette augmentation ces dernières années, passant de 113 isollements en 2006 à plus de 1500 depuis 2010 (du 9ème au 2ème sérotype le plus fréquemment isolé). Cette augmentation est due à l'émergence d'un variant monophasique de *S. enterica* sérotype Typhimurium multi-résistant aux antibiotiques de profil majoritaire « ASSuTe », de PFGE-type XTYM-159, de lysotype DT193 (ou DT120) et de CRISPOL type (CT) 1.

Principaux profils de résistance	% de souches résistantes en :					
	2007 n=50	2008 n=55	2010 n=101	2012 n=105	2013 n=109	2014 n=105
ASSpSuCTe	0	0	0	0	0,9	0
Multi-sensible	8	3,6	4	5,7	2,7	5,7
Te	20	9,1	2	2,9	5,5	5,7
ASSuTe	62	49,1	68,3	86,7	83,5	72,4
SSuTmpCTe	16	0	0	1,9	0	0
ATmpTe	0	0	5,9	0	0	0
ASSpSuTmpTe	0	0	0	0	0	3,8

Depuis ces dernières années, la multirésistance du sérotype Typhimurium est liée à la prévalence du clone DT104 (45% en 2013). Ce profil « ASSpSuCTe » (avec un gène *bla*_{PSE-1} de résistance à l'amoxicilline) est quasi-inexistant chez le « variant » monophasique 1,4,[5],12:i:- qui présente majoritairement (83,5%) un profil « ASSuTe » (avec un gène *bla*_{TEM} de résistance à l'amoxicilline).

La présence de souches monophasiques résistantes aux C3G a été observée lors des études de prévalence mais également suite à l'analyse systématique par les biologistes du CNR-ESS des antibiogrammes accompagnant les souches. Ainsi entre 2008 et 2012, 21 souches dont 2 exprimant une enzyme CTX-M-1, 8 souches produisant CTX-M-9 et une SHV-12 ont été détectées. A noter qu'en 2012, 5 souches produisaient de façon concomitante CTX-M-9 et QnrA1 et contenaient un intégron de classe 1 (avec une cassette *dfrA16-aadA2*) mais ce type de souches n'a pas été retrouvé ni en 2013 ni en 2014.

1.3.2.3 Résistance aux antibiotiques du sérotype Enteritidis de 1993 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :							
	1993 (n=70) (N=2345)	1997 (n=380) (N=2585)	2002 (n=99) (N=2054)	2005 (n=100) (N=1495)	2008 (n=102) (N=1183)	2010 (n=97) (N=1175)	2013 (n=105) (N=1149)	2014 (n=130) (N=1507)
Amoxicilline	0	6,8	6,1	12	2	6,2	8,6	0,8
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	1	0	0
Gentamicine	0	0,5	0	2	0	0	0	0
Acide nalidixique	0	2	11,1	21	24,5	21,6	33,3	22,3
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	0	3,9	0	2	1	0	8,6	4,6
Triméthoprim	0	2,3	0	2	0	0	1,9	0
Chloramphénicol	0	0,7	0	0	0	0	1,9	0
Tétracycline	2,8	3,4	3	1	0	2,1	6,7	0

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Le sérotype Enteritidis reste globalement sensible aux antibiotiques. Cependant la résistance à l'acide nalidixique est en nette augmentation depuis 1993. La CMI à la ciprofloxacine reste toutefois assez basse (0,125 mg/L). Entre 2009 et 2013, les souches résistantes aux C3G apparaissent mais restent rares avec une en 2009 (CTX-M de phénotype ACroSuTnp) et une en 2010 et 2011 (CTX-M-9 de phénotype ACro et ACroSSpSuTnp, respectivement).

1.3.2.4 Résistance aux antibiotiques du sérotype Typhi de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	1997 (n=40) (N=170)	2002 (n=40) (N=133)	2005* (n=63) (N=116)	2008* (n=85) (N=85)	2010* (n=108) (N=109)	2013* (n=79) (N=80)	2014* (n=99) (N=108)
Amoxicilline	0	2,5	8,1	11,8	15,7	16,4	4,0
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique	0	7,5	17,8	30,6	38,9	35,4	44,4
Ciprofloxacine	0	0	0	0	2,7	7,6	8,1
Cotrimoxazole	5	7,5	7,9	11,8	20,4	17,7	8,1
Chloramphénicol	7,5	7,5	5,9	10,6	16,7	19,0	6,1
Tétracycline	5	7,5	5,9	8,2	10,2	11,4	2,0
Azithromycine	NT	NT	NT	NT	0	0	0

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une seule par patient) reçues au CNR-ESS

*Souches isolées en France métropolitaine excluant les souches provenant de Mayotte et des Antilles-Guyane.

NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

En 2010-2014, la résistance à l'acide nalidixique (Nal^R) était observée chez près de 40% des souches de **sérotype Typhi** (avec une CMI > 256 mg/L). Il est important de noter l'évolution vers la résistance de haut niveau à la ciprofloxacine (CMI ciprofloxacine de 6 à 32 mg/L) : 3 souches en 2010, 4 en 2011, 4 en 2012, 6 en 2013 et 8 en 2014 isolées chez des patients revenant d'Inde, du Népal du Pakistan ou du Sri Lanka.

Les souches Nal^R étaient acquises en 2014 suite à des séjours en Inde (n=23), au Pakistan (n=5), au Bangladesh (n=1), en Angola (n=2), en Côte d'Ivoire (n=1) et en République centrafricaine (n=1). Ces dernières souches africaines sont notables car les souches résistantes aux quinolones étaient jusqu'alors presque exclusivement issues du sous-continent indien. Elle confirme les premières souches de 2010 isolées de 2 patients déclarant un retour d'Afrique (Burkina Faso et Côte d'Ivoire).

Depuis ces dernières années de plus en plus de souches multirésistantes mais Nal^S sont acquises en Afrique. Entre 2010 et 2014, lorsque le lieu de contamination est indiqué, les souches multirésistantes de profil ASSu[TmpC]Te provenaient d'Algérie, d'Angola, du Burkina Faso, du Cameroun, de Côte d'Ivoire, du Ghana, de Guinée, du Mali, du Nigeria et de République centrafricaine (Baltazar et al. Emerg Infect Dis 2015).

En 2014, les souches de Typhi contractées dans les DOM-TOM, c'est à dire Mayotte (n=26), Guyane Française (n=6), Guadeloupe (n=1) et La Réunion (n=1) étaient toutes sensibles à l'amoxicilline, à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole, exceptée pour une souche Nal^R et Cip^R du cas isolé en Guadeloupe (sans notion de voyage).

1.3.2.5 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi A de 2005 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	2005 (n=21) (N=33)	2008 (n=41) (N=41)	2010 (n=30) (N=30)	2011 (n=31) (N=32)	2012 (n=39) (N=39)	2013 (n=59) (N=60)	2014 (n=43) (N=46)
Amoxicilline	0	2,4	0	0	0	1,7	0
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique	71,4	61,9	76,7	90,3	64,1	39,0	27,9
Ciprofloxacine	0	0	3,3	0	0	0	0
Cotrimoxazole	0	0	0	0	0	0	0
Chloramphénicol	0	2,4	0	0	0	0	0
Tétracycline	0	2,4	3,3	0	0	1,7	0
Azithromycine	0	NT	0	0	0	0	0

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype isolées en France métropolitaine (une par patient) reçues au CNR-ESS

NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

Le pourcentage de résistance à l'acide nalidixique (CMI >256 mg/L) des souches **de sérotype Paratyphi A** est élevé. En 2014, ces souches ont été contractées en Thaïlande (n=3), en Inde (n=2), en Afghanistan (n=1), au Pakistan (n=1), au Sri Lanka (n=1), au Cambodge (n=1) et au Sénégal (n=1). Cette dernière souche confirme les cinq souches Nal^R de 2011 et 2013 isolées de patients déclarant un retour du Sénégal alors qu'habituellement les souches d'origine africaine restaient sensibles à tous les antibiotiques testés. Ces deux dernières années 2013-2014 ont été marquées par une augmentation de cas infectés par une souche de Paratyphi A sensible aux antibiotiques après un séjour au Cambodge (Tourdjman et al. Euro Suveill 2013).

1.3.2.6 Résistance aux antibiotiques du sérotype Paratyphi B de 2000 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	2000 (n=68) (N=75)	2002 (n=78) (N=78)	2006 (n=35) (N=51)	2008 (n=47) (N=51)	2012 (n=37) (N=37)	2013 (n=40) (N=40)	2014 (n=41) (N=48)
Amoxicilline	5,1	28,2	8,6	8,5	16,2	22,5	12,2
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	2,7	5	0
Gentamicine	0	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique	1,5	0	2,9	4,3	10,8	12,5	4,9
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	5,1	29,5	8,6	8,5	16,2	15	22,0
Triméthoprim	0	7,7	0	2,1	2,7	7,5	9,8
Chloramphénicol	5,1	24,4	8,6	8,5	10,8	10	4,9
Tétracycline	7,4	25,6	8,6	12,7	18,9	10	4,9

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Aucune souche de **Paratyphi B dt-** sur les 36 isolées durant la période 2010-2014, n'était résistante à l'amoxicilline mais huit présentaient une résistance à l'acide nalidixique avec CMI > 256 mg/L et une avec une CMI à 12 mg/L. Cette dernière, isolée en 2013, possédait une mutation non-synonyme isolée dans le gène *gyrB* (Ser464Phe) comme ce qui avait été précédemment décrite pour certaines populations de Typhi (Accou-Demartin et al. Emerg Infect Dis 2011). En 2012, une souche Paratyphi B dt+ (biotype Java) produisait une céphalosporinase de type CMY et en 2013, deux souches produisaient une BLSE de type CTX-M-1.

1.3.2.7 Résistance aux antibiotiques du sérotype Agona de 2009 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en:				
	2009 (n=53) (N=55)	2011 (n=46) (N=51)	2012 (n=54) (N=55)	2013 (n=59) (N=60)	2014 (n=52) (N=57)
Amoxicilline	13,2	8,7	0	8,5	46,2
Ceftriaxone/ceftazidime	1,9	2,2	0	0	3,8
Gentamicine	1,9	2,2	0	3,4	3,8
Acide nalidixique	3,8	2,2	1,9	6,8	25,0
Ciprofloxacine	0	2,2	0	1,7	0
Sulfamides	18,9	17,4	0	13,6	44,2
Triméthoprim	15,1	8,7	0	6,8	25,0
Chloramphénicol	1,9	2,2	0	1,7	11,5
Tétracycline	11,3	13	1,9	8,5	28,8

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Une souche de sérotype Agona résistante aux C3G de profil « ACazFoxSSpGTCSuTmpTe » a été isolée en 2009. Cette souche productrice d'une céphalosporinase plasmidique de type CMY-2 a été isolée d'un enfant adopté originaire d'Haïti. En 2011, une autre souche de profil « ACroCazSKTGSuTmpCTeNalCip » exprimant une BLSE de type CTX-M a été isolée chez une jeune patiente de retour d'Inde. En 2013, une souche résistante à haut-niveau à la ciprofloxacine a été identifiée.

1.3.2.8 Résistance aux antibiotiques du sérotype Blockley en 2010-2014

Profils de résistance	Nombre de souches possédant ce profil en :				
	2010 (n=11) (N=11)	2011 (n=11) (N=11)	2012 (n=60) (N=60)	2013 (n=12) (N=12)	2014 (n=6) (N=6)
SKTeNal	1	0	1	0	0
SKTeNalAzi	3	3	4	1	2
SKTeNalCipAzi	2	0	1	1	0
Multi-sensible	5	8	54	10	4

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

La particularité de ce sérotype est l'existence de souches résistantes à l'azithromycine associées à un profil de résistance SKTeNal. Des souches de même profil avec une résistance additionnelle de haut niveau à la ciprofloxacine sont apparues depuis 2010. Le nombre de souches élevées en 2012 est du à une épidémie de salmonelloses humaines à *S. enterica* sérotype Blockley multisensible aux antibiotiques.

1.3.2.9 Résistance aux antibiotiques du sérotype Brandenburg de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	1997 (n=40) (N=170)	2000 (n=45) (N=148)	2002 (n=41) (N=110)	2010 (n=50) (N=52)	2012 (n=46) (N=46)	2013 (n=46) (N=46)	2014 (n=33) (N=35)
Amoxicilline	15	8,9	9,7	22	26	21,7	24,2
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	2,2	0
Gentamicine	NT	4,5	4,9	14	23,9	13,0	18,2
Acide nalidixique	12	4,5	12,2	12	17,4	10,9	21,2
Ciprofloxacine	0	4,5	2,4	12	17,4	10,9	21,2
Sulfamides	17,5	8,9	17	38	28,3	23,9	27,3
Triméthoprim	20	8,9	17	24	28,3	21,7	27,3
Chloramphénicol	10	4,5	12,2	16	15,2	6,5	12,1
Tétracycline	75	66,7	73,2	46	30,4	28,3	42,4

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Des souches de sérotype Brandenburg de profil étendu « A (*bla*_{TEM}) SSpKTNGSuTmpCTeNalCip » hautement résistantes à la ciprofloxacine, persistent depuis 2000 dans un clinique du département de l'Allier (investigation en cours). En 2013, une souche CIP^R produisait également une BLSE de type CTX-M-32.

1.3.2.10 Résistance aux antibiotiques du sérotype Corvallis de 2010 à 2014

Principaux profils de résistance	Nombre de souches possédant ce profil en :				
	2010 n=69 N=69	2011 n=43 N=44	2012 n=40 N=40	2013 n=37 N=37	2014 n=43 N=44
ACroSSpGSuTmpCTeNal	0	0	0	1	0
ACroSSpTGSuTmpCTe	0	0	0	0	1
ASTNGSuCTeNal	1	0	1	0	0
ASuTeNal	0	1	0	0	0
ASuTe	1	1	0	1	0
SpSuTmpTeNalAzi	0	0	0	0	1
SSuTe	2	2	1	0	0
SSuTeNal	0	3	5	3	2
Nal	8	11	5	7	7
Multi-sensible	54	23	26	21	28

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2010 à 2014, toutes les souches de *S. enterica* sérotype Corvallis de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (n= 8, 15, 12, 13 et 10 respectivement) possédaient le gène *qnrS1* et avaient été contractées en Asie (Thaïlande, Indonésie, Inde, Laos), lorsque la notion de voyage était renseignée. En 2013 et 2014, une souche produisait une CTX-M.

1.3.2.11 Résistance aux antibiotiques du sérotype Derby de 2000 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :					
	2000 (n=40) (N=142)	2006 (n=50) (N=137)	2009 (n=53) (N=158)	2010 (n=132) (N=166)	2013 (n=81) (N=168)	2014 (n=43) (N=118)
Amoxicilline	2,5	2	13,2	3,8	9,9	4,7
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	11,3	0,8	1,2	0
Gentamicine	0	2	3,8	0,8	0	0
Acide nalidixique	0	2	3,8	6,8	2,5	0
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	57,5	76	58,5	56,8	61,7	60,5
Triméthoprim	5	8	22,6	3,8	7,4	4,7
Chloramphénicol	2,5	0	5,7	2,3	1,2	7,0
Tétracycline	55	80	58,5	62,9	61,7	60,5

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Principaux profils de résistance (%)	2009 n=53	2010 N=132	2011 N=137	2012 N=156	2013 N=81
SSpSuTe	34	45,5	55,5	55,1	44,4
Multi-sensible	30,2	34,1	26,3	28,8	29,6
ACroCazSSpKTNGAISuTmpCTe	5,7	0	0,7	0	0
ACroCazSSuTmpCTe	0	0,7	0	0	0
ACroCazSSpSuCTe	0	0	0,8	0	0
ACroSuTmpTeNal	1,9	0	0	0	0
ACroSSpSuTe	0	0	0	0	1,2
ACroSuTmp	1,9	0	0	0,6	0
ACro	1,9	0	0	0	0

En 2009, six souches résistantes aux C3G par production de BLSE ont été décrites chez le sérotype Derby. L'analyse des mécanismes moléculaires de 3 souches ayant le profil ACroCazSSpKTNGAISuTmpCTe a mis en évidence la présence concomitante des BLSE CTX-M-3 et CTX-M-15 et d'une méthyltransférase, RmtB. Ce profil a été retrouvé chez deux enfants adoptés revenant du Vietnam et chez un enfant contaminé à l'hôpital à partir d'un cas importé. En 2010 et 2011, deux souches supplémentaires avec les mêmes BLSE ont été isolées d'enfants adoptés du Vietnam. Depuis 2012, les souches BLSE ne sont plus en lien avec le Vietnam mais correspondent à des acquisitions métropolitaines et sporadiques (CTX-M-1 et CTX-M-9, respectivement pour 2012 et 2013).

1.3.2.12 Résistance aux antibiotiques du sérotype Heidelberg de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	1997 (n=50) (N=269)	2002 (n=67) (N=84)	2008 (n=28) (N=28)	2009 (n=20) (N=21)	2010 (n=26) (N=31)	2013 (n=21) (N=22)	2014 (n=22) (N=22)
Amoxicilline	26	31,5	28,6	20	11,5	9,5	13,6
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	10,7	15	7,7	4,8	4,5
Acide nalidixique	0	13,5	50	55	65,4	57,1	81,8
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	20	27	10,7	20	15,4	4,8	9,1
Triméthoprim	18	28,5	7,1	5	3,8	0	9,1
Chloramphénicol	6	0	7,1	0	3,8	0	0
Tétracycline	22	27	14,2	30	7,7	4,8	4,5

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Depuis 2008, on note une augmentation de souches résistantes au C3G (CTX-M ou CMY) qui ont été identifiées le plus souvent suite à un séjour en Algérie.

Profils de résistance	Nombre de souches ayant un profil de multirésistance en :					
	2008 n=28	2009 n=20	2010 n=26	2011 n=20	2012 n=31	2013 n=21
Multi-sensible	9	6	6	8	8	8
Nal	9	6	15	8	16	12
ACro	0	1	0	0	0	0
ACroCazFox	0	0	0	0	1	0
ACroCazFoxNal	0	0	0	0	0	1
ACroNal	2	0	1	0	0	0
ACroSuTeNal	0	2	0	1	3	0
ACroSSpGTSuTeNal	1	0	0	0	0	0
ACroSSpSuTmpNal	0	0	1	0	0	0
ACroKSuTmpCTeNal	0	0	0	1	1	0

n : nombre de souches étudiées

1.3.2.13 Résistance aux antibiotiques du sérotype Indiana de 2010 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :				
	2010 (n=26) (N=28)	2011 (n=18) (N=19)	2012 (n=31) (N=32)	2013 (n=22) (N=24)	2014 (n=23) (N=25)
Amoxicilline	38,5	5,5	19,4	13,6	26,0
Ceftriaxone/ceftazidime	26,9	5,5	3,2	0	4,3
Acide nalidixique	26,9	22,2	3,2	4,5	0
Ciprofloxacine	0	0	3,2	0	0
Sulfamides	46,2	11	19,4	13,6	34,8
Triméthoprim	15,4	0	19,4	13,6	30,4
Chloramphénicol	0	0	0	0	0
Tétracycline	46,2	11	19,4	18,1	34,8

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2010 et 2014, les souches productrices de BLSE (CTX-M-1, n=9) ont été prévalentes pour ce sérotype. A noter que la souche qui produisait une BLSE en 2014 présentait également une résistance à l'ertapénème dont le mécanisme reste inconnu à ce jour.

1.3.2.14 Résistance aux antibiotiques du sérotype Infantis de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :						
	1997 (n=40) (N=179)	2000 (n=40) (N=151)	2006 (n=58) (N=105)	2008 (n=50) (N=92)	2011 (n=58) (N=165)	2013 (n=63) (N=182)	2014 (n=88) (N=248)
Amoxicilline	2,5	2,5	0	10	3,4	1,6	3,4
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	0	1,1
Acide nalidixique	0	2,5	1,7	8	6,9	7,9	17,0
Ciprofloxacine	0	0	0	2	0	0	0
Sulfamides	5	5	0	12	8,6	7,9	19,3
Triméthoprim	5	2,5	0	14	5,2	1,5	5,7
Chloramphénicol	2,5	2,5	1,7	2	0	3,2	3,4
Tétracycline	35	2,5	5,2	20	6,9	7,9	18,2

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches du sérotype (une par patient) reçues au CNR-ESS

Entre 2009 et 2014, les souches résistantes à l'acide nalidixique présentaient une CMI modale à la ciprofloxacine de 0,38 mg/L. En 2014, une souche produisait une BLSE.

1.3.2.15 Résistance aux antibiotiques du sérotype Kentucky de 2001 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :								
	2001 (n=28) (N=29)	2002 (n=31) (N=31)	2004 (n=32) (N=34)	2006 (n=55) (N=56)	2008 (n=126) (N=126)	2010 (n=188) (N=207)	2012 (n=185) (N=185)	2013 (n=167) (N=169)	2014 (n=162) (N=166)
Amoxicilline	21,4	22,6	21,9	25,5	57,1	69,4	66	71,3	69,1
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	0	0	0	4,2	1,6	3,6	1,2
Gentamicine	21,4	25,8	18,8	16,4	47,3	59,6	49,7	55,7	51,2
Acide nalidixique	21,4	25,8	25	32,7	77,7	84,5	83,7	83,8	84,6
Ciprofloxacine	0	3,2	15,6	30,9	74,6	85,1	82,7	83,8	82,1
Sulfamides	31,8	29	28,1	20	51,6	68,4	54,6	58,1	62,3
Triméthoprime	3,6	3,2	15,6	3,6	4	9,8	8,1	6,0	8,6
Chloramphénicol	0	3,2	9,4	1,8	9,5	5,7	2,1	3,0	8,0
Tétracycline	31,8	35,5	25	23,6	53,2	68,4	62,7	68,9	74,1
Azithromycine	NT	NT	NT	NT	NT	1,1	3,2	2,4	2,5

n : nombre de souches étudiées, N : nombre de souches du sérotype (une seule par patient) reçues au CNR-ESS
NT : non testé. La CMI à l'azithromycine est réalisée systématiquement sur toutes les souches depuis 2009

Profils de résistance %	2007 n=112	2008 n=126	2009 n=131	2010 n=188	2011 n=144	2012 n=185	2013 n=167
Multi-sensible	26,8	19,8	9,1	11,9	13,2	14,6	12,0
ASSpGSuTeNalCip*	38,4	27,8	43,5	47,2	48,6	33,5	40,7
NalCip*	11,6	8,7	6,1	8,3	3,5	7	6,6
ANalCip*	4,5	14,3	13,7	6,7	4,9	12,4	8,4
ASSpGSuCTeNalCip*		5,6	4,6	0,5		1,1	1,2
SSpGSuTeNalCip*	1,8	4,7	1,5	2,1	2,8	4,3	2,4
ASSuTeNalCip*	1,8	4,7		0,5	2,7		
ATeNalCip*	1,8	0,8	0,8	1,6	3,5	5,9	1,8
ASSpKGSuTeNalCip*		1,6	3,8	0,5			2,4
TeNalCip*		4	4,6	1	0,9	2,7	3,0
ACroSuTeNalCip*							1,2^a
ACroCazFoxNalCip*			0,8				
ACroCazSSpKTNGSuTmptCTeNalCip*			0,8				0,6^b
ACroSSpGSuTeNalCip*				0,5			
ACroCazSSpKTGNAlSuTmptNalCipAzi*			0,5				
ACroCazFox					2,7		
ACazSSpKTNGSuTeNalCip*						0,5	
ACroCazFoxSSpGSuTeNalCip*						1,1	1,2^a
AImpSSpGSuTmptTeNalCipAzi*							0,6^c

* en rapport avec le clone ST198

^a souche porteuse du gène *bla_{CMY-2}*

^b souche porteuse de gène *bla_{CTX-M-15}*

^c souche porteuse du gène *bla_{OXA-48}*

Depuis 2002, nous assistons à l'émergence de souches hautement résistantes à la ciprofloxacine au sein du sérotype Kentucky lié au clone X1-ST198 (Le Hello et al. J Infect Dis 2011 et Le Hello et al. Front Microbiol 2013). Les profils majoritaires rencontrés sont « ASSpGSuTeCip », « ACip » et « Cip ». A noter que des souches Cip^R avec une résistance additionnelle aux C3G et à l'imipénème (souches marocaines produisant VIM-2, souches algériennes et égyptiennes produisant OXA-48) ou à l'azithromycine isolées depuis 2009 ont été décrites par le CNR-ESS (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013). A noter en 2014

l'isolement de la première souche de Kentucky productrice de NDM-1 dans une fabrique française.

1.3.2.16 Résistance aux antibiotiques du sérotype Montevideo entre 2011 et 2014

Profils de résistance	Nombre de souches possédant ce profil en :		
	2011 n=56 N=62	2012 n=39 N=39	2013 n=56 N=56
ASulTmp	1	0	0
A	0	2	1
ACroSSpKTGSuTmpCTeNal*	0	3	1
ACroSSpKTGSuTe*	0	1	0
ACroSSpKTSuTmpCTe*	0	0	1
ACroSSpKTSuTmp*	0	0	1
ACroSSpKTSu*	1	0	0
ACroSSpKTSuTmpC*	1	0	0
ACazFoxSKTNGSuTmpCTeNal*	0	0	1
SSpSuTmpTe	1	1	0
Nal	5	1	1
Tmp	0	0	2
Multi-sensible	47	31	48

* souches en lien avec une épidémie hospitalière

En 2011, les 5 souches de *S. enterica* sérotype Montevideo ayant une résistance isolée à l'acide nalidixique possédaient le gène *qnrS1*. Toutes les souches résistantes aux C3G (2011-2013) étaient associées à une épidémie hospitalière. Ces souches étaient majoritairement productrices de CTX-M-9 et/ou QnrA1 à l'exception d'une qui produisait DHA-1 et QnrS. Elles possédaient toutes un intégron complexe de classe 1.

1.3.2.17 Résistance aux antibiotiques du sérotype Newport de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :							
	1997 (n=40) (N=170)	2000 (n=100) (N=109)	2003 (n=126) (N=138)	2006 (n=88) (N=91)	2008 (n=118) (N=120)	2012 (n=40) (N=118)	2013 (n=42) (N=120)	2014 (n=53) (N=163)
Amoxicilline	27,5	27	19,8	10,2	6,8	5	16,7	5,7
Ceftriaxone/ceftazidime	0	15	17,5	8	4,2	5	2,4	0
Gentamicine	2,5	4	1,6	0	0,8	0	0	0
Acide nalidixique	15	23	1,6	1,1	3,4	2,5	4,8	5,7
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	27,5	29	19,8	11,4	7,6	5	4,8	7,5
Triméthoprim	27,5	10	1,6	3,4	1,7	2,5	4,8	3,8
Chloramphénicol	25	25	15,9	9,1	5,9	2,5	0	0
Tétracycline	45	27	19	12,5	9,3	2,5	9,5	7,5

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

Depuis 2000, des souches résistantes aux C3G sont détectées pour ce sérotype avec des fréquences variables suivant les années. L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance ont permis d'identifier la production de la céphalosporinase plasmidique CMY-2. Ces souches de phénotype ACazSSuCTe (ou plus rarement ACazSSpKToGSuCTe et ACazSKSuCTe) sont apparues durant la dernière décennie chez les bovins aux Etats-Unis (après l'autorisation d'utilisation d'une C3G, le ceftiofur pour le traitement de la pneumonie des bovins). Une analyse rétrospective nous a permis d'individualiser en 2000, un foyer de cas groupés dans la

région parisienne. En 2003, une petite épidémie suite à la consommation de viande de cheval insuffisamment cuite a été détectée dans le Nord de la France (Espie et al. Epidemiol Infect 2005). Toutes les souches résistantes aux C3G isolées entre 2000 et 2005 ont été caractérisées au CNR-ESS et publiées (Egorova et al. Emerg Infect Dis 2008).

Depuis 2005, 13 nouvelles souches de phénotype ACazSSuCTe, ACazSSuTe ou ACazSKSuCTe ont été confirmées comme productrices de CMY-2. La dernière souche résistante aux C3G a été isolée en 2013 (BLSE de type CTX-M).

1.3.2.18 Résistance aux antibiotiques du sérotype Virchow de 1997 à 2014

Antibiotique	% de souches résistantes en :							
	1997	2000	2003	2004	2007	2010	2013	2014
	(n=50) (N=501)	(n=50) (N=239)	(n=100) (N=157)	(n=77) (N=88)	(n=74) (N=79)	(n=57) (N=63)	(n=55) (N=55)	(n=48) (N=52)
Amoxicilline	26	6	14	20,8	20,3	5,3	27,3	12,5
Ceftriaxone/ceftazidime	0	0	3	6,5	4	1,8	0	0
Gentamicine	0	0	1	2,6	1,4	3,5	9,1	6,3
Acide nalidixique	24	48	35	41,6	43,2	33,3	36,7	39,6
Ciprofloxacine	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamides	12	4	17	31,2	29,7	17,5	16,4	18,8
Triméthoprim	20	2,4	18	29,9	29,7	8,8	10,9	18,8
Chloramphénicol	6	6	2	5,2	16,2	0	1,8	0
Tétracycline	24	10	16	23,4	25,7	14	27,3	27,1

n : nombre de souches étudiées

N : nombre de souches (une seule par patient) du sérotype reçues au CNR-ESS

A partir de 2003, des souches résistantes aux C3G ont été détectées chez le sérotype Virchow. L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance des souches isolées entre 2003 et 2005 (Weill et al. J Clin Microbiol 2004 et Bertrand et al. J Clin Microbiol 2006) ont permis d'identifier les BLSE CTX-M-2 (phénotype ACroSuTmptTeNal, prévalence de 2 % en 2003, de 6,5 % en 2004 et de 1% en 2005), CTX-M-9 (phénotype ACroSSpKSuTmptTeNal, prévalence de 1 % en 2003), TEM-52 (phénotype ACazNal, prévalence de 1 % en 2005) et SHV-12 (phénotype ACazSSpKGSuTmptCTeNal, prévalence de 1 % en 2005).

Les 3 souches en 2007 avaient les profils « ACazNal » (TEM-52, n= 1; CTX-M-32, n=1) et « ACroSSpKSuTmptTeNal » (CTX-M-9, n=1) et les 4 souches résistantes aux C3G en 2009 avaient les profils « ACazNal » (TEM-52, n=3) et « ACroSSpSuTmptNal » (CTX-M-9, n=1). Une souche de profil « ACazNal » (TEM-52) a été isolée en 2010. En 2011 et 2013, aucune souche résistante aux C3G n'a été isolée. En 2012, une souche de BLSE de profil « ACroSSpSuTmptNal » (CTX-M) a été isolée. Depuis 2012, des souches contenant un gène *qnrS* (6 en 2012 et 9 en 2013, dont 5 associées avec un voyage en Tunisie) ont été identifiées.

1.3.2.19 Souches de *Salmonella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques détectées au CNR-ESS en 2014

1.3.2.19.1 Souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération

Deux mécanismes de résistance aux C3G et communs aux entérobactéries sont décrits chez *Salmonella*. Ces mécanismes de support plasmidique sont la production d'une BLSE et/ou la production d'une céphalosporinase (AmpC). Ils sont émergents chez *Salmonella*.

a- Salmonella productrices de b-lactamases à spectre étendu reçues au CNR-ESS en 2014

Sérotype	N ¹	Lieu de l'isolement	Type de la BLSE	Résistance associée ²	Souche	Renseignements épidémiologiques
Agona	1	Le Haillan (33)		SSpTGSuTmpCTeNal	2014/02373	Contexte inconnu
Corvallis	1	Angers (49)		SSpTGSuTmpCTe	2014/11738	Séjour en Thaïlande
Heidelberg	1	Bordeaux (33)		SpKTNGAISuTmpNal	2014/09979	Séjour en Algérie
Indiana	1	Chalon-sur-Saône (71)	CTX-M-1	SSpSuTmpCET ⁶	2014/09917	Pas de notion de voyage
Infantis	3	Levallois-Perret (92)	CTX-M-9	SSpKTGSuCTeNal	2014/03980	Séjour au Pérou
		Thionville (57)		KSuTmpTeNal	2014/04484	Contexte inconnu
		Pessac (33)		SSpKTNGSuTmpTeNal	2014/06704	Contexte inconnu
Kentucky	1	Aubervilliers (93)	CTX-M ³	SuTeNalCip	2014/02058	Séjour en Tunisie
Montevideo	1	Brive (19)	CTX-M-9	SpSu	2014/01238	Lien avec épidémie hospitalière Limoges
Typhimurium	1	Moulins (03)	CTX-M ³	SSpKTGSuTmpCTeNal ⁴	2013/08471	Séjour au Maroc
	1	Poitiers (86)	CTX-M ³	SSpTSuTmpCTeNal ⁴	2014/08486	Contexte inconnu
	1	St Germain-en-Laye (78)	CTX-M ³	SSpSuTmpCTeNal ⁴	2014/08816	Contexte inconnu
	1	Charenton (94)	CTX-M ³	SSpSuTmpCTeNal ⁴	2014/09306	Contexte inconnu
	1	L'Isle-Adam (95)	CTX-M ³	SSpSuTmpCTe	2014/09374	Contexte inconnu
	1	Montevrain (77)	CTX-M ³	SSpTSuTmpCTeNal ⁴	2014/10813	Contexte inconnu
	1	L'Isle-Adam (95)	CTX-M ³	SSpSuTmpCTeNal ⁴	2014/12263	Contexte inconnu
	1	Vannes (56)	CTX-M ³	SSpTSuTmpCTeNal ⁴	2014/12324	Contexte inconnu

¹Nombre de souches (une souche par patient).

²Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; T, tobramycine; G, gentamicine; A, amikacine; N, netilmicine; I, isépanamicine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine; Azi, azithromycine; ET, ertapénème.

³Groupage par PCR. Séquençage en cours pour détermination précise de l'allèle.

⁴Présence de gène de résistance aux quinolones de type *qnr*.

⁵Résistance associée aux carbapénèmes, mécanisme inconnu.

b- Salmonella productrices de céphalosporinases plasmidiques reçues au CNR-ESS en 2014

Sérotype	N ¹	Lieu de l'isolement	Type de la céphalosporinase	Résistance associée ²	Souche	Renseignements épidémiologiques
Agona	1	Henin Beaumont (62)	CMY ³	SSuTmpCTe	2014/01541	Contexte inconnu
Kentucky	1	Barentin (76)	CMY ³	SSpGSuTeNalCip	2014/04795	Séjour au Maroc
Panama	1	Cayenne (973)	CMY ³	Tmp	2014/00747	Contexte inconnu
Typhimurium	1	Cahors (46)	CMY ³	SSpKTGSuTmpCTeNalCip	2014/06409	Contexte inconnu
	1	Paris (15 ^e)	CMY ³	SSpSuTmpCTeNal	2014/11834	Séjour au Mexique

¹Nombre de souches (une souche par patient).

²Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Ak, amikacine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine.

³Groupe par PCR. Séquençage en cours pour détermination précise de l'allèle.

Les souches de *Salmonella* résistantes aux C3G étaient rares jusqu'en 2009, mais depuis elles sont de plus en plus fréquemment isolées.

Les études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR-ESS de 1993 à 2007 par échantillonnage des deux sérotypes majeurs, Enteritidis et Typhimurium (2718 souches testées) n'ont mis en évidence que quatre souches résistantes (0,15%), dont trois de sérotype Typhimurium. Un nombre croissant de souches résistantes aux C3G pour Typhimurium et son variant monophasique est observé au CNR-ESS, avec 9 souches en 2008 (7 Typhimurium et 2 monophasiques) et 12 en 2009 (9 Typhimurium et 3 monophasiques). L'année 2010 a été exceptionnelle avec l'épidémie nationale à *S. enterica* sérotype Typhimurium produisant simultanément une CTX-M-1 et une CMY-2 (plus de 40 cas).

D'autres sérotypes sont, depuis quelques années, particulièrement affectés par cette résistance comme Virchow avec 15 souches sur 689 testées (2,2%) entre 1997 et 2007 (CTX-M-2; CTX-M-9; TEM-52; SHV-12), Newport avec 58 souches sur 936 testées (6,2%) entre 1997 et 2008 qui produisaient la céphalosporinase CMY-2 et pour les Kentucky du clone ST198 déjà résistantes à la ciprofloxacine et qui expriment depuis 2010 des résistances aux C3G (CMY, CTX-M ou SHV) et à l'imipénème (OXA-48 ou VIM-2). L'atteinte préférentielle de ces sérotypes est un phénomène observé sur le plan international et serait vraisemblablement consécutif à l'utilisation de C3G dans la filière animale (bovins pour Newport et volailles pour Virchow et Kentucky). A côté de ces sérotypes majeurs, le CNR-ESS détecte des sérotypes rares producteurs de BLSE (Babelsberg, Concord, Derby, Waycross, Havana, Telelkebir, Nima...) depuis 2003. Le plus souvent il s'agit de salmonelles sélectionnées par une mauvaise utilisation de C3G chez des enfants candidats à l'adoption dans leur pays d'origine (Mali, Ethiopie et Vietnam). Des épidémies hospitalières sont également révélées avec un nombre de cas faible mais persistant sur plusieurs années au sein d'une même structure de soin. Des mesures de contrôles spécifiques permettent généralement leur éradication.

c- Salmonella productrices de carbapénémases reçues au CNR-ESS en 2009-2014

Sérotype	Année	N ¹	Lieu de l'isolement	Type de la carbapénémase	Phénotype de résistance ²	Souche	Renseignements épidémiologiques
Indiana	2014	1	Chalon-sur-Saône (71)	En cours	ACroCazFoxSSpSuTmpC	2014/09917	Acquisition hospitalière
Kentucky	2010	5	Maroc	VIM-2	ACroCazFoxSSpKTNGAISu TeNalCip	2010/01922- 1926	Maroc
Kentucky	2011	1	Nantes (44)	OXA-48	ANalCipAzi	2010/00664	Séjour en Egypte
Kentucky	2013	1	Argenteuil (95)	OXA-48	SSpGSuTmpTeNalCipAzi	2013/01062	Séjour en Algérie
Saintpaul	2009	1	Nantes (44)	OXA-48	A	2009/07981	Séjour en Egypte
Westhampton	2012	1	La Réunion	NDM-1	ACroCazFoxSSpKTNGAISu NalCipAzi	2012/02116	Séjour en Inde

¹Nombre de souches (une souche par patient).

²Abréviations utilisées: S, streptomycine; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; To, tobramycine; G, gentamicine; Ak, amikacine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine.

Les souches de *Salmonella* productrices de carbapénémases sont encore très rarement décrites. Cependant, quelques souches apparaissent, en particulier chez le clone multi-résistant Kentucky ST198 Cip^R « X1-ST198-SGI1-Ks » (voir ci-dessous).

1.3.2.19.2 Souches résistantes à la ciprofloxacine

La résistance à la ciprofloxacine définie *in vitro* par une concentration minimale inhibitrice (CMI) supérieure à 1 mg/L (communiqué 2013 du CA-SFM) reste de vigueur pour ce rapport 2014. Les versions futures du CA-SFM (2014) sont fortement modifiées pour s'harmoniser avec les recommandations européennes EUCAST où la résistance à la ciprofloxacine sera définie avec une CMI > 0,06 mg/L. Le suivi des résistances à cette molécule clé de traitement des salmonelloses sévères sera *de facto* impossible. Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont principalement des modifications au niveau du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. L'accumulation de mutations et la présence additionnelle d'un mécanisme d'efflux ou de facteurs plasmidiques comme les gènes *qnr* et le gène *aac6'-Ib-cr* augmentent le niveau de résistance de ces souches.

a- Souches du sérotype Typhimurium et 1,4,[5],12:i:- (monophasique) résistantes à la ciprofloxacine détectées au CNR-ESS entre 2002 et 2014

Ces souches pour la plupart isolées de 2002 à 2008 possédaient une CMI à la ciprofloxacine supérieure à 16 mg/L. Une étude des mécanismes de résistance à la ciprofloxacine a montré que ces souches présentaient deux substitutions significatives dans GyrA (Ser83Phe et Asp87Asn), une dans GyrB (Ser464Phe) et une dans ParC (Ser80Arg). Un mécanisme d'efflux était également présent. Une étude par électrophorèse en champ pulsé (*XbaI* et *BlnI*) ainsi qu'une étude par les méthodes MLVA et CRISPOL a montré que ces souches étaient clonales, à l'exception des deux souches isolées en 2009 (XTYM-118) et qui présentaient une CMI plus basse à 2 mg/L.

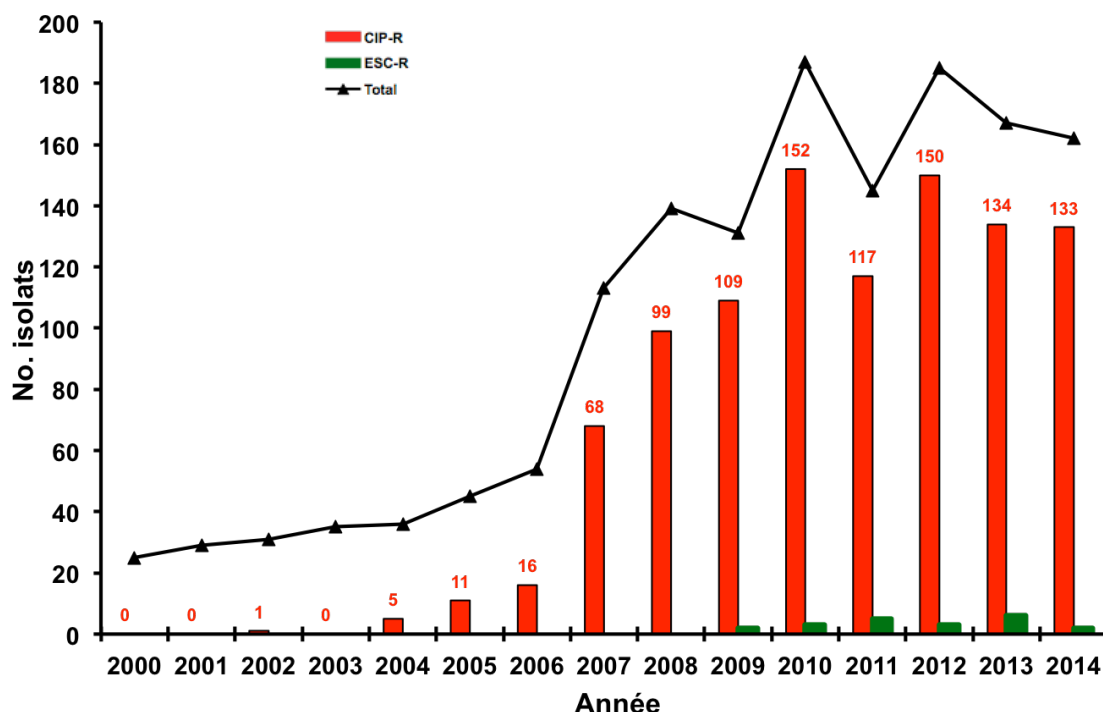
Les souches résistantes à la ciprofloxacine (Cip^R) en dehors du sérotype Kentucky (voir ci-dessous) sont exceptionnelles dans le genre *Salmonella*. Les différentes études de sensibilité

aux antibiotiques menées par le CNR entre 1997 et 2007 sur 6880 souches échantillonnées appartenant aux 15 principaux sérotypes n'avaient mis en évidence que deux souches résistantes (< 0,1 %). Il s'agissait d'une souche de sérotype Typhimurium (02-8213) isolée en 2002 et d'une souche de sérotype Virchow (05-1106) isolée en 2005. Les différentes souches de sérotype Typhimurium mentionnées dans le tableau précédent ont été identifiées hors étude de prévalence par l'analyse des résultats d'antibiogrammes fournis systématiquement par les laboratoires correspondants en même temps que les souches à sérotyper. La faible prévalence de ces souches Cip^R sur le territoire national ainsi que sur le plan international pourrait être expliquée par une diffusion liée à un contact direct avec des nouveaux animaux de compagnie (dont les reptiles) porteurs sains (la souche ayant vraisemblablement été sélectionnée par l'usage prophylactique d'enrofloxacin dans les animaleries). De telles souches ont été décrites comme émergentes en Chine (Cui et al. Emerg Infect Dis. 2008, Xia et al. J Clin Microbiol. 2009). Une analyse comparative des profils PFGE et CRISPOL a montré que nos souches, les souches chinoises et des souches vietnamiennes étaient clonales. Une recherche chez des reptiles d'importation est toujours en cours. Un nouveau cas humain a été identifié en 2014, dont la résistance de haut-niveau à la ciprofloxacine a été associée à une céphalosporinase de haut-niveau.

b- Souches du sérotype Kentucky résistantes à la ciprofloxacine détectées au CNR-ESS, 2000-2014

Nous avons publié en 2006 (Weill et al. Emerg Infect Dis) une étude sur des souches de sérotype Kentucky Cip^R reçues au CNR-ESS entre 2002 et 2005. Pendant cette période, 197 souches humaines ont été analysées au CNR *Salmonella* (sur un total de 69,759 souches de *Salmonella* sérotypées) et 17 étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 4 et 16 mg/L). Nous avons établi une surveillance continue et prospective sur ces souches responsables de l'émergence actuelle de ce sérotype (**Figure 5**).

Figure 5. Evolution du nombre de souches du sérotype Kentucky détectées au CNR-ESS selon leur profil de résistance



La première souche de sérotype Kentucky Cip^R avait été isolée en décembre 2002 en France chez un touriste français qui avait souffert d'une gastroentérite au cours d'une croisière sur le Nil. Depuis, un nombre croissant de ces souches avait été isolé lors de salmonelloses au cours ou au décours d'un voyage en Egypte ou en Afrique de l'Est (2000-2005) puis Afrique du Nord (Maroc principalement) et Afrique de l'Ouest (2006-2009).

Le typage moléculaire a révélé que ces souches appartenaient à un seul clone « X1-ST198-SGI1-Ks » défini par le profil PFGE X1, le séquençotype ST198 et la présence de l'îlot génomique SGI1 variant -Ks (et ses dérivés -Ps, -Qs). L'étude des mécanismes de résistance à la ciprofloxacine avait identifié deux substitutions significatives dans GyrA (Ser83Phe et Asp87Gly/Asn ou Tyr) et une dans ParC (Ser80Ile).

Une collaboration internationale a révélé l'émergence, à l'échelon mondial, de ce clone et la similarité des souches humaines Cip^R avec des souches aviaires (poulets et dindes), aquacoles (fruits de mer) et environnementales (épices) de pays d'Afrique (Le Hello et al. J Infect Dis 2011, Le Hello et al. Antimicrob Agents Chemother 2013 et Le Hello et al. Front Microbiol 2013).

Le suivi de ce clone par le CNR-ESS indique que cette souche s'est installée en Europe (élevage de dinde en Pologne), au Moyen-Orient, dans le sous-continent Indien et en Asie du Sud-Est et présente, désormais, des résistances additionnelles aux C3G (CTX-M, CMY ou SHV) ou aux carbapénèmes (OXA-48, VIM-2 ou NDM-1) (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013 et données personnelles).

Très récemment, les premières souches de Kentucky Cip^R ont été isolées d'élevage de volailles françaises (Guillon et al. BE 2013)

1.3.2.19.3 Souches de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine d'origine plasmidique en 2014

La résistance aux fluoroquinolones peut être également le fait de facteurs plasmidiques comme les gènes *qnr A, B, S* et le gène variant *aac6'-Ib-cr* qui augmentent le niveau de résistance de ces souches aux fluoroquinolones. Les études de sensibilité aux antibiotiques menées par le CNR-ESS par échantillonnage en 2013 permettent de confirmer la présence de ces gènes pour les souches suivantes :

Sérotype	N	Lieu probable de contamination	CMI (mg/L)			Résistance associée	gène impliqué
			Nal	CIP	AZI ¹		
Agona	11	Thaïlande (2) Vietnam (2) Cambodge (1) Inconnu (6)	12-24	0,25	3	ASSuTmpTe (TEM)	<i>qnrS</i>
Chester	67	Maroc	16-48	0,38	4	SSuTmpCTe	<i>qnrB19</i> <i>qnrSI</i>
Corvallis	1	Vietnam	24	0,38	>256	SSpSuTmpTeAzi	<i>qnrS</i>
Typhimurium	1	Malaisie	12	0,25	6	SKTe	<i>qnr</i>
	7	France	16	0,25	4	ACroSSp(T)SuTmpCTe (CTX-M)	<i>qnrA</i>
Virchow	3	Tunisie (1) Inconnu (2)	16	0,19	3	STe	<i>qnrS</i>

¹Nombre de souches (une souche par patient).

²Abréviations utilisées: A, amoxicilline; Fox, cétoxité; Cro, ceftriaxone; Caz, ceftazidime; S, streptomycine ; Sp, spectinomycine; K, kanamycine; T, tobramycine; G, gentamicine; N, nétilmicine; Su, sulfamides; Tmp, triméthoprim; C, chloramphénicol; Te, tétracycline; Azi, azithromycine.

³Présence du gène *mphA* codant pour la résistance à l'azithromycine

La majorité des souches ayant acquis une résistance diminuée à la ciprofloxacine médiée par un plasmide possédaient le gène *qnrS*. Elles ont été isolées chez des patients qui revenaient majoritairement d'un séjour en Asie (Corvallis) ou du Maghreb, Tunisie (Virchow), Maroc (Chester). Depuis septembre 2014, une épidémie importante à sérotype Chester sévit au Maroc, la confirmation de la source est toujours en cours et les souches ont la particularité de posséder soit le gène *qnrSI* soit le gène *qnrB19* (paragraphe 1.3.4).

1.3.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Chaque année le CNR-ESS adresse à deux instances internationales, l'OMS et l'OIE, des données sur le nombre de *S. enterica* sérotypes Enteritidis et Typhimurium isolées en France.

Les souches étudiées au CNR-ESS dont les formules antigéniques ne figurent pas dans le schéma de White-Kauffmann-Le Minor sont transmises pour validation au Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella* (CCOMS) dont les responsables sont ceux du CNR-ESS. En 2014, le CNR-ESS a adressé au CCOMS les putatifs nouveaux sérotypes ou nouveaux variants suivants:

- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 17:c:e,n,x
- le putatif nouveau sérotype d'espèce *bongori* de formule 57:i:-
- le putatif nouveau sérotype de sous-espèce *diarizonae* de formule 61:l,v:1,5,7:Rz99
- le putatif nouveau sérotype (nom en cours d'homologation) de sous-espèce *enterica* de formule 4,12:j:-

et a confirmé les sérotypes suivants :

- le nouveau sérotype **Lubbock** de sous-espèce *enterica* de formule 6,7:g,m,s:e,n,z15
- le nouveau sérotype **Amiens** de sous-espèce *enterica* de formule 17:r:1,5
- le nouveau sérotype **Orne** de sous-espèce *enterica* de formule 9,12:a:z6

Les responsables du CNR-ESS participent au réseau Global Foodborne Infections Network de l'OMS comme enseignants pour la partie microbiologique (cours théoriques et travaux pratiques) lors de formations organisées par ce réseau. L'édition 2007 du schéma de White-Kauffmann-Le Minor par P.A.D. Grimont et F.X. Weill est accessible en version française sous forme d'un fichier pdf téléchargeable à l'adresse suivante : www.pasteur.fr/ccoms/salmonella

1.3.4 Contribution à l'alerte et à l'investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux à *Salmonella* en 2014

En 2014, le CNR-ESS a participé aux investigations des cas groupés à *Salmonella* suivantes :

- à l'investigation microbiologique de cas groupés d'infections par le variant monophasique 4,5,12:i:- du sérotype Typhimurium, en région parisienne, mars 2014. Le CNR-ESS a réceptionné la 3ème semaine de mars un nombre anormalement élevé de souches de sérotype 4,5,12:i:- dans le département des Hauts-de-Seine (92). Ce regroupement de cas concernait une dizaine d'enfants âgés de 4 mois à 10 ans. Le regroupement géographique des cas, l'absence d'excès de cas de salmonellose causés sérotype 4,5,12:i:- dans d'autres départements et régions et la fugacité de l'épidémie (2 semaines) était en faveur d'une contamination par un produit alimentaire avec un circuit de distribution limité et avec une date de consommation courte. L'absence de cas adultes et le faible nombre de cas hospitalisés étaient de plus des éléments en faveur d'une faible contamination du produit concerné. L'investigation épidémiologique a finalement suggéré comme la cause de la contamination un saucisson distribué par une seule chaîne d'hypermarché.

- à la détection et à l'investigation microbiologique d'une augmentation du nombre de cas à sérotype Havana en Auvergne et Rhône-Alpes en avril-juin 2014. Les résultats des enquêtes épidémiologiques et de traçabilité menées suite aux interrogatoires des cas ont indiqué que 100% des personnes interrogées avaient consommé un même lot de saucisson sec ; les saucissons étant achetés chez différents commerçants livrés par un même producteur dans le département de la Haute-Loire. Une comparaison par PFGE effectuée par l'ANSES a indiqué la similitude du profil des souches humaines et des souches isolées du saucisson sec. Il est intéressant de souligner que cette souche épidémique de sérotype Havana semble être présente depuis 2013 en France en filière porcine comme en filière volaille. L'analyse par WGS de 29 souches humaines et non humaines par le CNR-ESS a confirmé cette hypothèse de contamination inter-filière.
- à la détection et à l'investigation microbiologique d'une augmentation de salmonelloses à sérotype Kedougou en mai 2014. Cette augmentation progressive de cas entre mai et juin 2014 concernait une quarantaine de personnes principalement âgées de plus de 65 ans sans regroupement géographique particulier. L'investigation épidémiologique commencée le 18 juin a permis très rapidement de retrouver la consommation de lots de reblochon comme source. Des souches de ce sérotype rare (moins de 20 cas par an recensé au CNR-ESS) ont été retrouvées sur du reblochon fabriqué en Haute-Savoie. La quantité produite, potentiellement contaminée, était importante ce qui a nécessité une information à l'échelle européenne et un retrait-rappel d'une tonne de reblochon par le producteur. L'analyse WGS par le CNR-ESS a permis de révéler 2 sous-groupes épidémiques. L'hypothèse d'une contamination par différents lots n'a pas pu être confirmée. Après le retrait-rappel fin juin, plus aucun cas n'a été détecté au CNR-ESS.
- à l'investigation microbiologique de plusieurs toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à sérotype Enteritidis dans l'Est de la France. Le 1^{er} août 2014, l'InVS signalait à travers la plate-forme épidémiologique européenne (EPIS-FWD) six TIAC à sérotype Enteritidis survenues dans l'Est de la France entre le 23 juin et le 21 juillet. L'investigation épidémiologique a permis de faire le lien avec des œufs produits en Allemagne. Suite à cela, l'Autriche, le Luxembourg, l'Angleterre et l'Allemagne ont reporté également des cas en lien avec les mêmes lots d'œufs dans chacun de leur pays. Les souches humaines des différents pays et les souches isolées des œufs présentaient le même profil de lysotypage, PT14b et de MLVA, 2-12-7-3-2 (selon le schéma d'Hopkins et al. Euro Surveill 2011) et étaient sensibles à tous les antibiotiques testés. Une analyse WGS des souches épidémiques menée par les anglais a permis de faire le lien avec 3 sites de production d'œufs en Bavière. Un retrait-rappel des œufs a permis de contrôler l'épidémie.
- à l'investigation microbiologique suite au signalement de la Belgique sur la plate-forme épidémiologique européenne EPIS de l'ECDC d'une augmentation de cas de salmonelloses à sérotype Chester chez des patients de retour du Maroc. En France, plus de 80 cas humains ont été recensés en 2014 et l'épidémie se prolonge toujours en 2015. Les investigations épidémiologique et microbiologique sur le plan Européen ont été menées par l'InVS et le CNR-ESS, respectivement. La majorité des souches contenaient deux types de gènes *qnr*, *qnrB19* et *qnrS1*. Toutes les souches avaient été acquises préférentiellement sur le littoral marocain et la consommation de fruits de mer a été suspectée. Le CNR-ESS a analysé par WGS une quarantaine de souches humaines provenant de France, de Belgique et du Danemark et trois souches

alimentaires, deux de poulet du Maroc et une de sardine, isolée en Grèce mais importée du Maroc. L'analyse préliminaire des génomes indique deux groupes, l'un comprenant les souches des cas humains associé aux souches isolées du poulet et l'autre avec des cas humains. La souche de sérotype Chester isolée de sardine est en cours de séquençage. L'épidémie continue en 2015 mais reste limitée du fait de mouvements en provenance du Maroc plus faible qu'en septembre.

- à la détection et à l'investigation microbiologique de cas groupés de salmonelloses à sérotype Hadar survenues dans le département de la Saône-et-Loire en novembre 2014. Au final, 13 cas de salmonellose ont été identifiés et la consommation de dinde suspectée du fait de l'isolement de la souche sur un éleveur local avec un même profil d'antibiorésistance de type « STeNal » et de PFGE. Ce profil épidémique est très proche de celui retrouvé chez un éleveur de dinde du département de la Drôme dont l'élevage est connu pour être contaminé depuis 2010. Aucun nouveau cas a été identifié depuis décembre 2014 suite aux mesures sanitaires (retrait-rappel et abattage) prises par l'éleveur de Saône-et-Loire..

1.3.5 Contribution à la diffusion des données de surveillance et production du CNR

Les rapports d'activité complets du CNR-ESS (depuis celui de 2003) sont consultables (fichiers pdf) sur le site web de l'Institut Pasteur à l'adresse suivante : <http://www.pasteur.fr/cnr/salmonella>

Escherichia coli

2/ *Escherichia coli*

2.1 Missions du CNR

Voir annexe 1

2.2 Activités d'expertise pour l'année 2014

2.2.1 Evolution des techniques au cours de l'année 2014

Pour l'année 2014, le CNR-ESS a mis en place en routine le sous typage des gènes *stx*.

2.2.2 Inventaire global des prélèvements et souches reçus au CNR-ESS-LA en 2014

En 2014, un total de 1210 souches de *E. coli*, 744 prélèvements de selles, 397 sérums ont été analysés au CNR-ESS.

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

Activité	Type de prélèvement	CNR-ESS	LA-RD	Total
<i>E. coli</i>	Selles ou écouvillonnage rectal	263	487	750
	Sérums	404	-	404
	Extrait d'ADN de selles	1	15	16
	Souches humaines isolées de :			
	Selles ou écouvillonnage rectal/anal	720	103	823
	Biopsies	34	5	39
	LCR		11	11
	Sang	3	28	31
	Urines	4	7	11
	Liquide gastrique		2	2
	Liquide amniotique		1	1
	Prélèvements respiratoires		2	2
	Autres	6		6
	Sous-total souches humaines	767	159	926
	Autres origines			
	Origine animale/alimentaire	98	145	243
	Total prélèvements	1533	806	2339

2.2.3 Bilan des activités concernant les EHEC

2.2.3.1 Analyse de la répartition des symptômes ayant motivé une analyse de selles ou de souches

Les symptômes donnant lieu à une recherche de EHEC, sont indiqués dans le **tableau 2** ci-dessous.

Symptômes observés	Souches/selles	Sérums
Diarrhée glairo-sanglante ou diarrhée sanglante	156	131
SHU/suspicion de SHU	164	13
Diarrhée/gastro-entérite aiguë	70	18
Diarrhée au retour de voyage	5	-
Entourage de SHU	39	
Colite hémorragique	9	
Anémie, thrombopénie	4	
Contrôle post-azithromycine	10	
Choc septique/toxinique	16	
Insuffisance rénale aiguë	4	
Microangiopathie thrombotique	35	1
Angiocholite	1	

*SHU : syndrome hémolytique et urémique

2.2.3.2 Résultats obtenus sur les prélèvements de selles en 2014

Sur les 750 prélèvements de selles reçus, la **recherche directe** des gènes de pathogénicité par amplification génique *in vitro* a été positive pour **227 selles** soit 30.3 % des selles reçues.

En 2014, 218 patients ont eu une recherche de EHEC positive (isolement de souche ou PCR positive)

Les résultats de la PCR directe sur les selles ont été corrélés aux résultats obtenus après culture de celles-ci à l'exception de 47 patients pour lesquels, la PCR directe de recherche des Shiga-toxines sur les selles était positive sans qu'aucune souche EHEC n'ait pu être isolée.

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

La présence des gènes *stx1* et *stx2* codant respectivement les Shiga-toxines (ou Verotoxines) STX1 (ou VT1) et STX2 (ou VT2) et leurs variants a été recherchée dans tous les prélèvements et/ou souches reçus. Le gène *eae*, codant l'attachement et l'effacement aux cellules épithéliales présents chez les EHEC et les EPEC, a également été recherché.

En 2014, 180 souches de EHEC ont été confirmées ar le CNR-ESS.

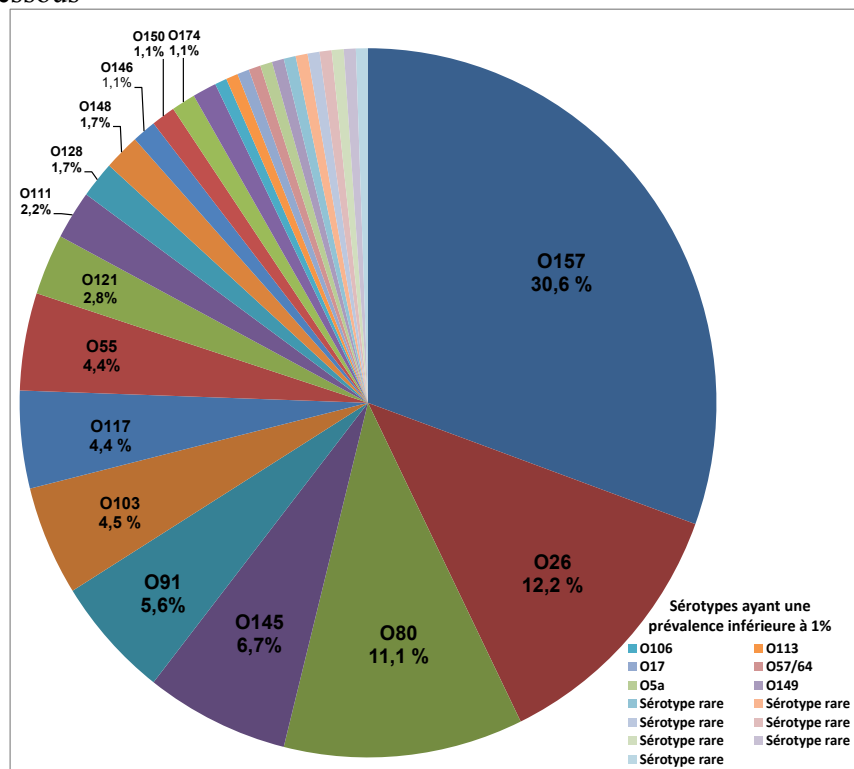
Ces souches ont été isolées chez 171 patients (co-infections pour 6 patients)

Les sérogroupes majoritairement isolés en France en 2014 étaient : **O157** (30,3%), **O26** (12,2%) et **O80** (11,1%).

Le **sérogroupe O80** est le troisième sérogroupe retrouvé en France en 2014, il représentait 9% des souches de EHEC isolées en 2013, et 4% en 2012. Ce sérogroupe est essentiellement isolé chez des enfants (17 cas sur 20). Tous les enfants, sauf un, étaient âgés de moins de 3 ans et ont tous développé un SHU.

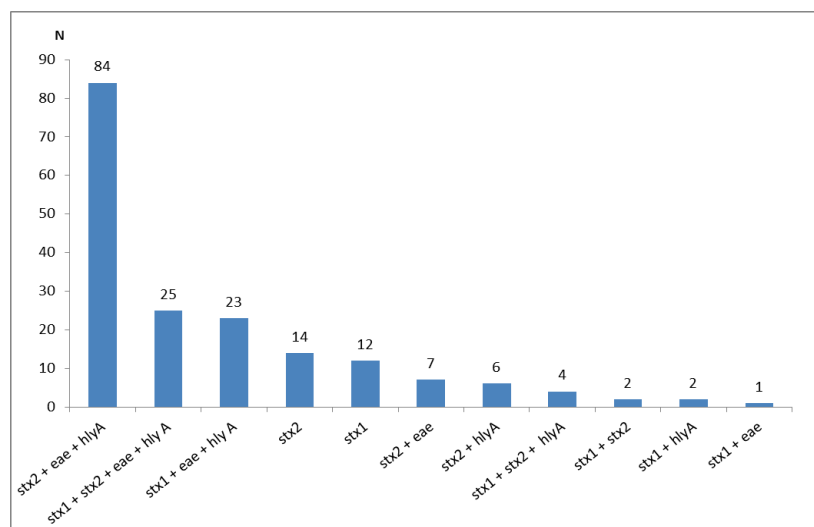
Aucune souche appartenant au sérotype O104 n'a été isolée en 2014.

La répartition des différents sérogroupes de EHEC isolés en 2014 est représentée dans la **figure 6** ci-dessous



L'analyse des profils de virulence montrent que le profil le plus souvent retrouvé est le profil *stx2+ eae +hlyA* (46,7% des souches,tous sérotypes confondus).

La distribution des différents profils de virulence des souches de EHEC isolées en 2014 est indiquée dans la **figure 7** ci-dessous.



La répartition des souches de EHEC (n=180) en fonction du séro groupe et du profil de virulence est représentée respectivement dans :

- le **tableau 3a** avec la liste des souches de EHEC appartenant aux sérogroupes les plus fréquemment incriminés dans les infections à EHEC et regroupant un total de 165 souches.
- Le **tableau 3b** liste les sérogroupes les moins fréquemment rencontrés et regroupant un total de 15 souches.
Les souches sérogroupées par agglutination à l'aide de sérums sont notés O. Les souches n'ayant pas agglutiné avec les sérums disponibles au CNR-ESS-LA ont été sérotypées par une méthode moléculaire et sont notées R (pour l'antigène O) et F (pour l'antigène H).

Le profil *stx2+ eae +hlyA* est majoritairement retrouvé dans le séro groupe O157 (67,3% des souches), dans le séro groupe O80 (85% des souches) et dans le groupe O145 (58% des souches).

Le profil *stx1+ eae +hlyA* a été majoritairement retrouvé dans les sérogroupes O26 et O103.

Tableau 3a. Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les plus fréquemment isolés en 2014

Profil de virulence	O157	O26	O80	O145	O91	O103	O117	O55	O121	O111	O128	O148	O146	O150	O174
<i>stx2 + eae + hlyA</i>	37	6	17	7				8	5					1	
<i>stx1 + stx2 + eae + hly A</i>	15	1	1	3		2				2				1	
<i>stx1 + eae + hly A</i>		13				6				2					
<i>stx2</i>					8							1			1
<i>stx1</i>	1						8				2				
<i>stx2 + eae</i>	2	2	1								1				
<i>stx2 + hlyA</i>			1	2											
<i>stx1 + stx2 + hlyA</i>												1	1		1
<i>stx1 + stx2</i>					2										
<i>stx1 + hlyA</i>												1	1		
<i>stx1 + eae</i>						1									
Total	55	22	20	12	10	9	8	8	5	4	3	3	2	2	2

Tableau 3b : Profil de virulence des sérogroupes de EHEC les moins fréquemment isolés en 2014

Profil de virulence	Nombre de souches	Sérotype
<i>Stx2+eae+hlyA</i>	3	R17:F19, NC1
<i>Stx1+eae+hlyA</i>	2	R5a:F-, NC2
<i>Stx2</i>	4	O149, R106/F18, NC3, NC4
<i>Stx1</i>	1	R57/64/F19
<i>Stx2+eae</i>	1	R113:F21
<i>Stx2+hlyA</i>	3	NC5, NC6, NC7
<i>Stx1+stx2+hlyA</i>	1	NC8 :F18
Total	15	

NC¹ : profils de restriction pour l'antigène O obtenus après sérotypage moléculaire sans profil similaire dans la base de données du CNR-ESS

Pour 47 patients, les PCR directes sur les selles ou à partir de cultures sur gélose d'isolement étaient positives sans qu'aucune souche n'ait pu être isolée.

Le profil de virulence de ces 47 cas figure dans le **tableau 4** ci-dessous.

Profil virulence / PCR positive dans les selles	N patients
<i>stx2+ eae+ hlyA</i>	28
<i>stx2</i>	5
<i>stx1+ stx2+ eae+hlyA</i>	5
<i>stx2+ eae</i>	2
<i>stx1+ stx2+ hlyA</i>	2
<i>stx1</i>	1
<i>stx1+ stx2</i>	1
<i>stx1+ eae+hlyA</i>	1
<i>stx1+ hly A</i>	1
<i>stx2+ hly A</i>	1
Total	47

Pour ces patients, une PCR, mise au point au LA-RD et détectant les sérotypes majeurs avait donné les résultats suivants (**tableau 5**) :

Tableau 5. Résultats du sérotypage par PCR directement sur selles (LA-RD)

PCR serotypage/masse ou selles	N
O157	3
O80	3
O26	2
O91	2
O103	2
O145	1
O111	1
O26+O80	1
O55+O80	1
NT*	31

* NT : souches non typables

2.2.3.4 Analyse des variants des gènes *stx* (CNR-ESS-LA)

La mise en évidence des **variants des gènes *stx*** a été réalisée sur 180 souches isolées en 2014. Le variant *stx2a* a été retrouvé chez 45.5% des souches, seul (n=63) ou associé à d'autres variants (n=19). Le variant *stx1a* a été retrouvé chez 36,6% des souches, seul (n=36) ou associé à d'autres variants *stx2* (n=30).

Pour les 119 patients pour lesquels l'information clinique est précisée, le variant *stx2a* a été retrouvé, seul ou associé, plus souvent au cours des SHU (63%) que dans les diarrhées sanglantes (24%).

La répartition des profils des variants en tenant compte des sérogroupes les plus fréquents et les plus rares sont regroupés respectivement **dans les tableaux 6a et 6b ci-dessous** :

Tableau 6a : répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes les plus fréquents

Profil des variants	Sérogroupes															
	O157	O26	O80	O145	O91	O103	O117	O55	O121	O111	O128	O148	O146	O150	O174	O ?F25
<i>stx2a</i>	21	6	2	4					5					1		2
<i>stx1a</i>	1	13				7	8			2	2	1				
<i>stx2a, stx2c</i>	9															
<i>stx2c, stx2d</i>		1	10	1	3			7								
<i>stx1a, stx2a</i>	4			3		2				2		1		1	1	
<i>stx2a, stx2d</i>	1															
<i>stx2d</i>		1	6		3			1				1				
<i>stx1a, stx2c</i>	7															
<i>stx1a, stx2a, stx2c</i>	3															
<i>stx1a, stx2d</i>		1														
<i>stx1a, stx2c, stx2d</i>	1															
<i>stx1c</i>													1			
<i>stx2a, stx2c, stx2d</i>	4															
<i>stx2b</i>					1											
<i>stx2c</i>	3		2	4											1	
<i>stx1c, stx2b, stx2d</i>																
<i>stx1a stx2b</i>					1											
<i>stx1a stx2b stx2d</i>					1											
<i>stx1c, stx2d</i>	1															
<i>stx2f</i>											1					
<i>stx2c, stx2f</i>					1											
<i>stx1c, stx2b</i>													1			
Total	55	22	20	12	10	9	8	8	5	4	3	3	2	2	2	2

Tableau 6b : répartition des profils de variants en fonction des sérogroupes les plus rares

Profil des variants	Sérogroupes					
	O106	O113	O17	O57	O149	Autres
<i>Stx1a</i>				1		2
<i>Stx2a</i>		1	1		1	5
<i>Stx2d</i>	1					1
Total	1	1	1	1	1	8

2.2.3.5 Autres facteurs de virulence

La recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence des *E. coli* enteroaggrégants (*aggR*, *pic*, *astA*) et celle du gène *saa* ont été réalisées sur les souches ne possédant pas le gène *eae* (n = 40).

Ces gènes ont été retrouvés chez 3 souches responsables de SHU:

- gène *astA* :
 - deux souches possédant le gène *stx2a* appartenant respectivement aux sérotypes moléculaires R128:F10 et NC5:F27

- gène *saa* : une souche possédant le gène *stx2a* et appartenant au sérotype moléculaire NC6:F19

NB : (NC : profil de restriction de l'antigène O non connu dans la base de données du CNR-ESS)

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

La mise en évidence des EHEC a été réalisée dans l'entourage de cas de SHU, soit 39 personnes prélevées dans l'entourage familial. Parmi elles, 15 étaient positives (12 souches isolées et 3 PCR positives dans les selles). Les souches isolées présentaient le même profil que celle du cas index de SHU.

Tous les cas contact positifs ont reçu de l'azithromycine. Le contrôle des selles 48 heures après l'arrêt du traitement ne retrouvait pas de EHEC et aucun d'entre eux n'a évolué vers un SHU.

Pour les patients atteints de SHU typique à EHEC et pour leurs contacts positifs, 21 ont été de façon certaine traités par azithromycine et ont eu un contrôle des selles 48 heures après l'arrêt du traitement. Ce contrôle des selles était négatif pour les 21 cas.

2.2.3.7 Sérotypage moléculaire des souches de EHEC non sérotypables

Le sérotypage moléculaire a été réalisé sur 39 souches non sérotypables en 2014. Les résultats sont indiqués dans le **tableau 7** ci-dessous.

Référence CNR	Reference LA	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	<i>aggR</i>	Opéron O	FliC
201401082		+	-	-	-	-	R117	F7
201401542		-	+	-	-	-	R149a	F23
201412588		+	+	-	+	-	R146	F21
201400547		+	-	-	-	-	R117	F7
201402820		+	-	-	-	-	R117	F7
201401419		+	-	-	-	-	R117	F7
201408058		-	+	-	+	-	NC5	F18
201405391		-	+	+	+		R17	F19
201401698		-	+	-	+	-	R80	F2
201402672		-	+	-	-	-	R174	F21
201500346	37234	-	+	-	-	-	R106	F18
201411248		-	+	+	+		R80	F2
201500347	37674	-	+	-	-	-	R148	F8
201400618		-	+	+	+		R80	F2
201404290		+	-	-	-	-	R117	F7
201404449		+	+	-	+	-	NC6	F18
201404140		-	+	+	-		R113	F21
201407610		+	-	-	+	-	R146	F21
201400619	36709	-	+	+	+		NC1	F25
201400317		+	-	+	+		R5a	F-
201500217		+	+	-	+	-	R148	F20

201411853		+	-	-	-	-	R57/64	F19
201412004		-	+	+	-		R80	F2
201411469		+	-	+	+		NC2	F11
201500350	38208	-	+	-	-	-	NC3	F9
201411143		+	+	-	+	-	R174	F2
201402641		+	-	-	-	-	R117	F7
201500349	38143	-	+	-	+	-	NC7	F27
201411855		-	+	-	-	-	NC4	F5
201412103		+	-	-	+	-	R148	F20
201408366		+	-	-	-	-	R117	F7
201402069	36758	-	+	+	+		R80	F2
20102070	36777	+	+	+	+		R150b	F2
201410022		-	+	-	+	-	R145	F28
201409916		+	-	-	-	-	pR128	F4
201402071	36876	-	+	+	+		R80	F2
201402824		+	-	-	-	-	R117	F7
201500345	37228	+	-	-	-	-	R128	F10
201500348	37818	-	+	-	+	-	NC8	F19

Les sérogroupes les plus fréquemment retrouvés étaient R117 (n=8) et R80 (n=6).

2.2.3.8 Sérodiagnostic des SHU (CNR-ESS)

Un total de **404** sérums de 312 patients, reçus de différents services hospitaliers et de LBM ont été analysés au CNR-ESS. Parmi ces **404** sérums, 403 provenaient de France métropolitaine et un de Mayotte.

Les anticorps anti-LPS appartenant aux deux classes d'immunoglobulines IgA et IgM dirigés contre les 8 sérogroupes de *E. coli* les plus fréquemment responsables de SHU (O157, O26, O55, O91, O103, O111, O128 et O145) ont été recherchés. Cette recherche a été complétée depuis 2011 par le sérotype O104.

Le CNR-ESS recommande deux prélèvements à 15 jours d'intervalle (J0 étant le jour du diagnostic du SHU). Pour les 312 patients, 225 patients ont eu un seul sérum prélevé, 82 ont eu deux sérums, 5 ont eu 3 sérums.

En ne considérant qu'un sérum par patient (le positif en cas de discordance), le bilan des résultats obtenus est indiqué dans le **tableau 8**.

Tableau 8. Répartition par âge et sexe des résultats de sérologie anti-LPS positive

Immunoglobuline (Ig)	1 – 5 ans		6 – 15 ans		16-64 ans		> 65 ans		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	
IgA O157	1								1
IgM O157		1	1				1	1	4

IgA+IgM O157	9	15	8	6	3	7	1	3	52
IgA O26	1								1
IgM O26		2	1				1		4
IgA+IgM O26	3	7	4	1		5		1	21
IgM O91								1	1
IgA+IgM O91	1						1	1	3
IgM O103		1							1
IgM+IgA O103	2				2	3			7
IgM+IgA O111					1	1			2
IgMO157+IgM O91								1	1
IgM+IgA O157+IgM O26								1	1
IgM+IgA(O157+O26+O111)		1							1
IgM+IgA (O157+O103)				1					1
IgM+IgA (O26+O103)				1		1			2
IgM+IgA O26+IgA(O145+O55)	1								1
Total	18	27	14	9	6	17	4	9	104

M= Masculin, F= Féminin

Sur les **312 patients** ayant bénéficié d'une sérologie, **104** ont eu une sérologie positive (**33,3%**). La présence d'anticorps anti-LPS O157 était positive pour 61 des patients ayant une sérologie positive soit 58,6% des patients ayant une sérologie positive.

150 patients ont eu une **sérologie anti-LPS sans recherche de EHEC dans les selles**. Parmi eux, **39 ont eu une sérologie positive** : 19 pour O157, 15 pour O26, 2 pour O103, 2 pour O91, 1 pour O111. Aucune donnée clinique n'avait été précisée dans la demande sauf pour 3 patients qui présentaient un SHU.

Seuls 64 patients ont bénéficié **à la fois d'une recherche de EHEC dans les selles et une sérologie anti-LPS**.

La sérologie ne permettant que la détection des sérotypes O26, O55, O91, O103, O104, O111, O128, O145 et O157, les résultats étaient concordants avec le sérotype des souches EHEC isolées pour l'ensemble des cas sauf pour deux patients :

- Un enfant âgé de 4 ans présentant un SHU à *E. coli* O145 et une sérologie LPS positive pour O103.
- Un enfant âgé de 5 ans chez qui une souche de *E.coli* O111 a été isolée et ayant une sérologie LPS positive pour O103.

Il est possible que ces patients aient eu dans les selles plusieurs sérogroupes et qu'un seul d'entre eux ait été isolé.

La sérologie était positive alors que la recherche des EHEC dans les selles était négative pour 21 patients, cette discordance peut s'expliquer d'une part par un prélèvement tardif des selles par rapport à la diarrhée prodromique et d'autre part par l'administration d'un traitement antibiotique stérilisant les selles. Parmi ces patients, 9 présentaient un SHU et 3 d'entre eux avaient reçu des antibiotiques avant le prélèvement de selles.

La sérologie était négative et la recherche de EHEC positive pour 41 patients :

Chez 19 de ces 41 patients, une souche avait été isolée : O80 (13 cas), O157 (2 cas), O121 (1 cas), et 3 appartenant à des sérotypes plus rares.

Chez 22 de ces 41 patients, la PCR à partir des selles était positive mais aucune souche de EHEC n'a été isolée.

Il est à noter que **60 patients présentant un SHU ou une suspicion de SHU n'ont pas bénéficié de sérologie**

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

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

Le LA-RD a reçu 11 souches de *E. coli* isolées de LCR. Ces 11 souches ont été isolées de nouveau-nés âgés respectivement de un jour (n=2), de 2 à 15 jours (n=3), de un à 3 mois (n=5) et de 5 mois (n=1).

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

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

N°souche	Sexe	Age (j) /PL	Groupe phylogénétique	PCR nonaplex wzy	PCR K1	Phage K1	agg K1	ChuA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iron
381	M	3 mois	B21	O45	+		+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
382	F	11 jours	B21	O2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
383	M	1 mois	B2	O4		-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	II	-	-	+
384	F	1 jour	B21	O1		+		+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
385	M	43 jours	B2	neg	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
386	M	13 jours	B21	O1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	II	-	-	+
387	M	1 mois	F	O7	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	II	-	-	-
388	M	1 jour	B2	neg	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
389	M	5 mois	B2	O18	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
390	M	11 jours	F	O1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
391	M	1 mois	B2	O2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+

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

Le LA-RD a reçu 40 souches d'EXPEC hors méningites isolées des prélèvements suivants :

- hémocultures (n=28)
- urines (n= 7)
- liquide gastrique (n=2)
- prélèvements respiratoires (n=2)
- liquide amniotique (n=1)

Ces souches ont été isolées chez des patients présentant :

- un sepsis sévère (n=16)

- une infection maternofoetale (n=6)
- un urosepsis (n=5)
- une pneumopatahie (n=3)
- un SHU (dont un stx+) avec bactériémie (n=3)
- une prostatite (n=2)
- une péritonite (n=1)
- une pancréatite (n=1)
- un syndrome toxinique (n=1)
- une spondylodiscite (n=1)
- une MAT (n=1)

Les caractéristiques de ces souches sont indiquées dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Caractéristiques des souches de EXPEC hors méningites

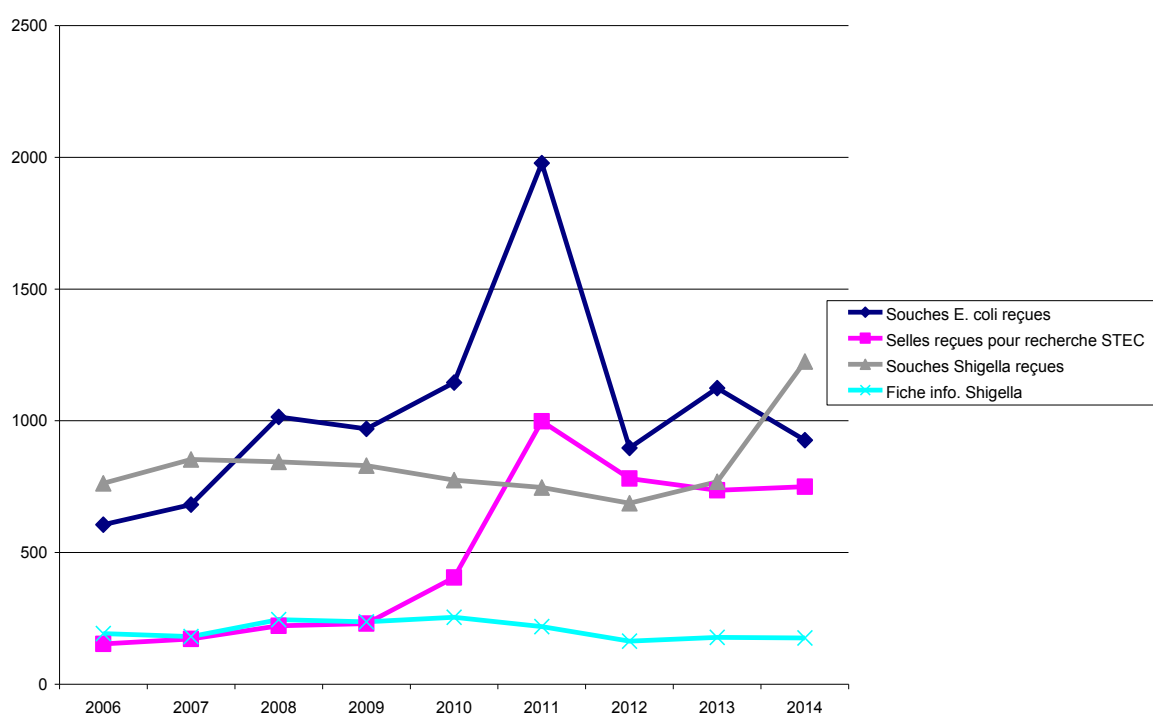
n° RDB	age	Sexe	origine souche	groupe phylogénétique	PCR nonaplex wzy	phage K5	phage K1	phage K1	phage K1	phage K1	ChlA	Hra	yjaA	TSPE4.C2	fyuA	Hly	sfa/foc	PAP C	Aer	PAP G	cnf1	ibeA	iron	sat	clbB	vat	SttA	Cia	Issj	aerplus	iron
RDEx333	52 ans	M	hémoculture	D																											
RDEx334	76 ans	M	ecbu	B2																											
RDEx335	73 ans	F	PDP	C																											
RDEx336	77 ans	F	hémoculture	B2																											
RDEx337	46 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx338	63 ans	F	ecbu	B1																											
RDEx339	2 jours	M	hémoculture	B21																											
RDEx340	34 ans		hémoculture	B2																											
RDEx341	86 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx342	86 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx343	69 ans	F	hémoculture	C																											
RDEx344	86 ans	M	hémoculture	B2																											
RDEx345	99 ans	M	hémoculture	B1																											
RDEx346	36 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx347	80 ans	F	ecbu	B21	O2																										
RDEx348	1 jour	F	liquide gastrique	B2																											
RDEx349	61 ans	F	hémoculture	B1																											
RDEx350	30 ans	F	hémoculture	B2	O4	-	-	-	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	II	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
RDEx351	50 ans		hémoculture	B2	O4	-	-	-	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	II	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
RDEx352	53 ans	M	hémoculture	B2																											
RDEx353	57 ans	M	hémoculture	C																											
RDEx354	3 ans	M	hémoculture	D																											
RDEx355	32 ans	M	hémoculture	D																											
RDEx356	53 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx357	53 ans	F	ecbu	D																											
RDEx358	72 ans	F	hémoculture	B2																											
RDEx359	63 ans	M	ecbu	B21																											
RDEx360	63 ans	M	ecbu	B21																											
RDEx361	83 ans	M	hémoculture	B2																											
RDEx362	1 jour	M	hémoculture	B21	O2																										
RDEx363	80 ans	F	hémoculture	D																											
RDEx364	41 ans	F	ecbu	*																											
RDEx365	1 jour	M	hémoculture	B2																											
RDEx366	24 ans	F	hémoculture	B21																											
RDEx367	4 jours	F	hémoculture	B2																											
RDEx368	20 ans	F	hémoculture	B2																											
RDEx369	1 jour	M	hémoculture	B2																											
RDEx370	34 ans	F	PDP	B2																											
RDEx371	1 jour	M	liquide gastrique	B1																											
RDEx372	1 jour	M	liquide amniotique	F																											

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

L'activité concernant *E. coli* en 2014, tous types de prélèvements confondus, a connu une légère diminution par rapport à 2013. En effet, le CNR-ESS a reçu, un total de 2080 prélèvements contre 2294 en 2013 avec un nombre de prélèvements de selles plus important pour faire le diagnostic direct des infections à *E. coli* mais moins de souches isolées et de sérums de patients comme en témoignent les résultats ci-dessous :

- Souches : - 17,6 % (926 en 2014 versus 1124 en 2013)
- Selles : + 1,9 % (750 en 2014 versus 736 en 2013)
- Sérums : - 6,9 % (404 en 2014 versus 434 en 2013)

Figure 8. Evolution de l'activité du CNR-ESS pour *E. coli* et *Shigella* de 2006 à 2014



2.3 Activités de surveillance des *Escherichia coli*

2.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à EHEC

2.3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ESS et le LA-RD collaborent afin d'échanger leurs données et/ou les souches permettant la validation des résultats des analyses faites pour un même patient (exemple : sérologie et typage de souche). Mais avant tout, le CNR-ESS et le LA-RD collaborent avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

2.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

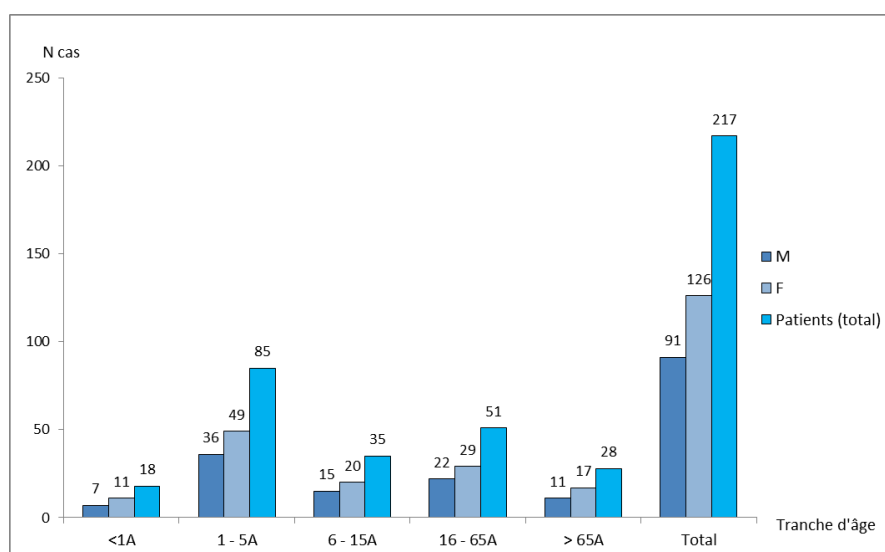
En 2014, **217 patients** ont eu une **recherche de EHEC positive** (isolement de souche ou PCR positive).

Les signes cliniques associées à l'isolement d'une souche de EHEC ou à une PCR positive sont indiqués dans le **tableau 11 ci-dessous**

Symptômes observés	Souches ou PCR positive
Diarrhée glairo-sanglante ou diarrhée sanglante	34
SHU/suspicion de SHU	98
Diarrhée/gastro-entérite aiguë	5
Entourage de SHU	15
Microangiopathie thrombotique	12
Angiocholite	1
Non précisé	52
Total	217

*SHU, syndrome hémolytique et urémique

La prévalence en fonction de l'âge et du sexe des patients ayant une recherche de EHEC positive (souches isolées et/ou PCR positive dans les selles) est représenté dans la **figure 9 ci-dessous**.



La prévalence la plus importante est retrouvée dans la tranche d'âge de 1 à 5 ans (39,1%) avec un sex-ratio de 0,73. Dans cette tranche d'âge, les enfants les plus touchés sont les enfants âgés de 1 à 3 ans (n=65 avec un sex-ratio de 0,62).

Dans la tranche d'âge la plus atteinte, les souches de EHEC retrouvées appartenaient aux majoritairement aux sérogroupes O157 (30%), O80 (18,6%), O26 (18,6%).

La répartition chiffrée des différents sérogroupes de EHEC (souches isolées) par âge et par sexe des patients est représentée dans le **tableau 12** ci-dessous.

	< 1 an		1-5 ans		6-15 ans		16-65 ans		> 65 ans		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
O157			8	13	11	10	4	5	1	3	55
O26	1	1	6	7	1	1		2	1	2	22
O80	1	3	5	8	0	0	1	1	1	0	20
O145		2	1	2		3	1	3			12
O91						1	2	2	1	4	10
O103		1	2			2		2		2	9
O55	2	2	1	2				1			8
O117					1		3	4			8
O121		1	1	2			1				5
O111			2	2							4
O128			1		1					1	3
O148							2		1		3
O146	1							1			2
O174				1					1		2
O106										1	1
O113								1			1
O17				1							1
O149									1		1
autres			2	4				4	1	2	13
total	5	10	29	42	14	17	14	26	8	15	180

La répartition géographique des souches de EHEC isolées en 2014 est indiquée dans les figures 10 et 11 ci-dessous.

Figure 10. Répartition régionale des isollements de EHEC en 2014

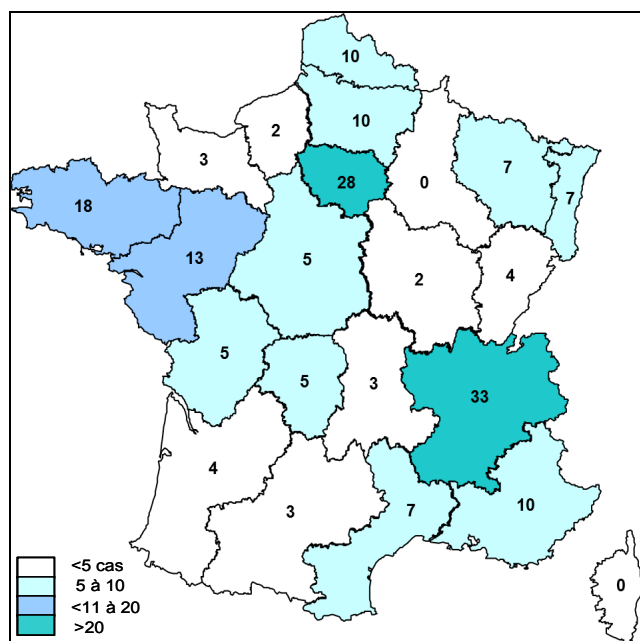
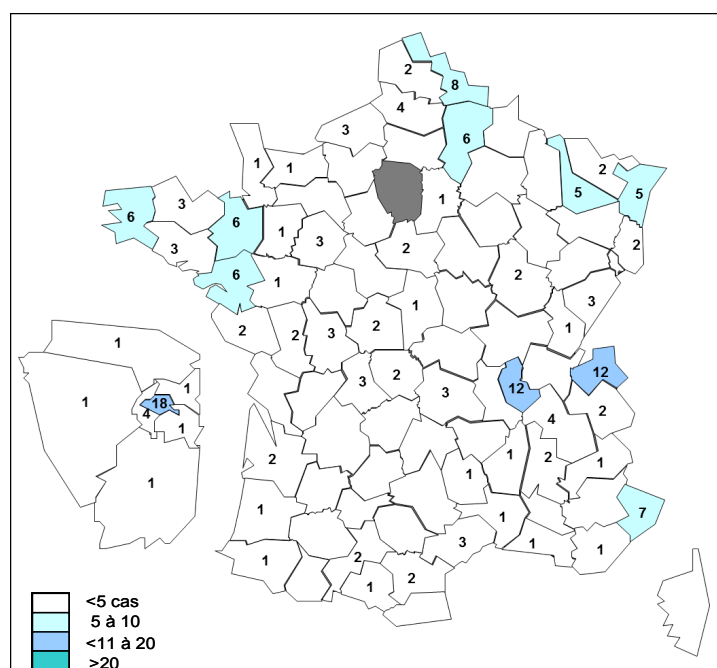


Figure 11. Répartition départementale des isoléments de EHEC en 2014



- Quand le département de domiciliation n'était pas indiqué, le département du laboratoire expéditeur a été utilisé.

2.3.2 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

2.3.2.1 Sensibilité aux antibiotiques des souches EHEC (LA-RD)

Bien que l'utilisation des antibiotiques soit controversée dans les infections à EHEC, l'étude de la sensibilité des souches présente un intérêt épidémiologique.

Le LA-RD a étudié la sensibilité des souches isolées en 2014, en particulier vis-à-vis des antibiotiques suivants :

- Bêta-lactamines : amoxicilline (AMX), et ceftriaxone (CRO)
- Aminosides (kanamycine, tobramycine, gentamicine)
- Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT)
- Quinolones et fluoroquinolones : acide nalidixique (Nal) et ciprofloxacine (CIP)

Les souches appartenant au sérotype O157 sont plus sensibles aux antibiotiques que les souches n'appartenant pas au sérotype O157.

Aucune souche productrice de BLSE n'a été isolée en 2014 au LA-RD

La prévalence exprimée en pourcentage de résistance est indiquée dans le **tableau 13**.

Tableau 13. Prévalence (%) de la résistance aux antibiotiques des souches EHEC (LA-RD)

% de Résistance	AMX	CRO	Aminosides	SXT	Nal	CIP
O157 (n=32)	9,3	0	0	6,2	0	0
Non O157 (n=45)	46,6	0	40	40	40	0

Parmi les souches non O157 résistantes à l'AMX (n=21), 11 appartenaient au sérotype O80 et 7 au sérotype O55. Ces 2 sérotypes présentaient une résistance associée aux aminosides, à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole.

En raison des fortes concentrations intraluminales de l'azithromycine (AZM), les CMI AZM ont été déterminées vis-à-vis des souches isolées en 2014 par la méthode de l'Etest et figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 14. CMI à l'azithromycine des souches EHEC isolées en 2014 au LA-RD

	CMI 50 (mg/L)	CMI 90 (mg/L)	Intervalle (mg/L)
O157 (n=32)	3	4	3 - 6
Non O157 (n=45)	4	6	3 - 12

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

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

La prévalence de la résistance aux antibiotiques des souches EXPEC reçues en 2014 au LA-RD exprimée en % est détaillée dans le **tableau 15 ci-dessous**.

	AMX	CFM	CTX	SXT	Nal	CIP
ExpEC méningites (n=11)	90	18	18	63,6	27	18
ExpEC hors méningites (n=40)	65	17,5	12,5	40	25	15

En 2014, 7 souches productrices de BLSE ont été isolées dont 2 isolées de méningites

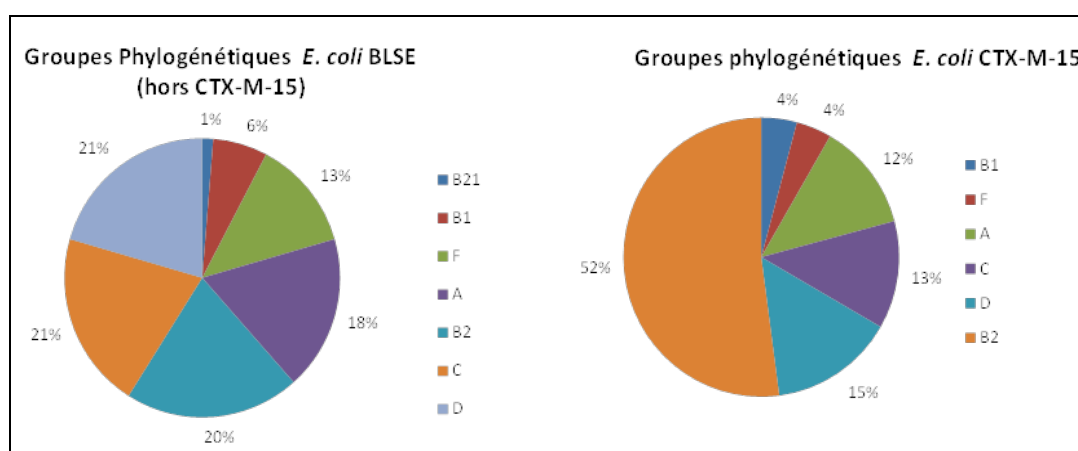
2.3.2.3 Collaboration avec le CNR de la Résistance aux antibiotiques (Lab. associé) à Clermont-Ferrand

La collaboration inter-CNR sur la recherche de facteurs de virulence "EXPEC" chez des souches *E. coli* productrices de BLSE s'inscrit dans une étude visant à explorer la diversité des BLSE produites en France.

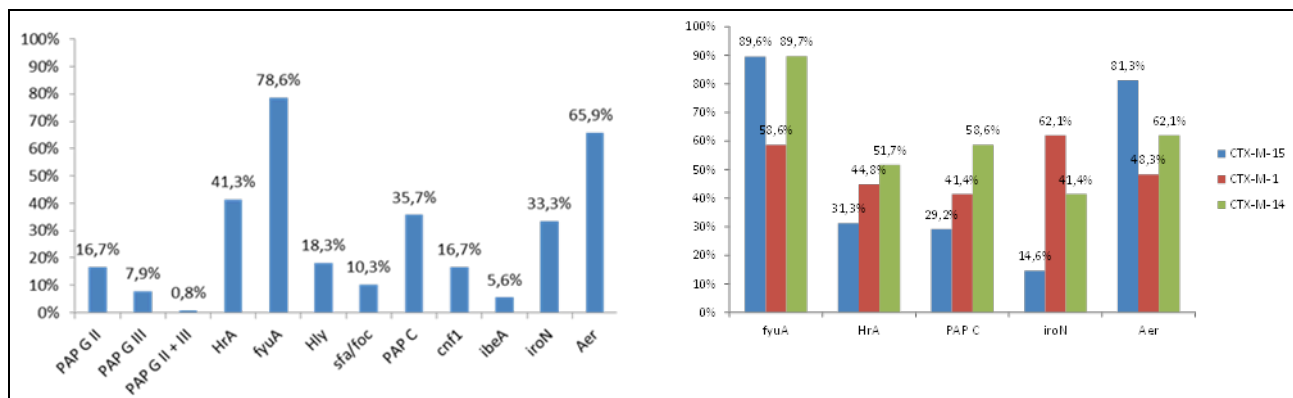
200 souches cliniques productrices de BLSE, non redondantes, collectées dans 18 laboratoires en 2012 en France, ont été analysées. La majorité des souches ont été isolées de prélèvements urinaires (66%) et d'hémocultures (10%). Le sex-ratio (M/F) des patients était de 0,82. La médiane des âges était de 65 ans, la moyenne de 62,8 ans. Ces souches ont été principalement isolées dans des services de médecine (39,5%) et de chirurgie (20,5%) et plus rarement aux urgences (15,5%), dans les services de soins de suite (10,5%) et les réanimations (11%) et exceptionnellement dans les services de pédiatrie (3%). Les principales espèces productrices étaient *E. coli* (66%), *K. pneumoniae* (18%) et *E. cloacae* (14%).

Au total, sur 200 souches d'entérobactéries isolées de prélèvements cliniques **121 souches** appartenaient à l'espèce *E. coli*. Ces souches de *E. coli* hébergeaient à des fréquences significatives les BLSE CTX-M-15 (39% des BLSE), CTX-M-1 (22%) et CTX-M-14 (21%),

Le groupage phylogénétique des *E. coli* montrait que 32% et 26% des souches de *E. coli* appartenaient respectivement aux phylogroupes B2 et D. Les phylogroupes A et B1 représentaient respectivement 31% et 10% des souches de l'espèce *E. coli*. L'analyse des résultats montre une forte association de la BLSE CTX-M-15 avec le phylogroupe B2 en comparaison des autres BLSE, comme le montre la figure suivante :



Concernant les facteurs de virulence, on observe, à côté de facteurs de virulence associés aux infections urinaires comme *hrA* et *papC*, une forte association avec les sidérophores, en particulier *fyuA*, comme le montre la figure suivante :



2.3.3 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à EXPEC

Entre 2001 et 2013, une étude rétrospective sur des données prospectives nationales a permis de colliger les caractéristiques de 325 enfants hospitalisés pour une méningite à *E. coli*. Parmi les 325 cas, 65.2% sont nés à terme, 22.4% prématurés et 12.5% très grands prématurés. Les méningites à *E. coli* sont 7 fois plus fréquentes chez les enfants prématurés que chez les enfants nés à terme. L'âge moyen au diagnostic était de 14 jours. 71.1% des cas étaient des nouveau-nés, avec 2 pics de fréquence, l'un de 0 à 3 jours (principalement pour les prématurés) et l'autre entre 11 et 15 jours (principalement pour les nouveau-nés à terme); 8.9% des cas avaient plus de 89 jours. Au total, 51.1% des patients avaient une méningite sévère et 9.2% d'entre eux sont décédés.

Le CNR-LA a réalisé la caractérisation moléculaire de 141 souches isolées au cours de ces méningites. Le groupe phylogénétique B2.1 (56%) et le sérotype O1 (27.7%) sont les plus fréquemment identifiés. Les décès sont plus fréquemment associés aux sérotypes O rares ($p=0.014$) et la sévérité de la maladie au sérotype O7 ($p=0.034$) et à la présence de l'adhésine PapGII (OR=2.3, 95% CI 1.2–4.5; $p=0.015$).

Les résultats de cette analyse figurent dans le tableau 16 ci-dessous.

Caractéristiques	Méningite sévère	Méningite non sévère	P value	Décès	Survivants	P value
Patients, n	166	159		30	290	
M/F, n	92/70	87/68	NS	13/14	164/121	NS
Grands prématurés	29 (17.5)	10 (6.3)	0.002	9 (31.0)	29 (10.4)	0.004
Prématurés	51 (30.7)	19 (11.9)	<0.001	10 (34.5)	60 (21.4)	NS
Total nouveau-nés prématurés	80 (48.2)	29 (18.2)	<0.001	19	89	<0.001
Nouveau-nés à terme	81 (48.8)	123 (77.4)	<0.001	10 (34.5)	191 (68.2)	<0.001
Age du diagnostic (moyen, 10ème-90ème percentile, j)	13 (0-91)	15 (1-59)	NS	8 (0-54)	14 (1-87)	0.024
Hémoculture positive	118/26 (81.9)	92/40 (69.7)	0.023	21/9 (70.0)	184/61	NS
Traitement par ciprofloxacine	87 (52.4)	70 (44.0)	NS	13 (43.3)	141	NS
Souches, n	73	68	NS	13	126	NS
Groupe phylogenetique						
A	4 (5.5)	3 (4.4)	NS	1 (7.7)	6 (4.7)	NS
B2 not B2.1	16 (21.9)	15 (22.1)	NS	5 (38.5)	25 (19.8)	NS
B2.1	39 (53.4)	40 (58.8)	NS	5 (38.5)	73 (57.9)	NS
D	14 (19.2)	10 (14.7)	NS	2 (15.4)	22 (17.4)	NS
O serogroupe						
O1	24 (32.9)	15 (22.1)	NS	3 (23.1)	36 (28.6)	NS
O16	4 (5.5)	0 (0.0)	NS	0 (0.0)	4 (3.2)	NS
O18	9 (12.3)	18 (26.5)	0.052	1 (7.7)	25 (19.8)	NS
O2 (n, %)	2 (2.7)	3 (4.4)	NS	0 (0.0)	5 (3.9)	NS
O45 (n, %)	7 (9.6)	9 (13.2)	NS	2 (15.4)	14 (11.1)	NS
O6 (n, %)	0 (0.0)	4 (5.9)	0.052	0 (0.0)	4 (3.2)	NS
O7 (n, %)	8 (11.0)	1 (1.5)	0.034	0 (0.0)	9 (7.1)	NS
O83 (n, %)	1 (1.4)	2 (2.9)	NS	0 (0.0)	3 (2.4)	NS
Sérogroupe rares	18 (24.7)	16 (23.5)	1	7 (53.8)	26 (20.6)	0.014
Facteurs de Virulence						
Antigène K1	108/19 (85.0)	99/23 (81.1)	NS	18/7 (72.0)	187/34 (84.6)	NS
<i>iucC</i>	63/10 (86.3)	61/7 (89.7)	NS	10/3 (76.9)	112/14 (88.9)	NS
<i>cnf1</i>	4/69 (5.47)	4/64 (5.88)	NS	2/11 (15.4)	6/120 (4.8)	NS
<i>fyuA</i>	71/1 (98.61)	65/2 (97.01)	NS	13/0 (100.0)	121/3 (97.6)	NS
<i>hlyC</i>	6/67 (8.21)	9/61 (13.23)	NS	2/11 (15.4)	13/113 (10.3)	NS
<i>hra/hekd</i>	6/60 (9.09)	8/52 (13.33)	NS	3/8 (27.3)	11/102 (9.7)	NS
<i>ibeA</i>	20/52 (27.77)	27/41 (39.7)	NS	6/7 (46.2)	39/86 (31.0)	NS
<i>iroN</i>	53/20 (72.6)	53/15 (77.94)	NS	11/2 (84.6)	93/33 (73.8)	NS
<i>papGII</i>	44/29 (60.27)	27/41 (39.7)	0.018	6/7 (46.2)	65/61 (51.6)	NS
<i>papGIII</i>	2/71 (2.73)	1/61 (1.47)	NS	1/12 (7.7)	2/124 (1.6)	NS
<i>sfa/foc</i>	13/60 (17.8)	23/45 (33.82)	0.034	3/10 (23.1)	32/94 (25.4)	NS

2.3.4 Participation aux réseaux de surveillance

2.3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ESS-LA accompagne chaque souche ou prélèvement reçus au CNR. Dans cette fiche, il doit être renseigné : le nom et l'adresse du laboratoire expéditeur, la demande d'examen, les renseignements sur le patient, les symptômes cliniques, le prélèvement et des renseignements épidémiologiques permettant de mettre en évidence les épidémies potentielles et leurs origines. Ces fiches et les résultats obtenus permettent l'interface avec l'InVS à différents niveaux.

- Signalement systématique de tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans à l'InVS.

- Dans le cadre de la surveillance des EHEC, toute souche ou selle porteuse de gènes *stx* est immédiatement signalée à l'InVS par l'envoi d'une copie du résultat par fax.

- Concernant les résultats de sérologie pour la surveillance de SHU, une copie de tous les résultats concernant des enfants de moins de 15 ans (positifs ou négatifs), sont faxés à l'InVS dès leur édition.

2.3.4.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux en particulier européens

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

2.3.5 Détection et investigation des cas

Cas sporadiques à EHEC O55

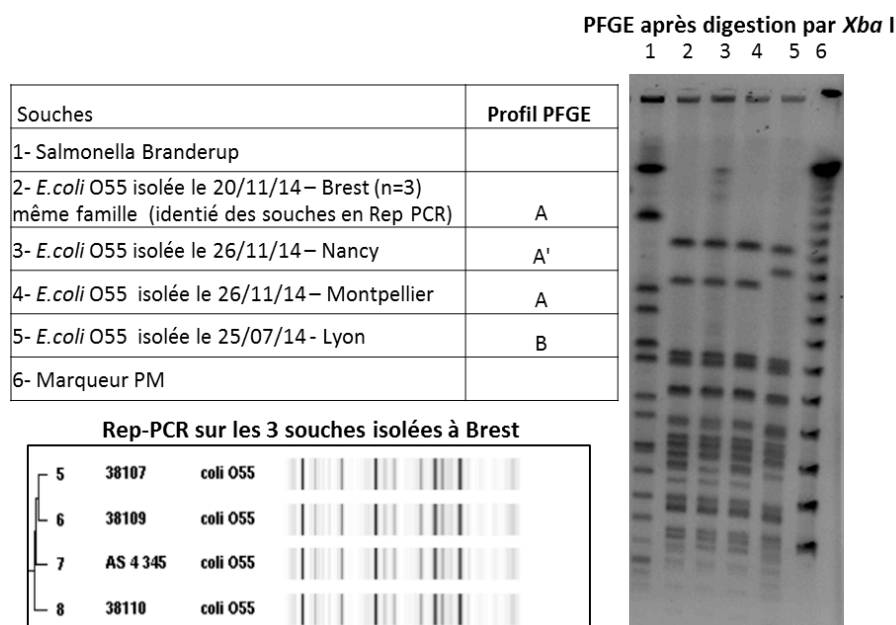
Le CNR-ESS-LA a identifié entre le 30 août 2014 et le 26 novembre 2014 une infection à EHEC O55 chez 6 patients.

Trois cas étaient originaires de Brest et appartenaient à la même famille, dont un enfant âgé de 6 mois qui a présenté un SHU, sa mère et son grand frère. Les 3 autres patients n'avaient pas de relation géographique et ont tous les 3 présenté un SHU.

Département	Age	Sexe	Date isolement	Symptômes
29	6 mois	M	17/11/2014	SHU
29	25 ans	F	20/11/2014	Mère - DGS
29	2 ans	M	20/11/2014	Grand frère - DGS
1	10 mois	F	25/07/2014	SHU
54	1 an	F	26/11/2014	SHU
34	5 mois	F	26/11/2014	SHU

Une souche d'EHEC O55 portant les gènes de virulence *stx2* (variant *stx2c+stx2d*), *eae* et *hlyA* a été isolée. Une analyse des souches par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a été réalisée après une analyse des 3 souches de Brest par Rep-PCR (Diversilab^R).

Les résultats de la comparaison moléculaire des souches d'EHEC O55 ont démontré que les 3 souches des patients de Brest et celle de Montpellier ont le même profil PFGE (A) et sont ainsi génétiquement reliées entre elles. Un profil PFGE voisin (A') a été identifié à Nancy tandis que la souche de Lyon a un profil différent (B)



Shigella

3/ *Shigella*

3.1 Missions et Organisation du CNR

Voir Annexe 1

3.2 Activités d'expertise

3.2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2014

Aucune.

3.2.2 Activités d'expertise pour l'année 2014

3.2.2.1 Inventaire global des souches reçues au CNR-ESS en 2014

Durant l'année 2014, le CNR-ESS a reçu 1225 souches de *Shigella* envoyées comme appartenant au genre *Shigella*. Sur ces 1225 souches, 1180 ont été confirmées comme étant des *Shigella* toutes d'origine humaine. Les 45 autres souches n'étant pas des *Shigella*.

Sur les 1180 souches d'origine humaine, 843 provenaient de France métropolitaine (de 831 patients), 103 (de 97 patients) des DOM-TOM et 234 de l'étranger.

De plus, 184 fiches d'information correspondant à 177 patients ont été envoyées au CNR-ESS pour signaler une infection à *Shigella* répartis comme suit : 144 cas d'infections à *S. sonnei*, 4 cas d'infection à *S. flexneri*, 2 à *S. boydii*. Par ailleurs, le CNR a reçu 27 fiches pour lesquelles l'espèce n'était pas précisée.

En compilant les informations et souches et après élimination des doublons, des souches non humaines, des souches adressées de l'étranger, **un total de 1105 souches de *Shigella* isolées en métropole et dans les DOM-TOM a été répertorié au CNR-ESS en 2014.**

3.2.2.2 Analyse des 843 souches reçues de France métropolitaine en 2014

Les caractéristiques des 843 souches par sérotype sont résumées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 17. *Shigella boydii* (44 souches pour 44 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel de contamination () ^a
1	1	69	-	
2	17	31(2), 33(2), 44, 60, 74, 75, 76, 78, 92(2), 94(2), 95(3)	-	Cameroun, Guatemala, Inde, Maroc (2), Tunisie
4	15	01(2), 12, 31(2), 44, 45(2), 67, 68, 72, 75(2), 87, 94	-	Afrique du Sud, Algérie (2), Maroc (3), Tchad, Belgique (2)
10	1	64	(64,?, Sénégal)	Sénégal
11	1	75	-	Inde
13	3	03, 42, 67	-	-
14	1	75	-	
18	2	60, 69	-	
20	3	27,59,75		Inde, Pakistan

()^a : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

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

Tableau 18. *Shigella dysenteriae* (11 cas pour 11 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel d'origine () ^a
2	5	22, 44, 51, 67, 69	Familiale (?, 44, Inde)	Burkina Faso, Haiti, Inde
4	3	30, 93, 94	-	Tchad
6	1	95	-	-
12	1	94	-	-
SH111	1	92	-	-

()^a : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

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

Tableau 19. *Shigella flexneri* (219 souches pour 218 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel de contamination () ^a
1	3	44,75,85	-	Madagascar
1b	36	06, 25, 26, 30, 34, 45, 47, 49, 62(3), 67(4), 69(3), 72, 75(2), 77(2), 78, 81, 87, 91, 92, 93(3), 94(4), 95	Groupe de cas (? , 62, Soudan) Familiale (? ,75,?) Familiale (? ,77,?)	Maroc(2), Bénin, Sénégal (3), Cameroun, Soudan, Madagascar (2), Haiti
2a	105	01, 06, 12(4), 13,15, 17(2), 21, 29, 33, 34(3), 38(3), 40, 44, 45, 49(2), 54, 59(3), 61, 62, 64, 67(2), 69(6), 71, 72, 74(5), 75(25), 77(5), 78, 79(2), 81, 91(2), 92(5), 93(5), 94(6), 95(7),	Familiale (92, ?,Israël) Familiale (77, ?, Maroc) Familiale (75, 2, ?)	Espagne, Royaume Uni, Etats-Unis, Algérie (2), Maroc (4), Sénégal, Cap Vert, Côte d'Ivoire, Mauritanie, Mali, Bénin, Congo (2), Mayotte, Pakistan (2), Inde (7), Ouzbékistan, Haiti, Mexique, Colombie
2b	9	06, 08, 13, 31, 44, 59, 71, 75, 78	-	Algérie, Maroc, Tunisie
3a	21	11(2), 33, 39, 74, 75(4), 77, 78, 79, 91, 92(2), 94(2), 95(4)	Familiale (91, ?, ?)	Kenya, Sénégal, Ethiopie
3b	2	75(2)	-	Maroc
4	9	62, 69, 72, 75(3), 76, 92, 95	-	Mali, Cameroun, Soudan, Tchad, Ethiopie
4c	6	21, 44(2), 75, 92, 93	Familiale (44, 2, ?)	Congo
6Boyd88	19	30, 38(2), 44, 51, 59(2), 68, 73, 74, 75(3), 78, 91, 92(2), 94, 95	Familiale (59, ?, ?)	Algérie, Maroc, Cameroun, Egypte, Inde, République Dominicaine, Russie
Flexneri 6 Herdforshire	5	17, 31, 45(2), 94	Groupe de cas (17, ?, ?) Groupe de cas (45, ?, ?)	Ethiopie
X	2	59, 92	-	Tchad
Y	1	29	-	-

()^a : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

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

Tableau 20. *Shigella sonnei* (569 souches pour 558 patients)

Sérotype	Nombre de cas	Département d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel de contamination () ^a
a	23	26(2), 31, 34, 38, 44, 62(2), 67, 68(2), 69, 73, 74, 75(4), 79(2), 89, 92, 94	-	Argentine, Colombie (2), République Dominicaine (4), Inde (2), Grèce
e	1	93	-	
f	2	93, 94	-	Sénégal
g	413	01(2), 03, 04, 06(5), 08, 09(2), 11, 12, 13(3), 16(2), 17(3), 20, 21(2), 23, 25, 28, 29, 30(3), 31(4), 33(6), 34(7), 35, 38, 44(5), 52, 54(4), 55, 57, 59(2), 61, 64(3), 67(6), 68(3), 69(6), 71(2), 73(6), 74(1), 75(169), 76(2), 77(7), 78(13), 80, 81, 83, 84, 85(2), 86(4), 88, 89, 91(6), 92(48), 93(17), 94(32), 95(13), 98	Cas groupés (3, 75, ?) Cas groupés (?, 75, Polynésie française) Cas groupés (?, 69, Afrique) Cas groupés (?, 75, ?) Cas groupés (?, 75, Myanmar) Collectivités (?, 76, Egypte) Crèche (?, 75, ?) Ecole/familiale (47, IDF, ?) Familiale (?, 44, ?) Familiale (?, 17, ?) Familiale (?, 73, ?) Familiale (?, 31, Maroc)	Algérie, Cambodge (2), Cameroun, Canada, Chine, Comores, Congo, Côte d'Ivoire (4), Egypte (5), Espagne, Grèce, Haiti (3), Inde (7), Israël (4), Italie, Maroc (8), Mexique, Myanmar (2), Népal, Nicaragua, Pakistan, Polynésie française, République Dominicaine (4), Soudan, Suisse, Tanzanie, Thaïlande
g (mannitol -)	70	03, 05(2), 08(2), 11, 12, 14, 17, 29, 30(3), 31(2), 33(2), 34, 35(2), 37, 38(2), 43, 49, 50, 56, 57(2), 59(2), 60(4), 62, 64, 68(2), 69(2), 74, 75(6), 77(2), 78(4), 91(3), 92(10), 93(2), 95(1)	Familiale (?,14,?) Familiale (?,31,?) Familiale (?, 59,Maroc) Familiale (?, 95,?)	Algérie, Egypte, Grèce, Madagascar, Maroc (17), Pérou
g (ONPG -)	40	03, 05, 06(2), 11, 13, 17, 25, 28, 44(3), 57, 62, 68, 73, 75(4), 77, 3(2), 88, 91(2), 92(4), 93(6), 94(2), 95(2)	-	Algérie (2), Bangladesh, Burkina Faso, Cambodge, Cameroun (2), Inde, Indonésie, RCA, Sénégal (4)
Autres <i>S. sonnei</i> g	6	12, 78, 91, 92, 94(2)	Familiale (?,92, Maroc)	Maroc, Réunion
Man- ONPG -	1	92	-	Madagascar
Man- ODC-	2	67, 75	-	
ODC- ONPG-			-	

()^a : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

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

Les trois dernières lignes du **tableau 20** concernent des souches de *S. sonnei* présentant des caractères biochimiques atypiques (mannitol négatif et/ou ONPG négatif ; ODC négatif).

3.2.2.3 Souches reçues des DOM-TOM

En 2014, le CNR-ESS a reçu des DOM-TOM, 103 souches de *Shigella* isolées chez 97 patients (Tableau 21).

Tableau 21. Répartition des souches en provenance des DOM-TOM

Sérotype	Guyane française	Réunion
<i>S. flexneri</i> 1	2	
<i>S. flexneri</i> 1a	2	
<i>S. flexneri</i> 1b	35	
<i>S. flexneri</i> 2a	33	
<i>S. flexneri</i> 3a	4	
<i>S. flexneri</i> 6 Boyd88	2	
<i>S. flexneri</i> Y	2	
<i>S. sonnei</i> g	13	4
Total	93	4

3.2.2.4 Souches reçues de l'Etranger

En 2014, le CNR a reçu un total de 234 souches de l'étranger réparties comme suit : 2 souches de Belgique, 5 souches de l'Institut Pasteur de Madagascar et 227 souches de l'Institut Pasteur de Bangui (RCA) dans le cadre d'un projet collaboratif.

3.2.2.5 Bilan des fiches d'information reçues au CNR-ESS

En 2014, le CNR a reçu 184 fiches correspondant à 177 patients (4 pour *Shigella flexneri*, 2 pour *Shigella boydii* et 171 *Shigella sonnei*).

Ces fiches d'information ont été établies pour répertorier les cas de *S. sonnei* au niveau de la France métropolitaine. Sur ces fiches d'information, en plus du sérotype, les trois tests ONPG, rhamnose et mannitol permettent de définir le biotype. Cependant pour l'année 2014, l'ensemble des fiches reçues ne comportaient pas, toutes, les résultats de fermentation des deux sucres rhamnose et mannitol, ce qui n'a pas permis de donner une répartition des biotypes par département.

Les caractéristiques épidémiologiques des souches isolées figurent dans le **tableau 22** ci-dessous :

Tableau 22. Résultats des fiches d'information pour *Shigella*

Sérogroupe	Nombre de cas	Département d'isolement () ^a	Epidémie ^b	Voyage, pays potentiel de contamination () ^a
<i>S. boydii</i>	2	69,93	-	Madagascar
<i>S. flexneri</i>	4	21,42,74,93	-	Burkina Faso
<i>S. sonnei</i>	144	11(2), 13(2), 14(3), 19, 22, 26, 27, 29(2), 30, 31(8), 33(2), 35, 37, 38, 44, 45(2), 46, 49, 51(3), 54(2), 58, 59(4), 60, 62(3), 63(2), 65, 67(16), 69(3), 71(3), 72(6), 73(2), 75(14), 76(7), 77(3), 78(2), 83, 84(2), 85, 87(2), 91(3), 92(9), 93(12), 94, 95(8)	TIAC (? ,95,?) Ecole (? ,92,?) Familiaux (2,11,?) Familiaux (? ,31,?) Familiaux (? ,67,?) Familiaux (? ,71,?) Familiaux (? ,91, Espagne) Familiaux (? ,92,?) Familiaux (? ,93, Côte d'Ivoire) Familiaux (? ,95, Côte d'Ivoire) Familiaux (? ,95,?)	Afrique du Nord (2), Algérie (4), Maroc (13), Côte d'Ivoire (3), Cameroun, Burkina Faso, Sénégal (3), Tanzanie (2), Togo Brésil, République Dominicaine, Colombie Inde (3), Madagascar, Pakistan (2)
Non précisé	27	06, 17, 38, 42, 45(2), 55, 63, 67(3), 69(2), 75(4), 78, 87, 91(3), 93, 94, 95(3)	Familiaux (? ,69, ?) Familiaux (? ,63, ?) Familiaux (? ,75, ?)	Algérie (2), Gabon, Tchad, Israël, Nicaragua, Israël

()^a : nombre de cas dans le département ou le pays si >1

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

3.3 Activités de surveillance

3.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.3.1.1 Réseau partenaire

Le CNR-ESS collabore depuis de nombreuses années avec un réseau de laboratoires, qui fournissent les différents prélèvements et informations nécessaires à la surveillance (laboratoires privés, laboratoires hospitaliers, centres de santé, Instituts et Ecoles vétérinaires...).

3.3.1.2 Analyse de la distribution des différents agents et analyses des tendances

- Distribution des souches de *Shigella* :

Des souches de *Shigella* d'origine humaine ou des fiches d'information ont été adressées par 72 départements de France métropolitaine et 2 DOM.

Le détail de la répartition par département selon les sérotypes figure dans les tableaux numérotés de 18 à 22. Seuls 16 départements (02, 07, 10, 24, 32, 36, 39, 41, 48, 53, 66, 70, 82, 90, 96) n'ont pas déclaré d'isolements de *Shigella* (souches ou fiches d'information) en 2014.

Figure 12. Répartition par département du nombre de souches de *Shigella* et d'information sur les *Shigella* reçues en 2014 (département de domiciliation du patient ou à défaut département du laboratoire expéditeur)

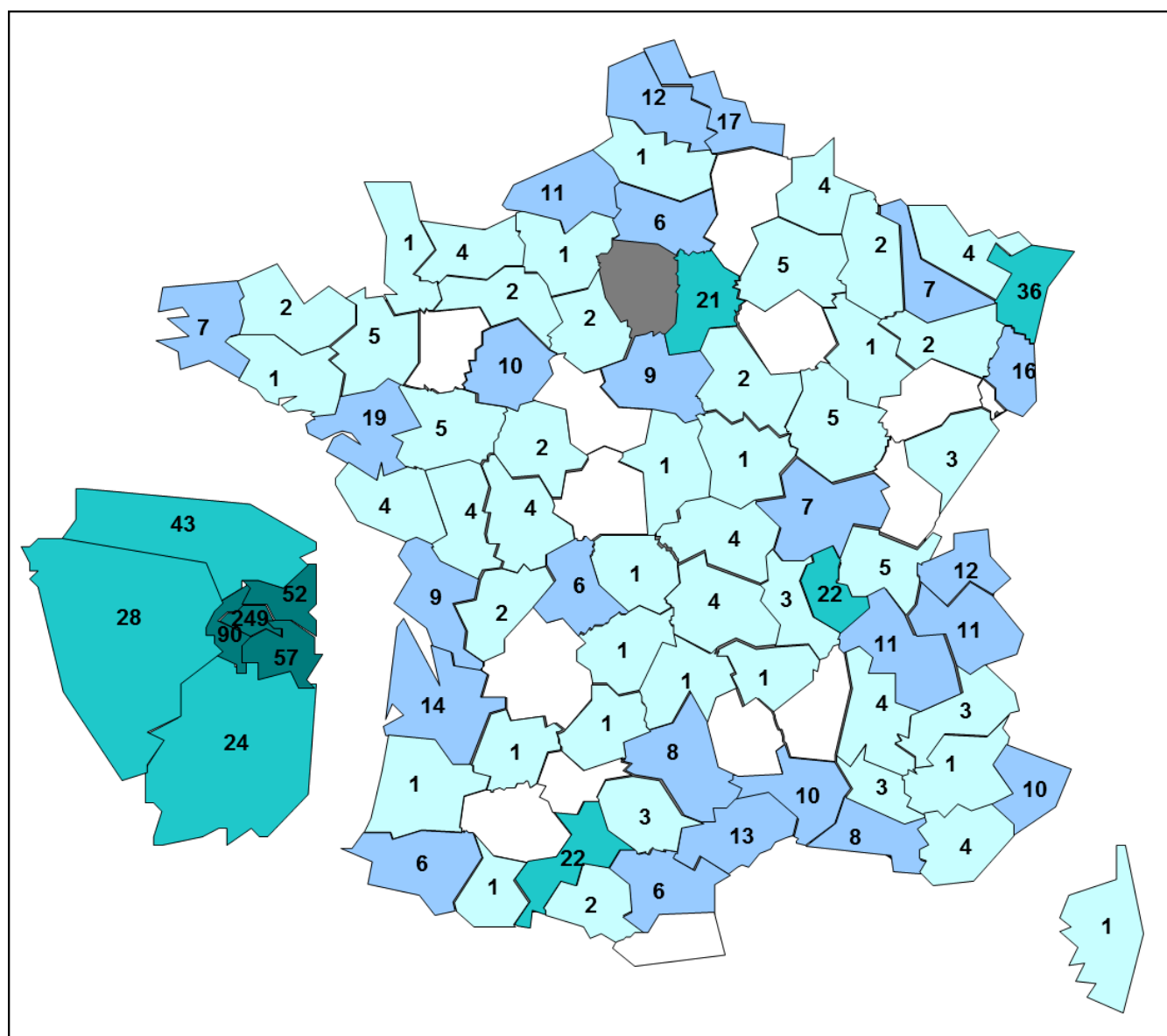
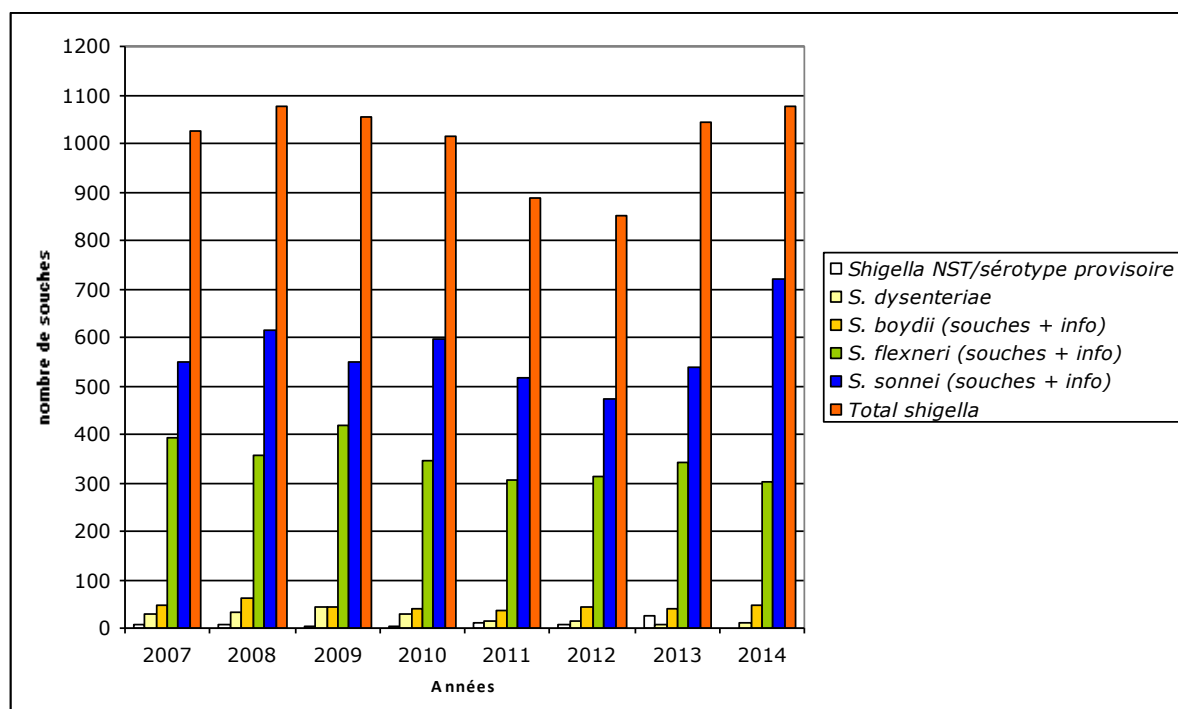


Figure 13. Distribution globale des sérogroupes de *Shigella* reçues au CNR-ESS depuis 2007 en France métropolitaine et DOM-TOM



3.3.2 Surveillance de la résistance des shigelles aux anti-infectieux

3.3.2.1 Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Shigella* (CNR-ESS)

3.3.2.1.1 Surveillance globale

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

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue par la méthode de diffusion selon les recommandations du CA-SFM. Dans certains cas, la méthode de l'Etest est utilisée pour déterminer les CMI. Pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G^R), un antibiogramme complémentaire est effectué ainsi que les CMI aux C3G et l'azithromycine par la méthode Etest.

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

Un antibiogramme a été réalisé en 2014 sur 821/831 des souches de *Shigella* reçues au CNR-ESS. Les résultats de la résistance aux principaux antibiotiques de 821 souches humaines sur les 843 isolées en France métropolitaine, en 2014 sont présentés dans le **tableau 23**.

Tableau 23. Pourcentage de résistance aux antibiotiques des différents sérogroupes de *Shigella* en 2013 en France métropolitaine

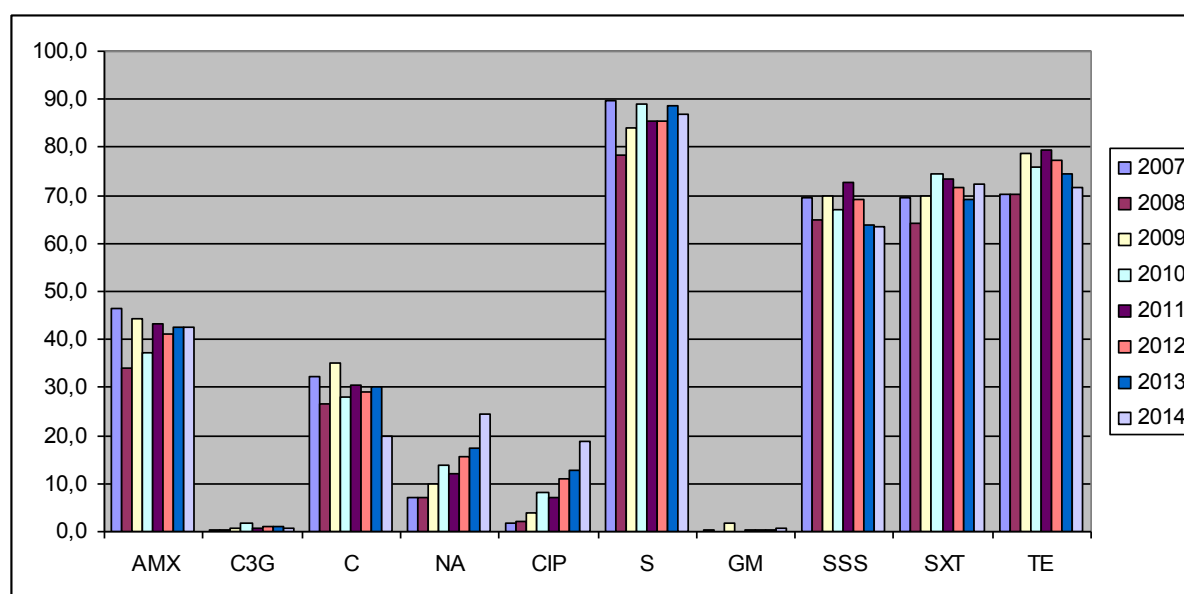
Sérogroupe	Nb souches testées	AMX	CRO /CAZ	K	GM	NA	CIP	C	TE	SSS	TMP	SXT	AMX + SXT
<i>S. boydii</i>	44	25	0	0	0	9	0	4,5	61,4	68,2	52,3	50	22,7
<i>S. dysenteriae</i>	11	54,5	0	0	0	0	0	9	81,8	90,9	90,9	90,9	54,5
<i>S. flexneri</i>	215	73	0	0	0,5	11,6	10,2	66,5	83,7	56,3	64,6	54,8	41,8
<i>S. sonnei</i>	551	31,4	1,3	0,4	1	34,7	27,2	0,4	64	70	98,4	86,2	23,6
Total	821												

AMX=amoxicilline, CRO=ceftriaxone, CAZ=ceftazidime, K=kanamycine, GM=gentamicine, NA=acide nalidixique, CIP=ciprofloxacine, C=chloramphénicol, TE=tétracycline, SSS=sulfamides, TMP=triméthoprim, SXT=cotrimoxazole.

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

Antibiotique testé	Pourcentage des souches résistantes en :						
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Amoxicilline	33,9	44,5	37,3	43,3	41,3	42,7	42,5
Ceftriaxone/ceftazidime	0,5	0,7	1,8	0,8	1,2	1,2	0,8
Chloramphénicol	26,7	35,1	27,9	30,5	29,0	30,2	20
Acide nalidixique	7,2	9,9	13,8	12	15,7	17,4	24,3
Ciprofloxacine	2,0	4,1	8,3	7,2	11	12,8	18,9
Streptomycine	78,2	84,0	88,9	85,4	85,4	88,5	87
Gentamicine	0,1	1,7	0,1	0,5	0,4	0,4	0,8
Sulfamides	64,9	69,7	67	72,7	69,0	63,7	63,6
Cotrimoxazole	64,3	69,7	74,6	73,3	71,5	69,1	72,2
Tétracyclines	70,1	78,6	75,9	79,5	77,3	74,5	71,5

Figure 14. Evolution de la résistance aux antibiotiques chez *Shigella* spp de 2008 à 2014



Une augmentation de la résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones est notée d'année en année.

En 2014, 24,3% et 21% des souches étaient respectivement résistantes à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine par rapport à 17,4% et 12,8% en 2013.

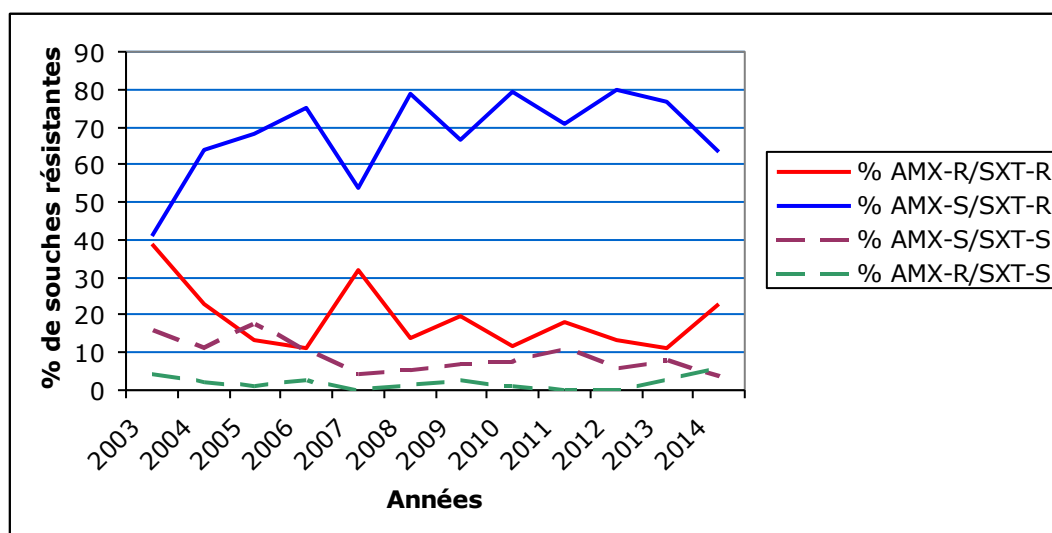
3.3.2.1.2 Surveillance de *Shigella sonnei*

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

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

La figure ci-dessous montre l'évolution de la résistance à l'amoxicilline et au cotrimoxazole chez *S. sonnei* biotype g depuis 2003.

Figure 15. Analyses des tendances des résistances à l'amoxicilline (AMX) et au cotrimoxazole (SXT) chez *S. sonnei* biotype g



Le nombre de *S. sonnei* résistantes à l'azithromycine (CMI>16 g/L) sur la période 2007-2014 est indiqué dans le **tableau 25**.

Tableau 25. Caractéristiques des souches de shigelles résistantes à l’azithromycine depuis 2007

Année	Nb de souches	Sérotype	CMI AZM (mg/L)	Sensibilité AMX/SXT (nombre)
2007	1	<i>S. sonnei</i> g	18	
	19	<i>S. sonnei</i> g	24	RR (18), SR (1)
	19	<i>S. sonnei</i> g	32	RR (15), SR (2) SS (2)
	1	<i>S. sonnei</i> g	48	RR
	1	<i>S. sonnei</i> g	64	SR (1)
	45	<i>S. sonnei</i> g	>256	RR (45)
2008	0	<i>S. sonnei</i> g		
2009	1	<i>S. sonnei</i> a	>256	RR (1)
2010	2	<i>S. sonnei</i> g	>256	RR (2)
2011	4	<i>S. sonnei</i> g	32 48 64 256	RR (4)
2012	1	<i>S. flexneri</i> 2a	>256	RS (1)
	1	<i>S. flexneri</i> Boyd88	>256	RR (1)
2013	2	<i>S. sonnei</i> g	>256	RR (2)
2014	4	<i>S. sonnei</i> g	>256 >256	RR (3) RS
	5	<i>S. flexneri</i> 2a	128 96 48 192	RR(2) RR RR RR
	2	<i>S. flexneri</i> 3a	>256	RS (2)

3.3.2.1.3 Résistances émergentes chez *Shigella* spp.

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

➤ Résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération

En 2014, 7 souches de *S. sonnei* g C3G^R ont été isolées toutes en France métropolitaine à l’exception de deux souches isolées chez des personnes de retour d’Inde et de Grèce. L’analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques de ces souches est résumée dans le **tableau 26**.

Tableau 26. Caractéristiques des souches résistantes aux C3G isolées en 2014

N°CNR	Sérotype	Profil de résistance	CMI (mg/L)			Type de BLSE	Notion de voyage
			CRO ¹	CAZ ¹	CIP ¹		
2014/01809	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTe	32	1	-	CTX-M1	
2014/02444	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTeNalCIP	96	3	6	CTX-M1	
2014/04890	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTe	>256	96	-	CTX-M15	
2014/07047	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTeNalCIP	24	1	46	CTX-M14	
2014/07301	<i>S. sonnei</i> g	ASulTmpNalCIP	24	1,5	8	CTX-M15	Grèce
2014/07682	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTe	128	1,5	-	CTX-M1	
2014/12007	<i>S. sonnei</i> g	ASSpSulTmpTeNalCIP	48	1,5	16	CTX-M15	Inde

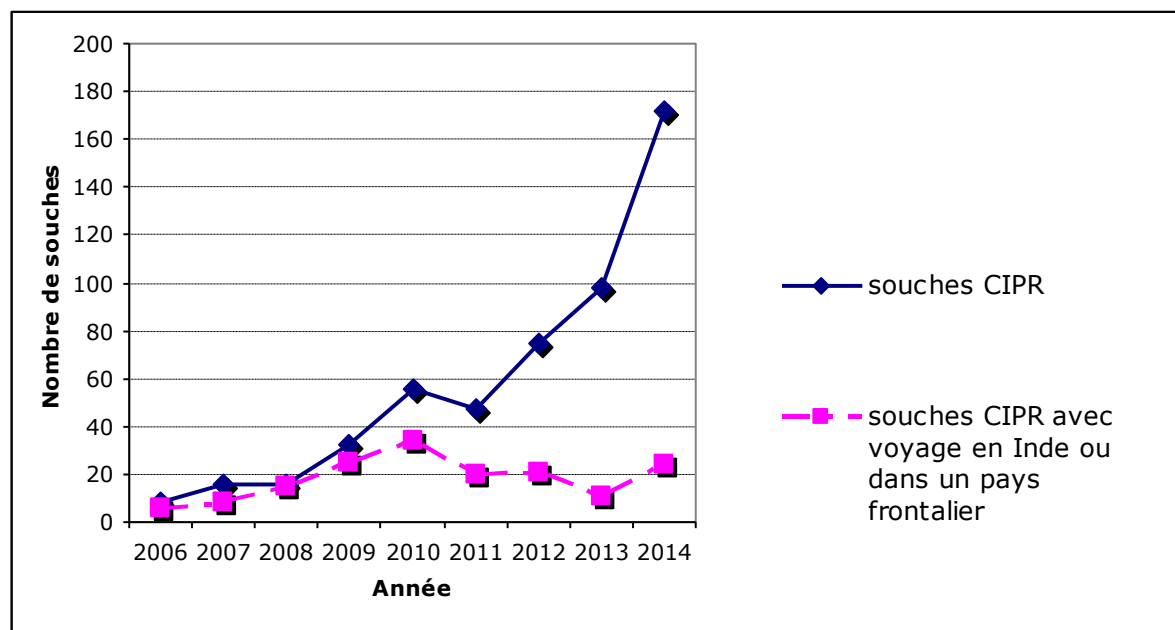
¹ : CRO, ceftriaxone ; CAZ, ceftazidime ; CIP, ciprofloxacine.

A, amoxicilline ; S, streptomycine ; Sp, spectinomycine ; Te, tétracyclines ; Sul, sulfamides ; Tmp, triméthoprim ; Nal, acide nalidixique

➤ Résistance de haut niveau à la ciprofloxacine

La résistance de haut niveau à la ciprofloxacine de souches de *Shigella* isolées en France métropolitaine n'a cessé d'augmenter depuis 2005 (**Figure 16**). En 2014, cette résistance atteint un niveau élevé puisque 172 sur 821 des souches reçues sont résistantes soit 21% contre 12,8% en 2006. La notion de voyage et notamment un retour d'Inde ou de pays limitrophes est notée pour 24 patients.

Figure 16. Evolution du nombre de *Shigella* CIP^R au CNR-ESS entre 2006 et 2014



3.3.3 Participation aux réseaux de surveillance

3.3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Une fiche de renseignements spécifique au CNR-ESS accompagne chaque souche reçue au CNR. Dans cette fiche, il doit être indiqué : le nom et l'adresse du laboratoire expéditeur, la demande d'examen, les renseignements sur le patient, les symptômes cliniques, le prélèvement et des renseignements épidémiologiques permettant de mettre en évidence les épidémies potentielles et leurs origines. Ces fiches et les résultats obtenus permettent l'interface avec l'InVS à différents niveaux. La surveillance se fait lors de la validation des résultats avec un signalement par téléphone ou courrier électronique de toute augmentation inhabituelle du nombre de souches de shigelles. De plus, dans le cadre d'une épidémie, la surveillance de l'antibiogramme est accrue de façon à signaler rapidement l'apparition d'une résistance. La surveillance des *Shigella* se fait aussi par la compilation des fiches de renseignements reçues pour *S. sonnei* et le signalement de la même façon des épidémies potentielles.

3.3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Collaboration avec le CCOMS des *Shigella* (Dr N. Strockbine, CDC, Atlanta, USA) et le Dr K. Talukder, de l'ICDDR, Dhaka, Bangladesh dans le cadre de l'étude et de la description de nouveaux sérotypes de *Shigella*.

4/ Alerte

Les responsables du CNR sont en relation quotidienne avec leurs homologues du Département des Maladies Infectieuses de l'InVS. Les épidémies potentielles détectées sont signalées par téléphone à l'InVS afin de vérifier si l'épidémie est connue et s'informer de l'enquête éventuellement en cours à leur niveau. Le CNR participe activement aux conférences téléphoniques lors des investigations d'épidémies.

Le CNR signale systématiquement à l'InVS en temps réel par téléphone, fax ou courrier électronique :

Pour les *E. coli* :

- tous les cas de SHU chez les enfants de moins de 15 ans,
- toute souche ou selle positive pour les gènes *stx*,
- tout résultat positif de sérologie *E. coli* ainsi que tout résultat positif et/ou négatif de sérologie *E. coli* concernant des enfants de moins de 15 ans.

Pour les *Shigella* :

- tous les cas groupés,
- toute augmentation anormale du nombre de *Shigella* d'un sérotype donné,
- tout nouveau profil de résistance aux antibiotiques.

Pour les *Salmonella* :

- toutes les élévations anormales de sérotypes détectées par le programme de détection ou par les responsables du CNR,
- tout nouveau profil de résistance aux antibiotiques.

Le CNR fournit au Réseau Européen de surveillance (ECDC-FWD), à travers la plateforme épidémiologique EPIS et la plateforme moléculaire Tessy-MSS, les caractéristiques microbiologiques des souches responsables d'épidémies nationales ou locales qui présentent une potentialité à se produire dans d'autres pays de la communauté européenne ou internationale et le nombre de souches ayant le même sérotype que certaines souches épidémiques signalées en Europe.

5/ Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Réunions et missions

- F.-X. WEILL. Réunion de lancement du réseau ouest-africain pour la recherche sur les maladies entériques à potentiel épidémique organisée par l'Institut Pasteur de Dakar, 3 au 7 mai 2014, Dakar, Sénégal.
- M. GOUALI. Réunion de travail du Global Foodborne Infections Network (GFN), 11 au 13 juin 2014, Genève, Suisse.
- S. LE HELLO. Réunions mensuelles à partir de juin 2014 pour la préparation des Workshop et Symposium du LabEx-IBEID, Institut Pasteur Paris, France.
- F.-X. WEILL. Orateur invité aux journées scientifiques du Centre Pasteur du Cameroun, 9 au 11 juillet 2014, Yaoundé, Cameroun.
- M. GOUALI. Journée d'échange sur l'accréditation. Communication Orale sur les conséquences actuelles et prévisibles de l'accréditation pour le CNR-ESS, 14 novembre 2014 à l'Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France.
- S. LE HELLO. Réunion préparatoire pour l'organisation du « International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis » 2016, 1^{er} décembre 2014, Paris, France.

5.2 Enseignement / formation

- S. LE HELLO. Enseignement en Master professionnel – UPMC Paris Jussieu : salmonelloses humaines en France, 7 janvier 2014, Paris, France.
- S. LE HELLO. Membre du Jury BTS Biotechnologies, 5 juin 2014, Paris, France.
- S. LE HELLO. Pré-défense de la thèse de Mme BOLAND, le 18 août 2014 et défense officielle de Mme BOLAND, le 17 septembre 2014, Louvain, Belgique.
- M. GOUALI. Cours sur les *Shigella* à l'Institut Pasteur de Lille, 18 septembre 2014, Lille, France.
- M. GOUALI. Cours sur les *E.coli* entérohémorragiques à l'Institut Pasteur de Lille, 25 septembre 2014, Lille, France.
- S. LE HELLO. Jury de thèse de Pharmacie (DES de Biologie Médicale) de Mme Violaine WALEWSKI, 3 octobre 2014, Limoges, France.
- S. LE HELLO. Comité de thèse de Mme Eliette SCHULTZ, 9 octobre 2014, Saint Pierre des Corps, France.
- M. GOUALI. Cours sur les *Salmonella* à l'Institut Pasteur de Lille, 21 octobre 2014, Lille.
- B. GARIN. Cours de Microbiologie à l'Institut Pasteur de Madagascar, 16 au 23 novembre 2014, Antananarivo, Madagascar.
- S. BONACORSI. Membre du jury d'HDR de Mr Philippe MORAND, mai 2014, Paris, France.
- S. BONACORSI. Membre du jury d'HDR de Mme Patricia MARTIN, septembre 2014, Toulouse, France.
- S. BONACORSI. Directeur de thèse de Sciences de Mr Romain BASMACI, 14 octobre 2014, Paris, France.
- S. BONACORSI. Président du Jury de thèse de Sciences de Mme Mounira SMATI, 8 décembre 2014, Paris, France.
- P. MARIANI-KURKDJIAN. Membre du Jury de thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine de Melle Céline TARD, 23 septembre 2014.

- S. BONACORSI. Enseignement en Master 1- IMVI – Paris-Descartes/ Paris-Diderot : Pathogénèse de *E.coli*, Paris, France.
- S. BONACORSI. Enseignement en Master 2- Paris-Descartes: *E.coli* a versatile pathogen, Paris, France.
- S. BONACORSI. Enseignement en Master 2- Université Paris Sud. *E.coli* de pathogénicité extra-intestinale, Paris, France.
- S.BONACORSI et P.MARIANI-KURKDJIAN. Participation à l'enseignement universitaire sur les *E.coli* intestinaux et extraintestinaux pour DCEM1, DES de Biologie, DIU de Pathologie infectieuse pédiatrique (organisé par le Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique), Hôpital Cochin (3 heures par an), Internes de Pédiatrie et de Biologie, Paris, France.

5.3 Accueil de stagiaires

Le CNR-ESS reçoit des stagiaires BTS, masters, doctorants, post-doctorants sur projet et des stagiaires étrangers, dont certains du réseau international des Instituts Pasteur, qui viennent acquérir des techniques spécifiques phénotypiques et moléculaires afin de travailler sur des souches prévalentes dans leur pays, aussi bien humaines qu'alimentaires.

Liste des stagiaires au CNR-ESS en 2014 :

- Geoffrey COSTILHES, Master Microbiologie Appliquée et Génie Biologique (Université Paris X, France), en contrat d'apprentissage, 21 octobre 2013 au 30 septembre 2014 sur la dynamique évolutive de deux lignées invasives de *Salmonella* Typhimurium ST313 en Afrique sub-saharienne.
- Estelle PROTHERY, BTS 2^{ème} année Biotechnologies (Lycée Valentine Labbé, France), 9 décembre 2013 au 14 février 2014 sur la recherche de gènes de virulence *stx1* et *stx2* dans une collection de souches de *Shigella*.
- Nicolas ALEXANDRE, BTS 2^{ème} année Biotechnologies (Lycée Pierre-Gilles de Gennes, France), 16 décembre 2013 au 21 février 2014 sur la caractérisation des gènes de résistance chez les populations de *Salmonella* multi-résistante de Nouvelle-Calédonie.
- Magdalena ZAJAC, Etudiante en thèse (National Veterinary Research Institute, Pologne), 13 au 31 janvier 2014 sur les méthodes MLST et CRISPOL.
- Alicia TRAN DIEN, Doctorante, arrivée le 3 mars 2014, "Génomique épidémiologique de *Salmonella*" Ecole Doctorale ABIES, AgroParisTech.
- Asma GADRIA, Mastère en Microbiologie et Epidémiologie Moléculaire (Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie), 17 mars au 18 avril 2014 sur l'analyse de la structure génétique des populations de la bactérie pathogène *Plesiomonas shigelloides* par séquençage à haut-débit de 3-5 souches représentatives.
- Nizar FAWAL, Post-doctorant du LabEX IBEID, arrivé le 22 avril 2014, "Comparative genomic and phylogeographic analysis of two epidemic and multidrug resistant bacterial populations: *Shigella dysenteriae* type 1 (Shiga's bacillus) and *Salmonella* Kentucky ST198".
- Alicia LARSEN, License 2 Biologie (Université Paris Sud, France), 14 avril au 31 mai 2014 sur la caractérisation complète des mécanismes de résistance aux antibiotiques d'une population de *Salmonella*.
- Clément HOGUIN, BTS 1^{ère} année Biotechnologie (Lycée Galilée, France), 26 mai au 11 juillet 2014 sur la recherche des facteurs de virulence dans une collection de souches de STEC.

- Laura KUIJPERS, Etudiante en thèse (Institut de Médecine Tropicale d' Anvers, Belgique), 4 au 29 août 2014 sur l'analyse par épidémiologie moléculaire de l'épidémie de *Salmonella* Paratyphi A au Cambodge.
- Sonia KTARI, Maître Assistante (Faculté de Médecine de Sfax, Tunisie), 1^{er} au 30 septembre 2014 sur la caractérisation génétique de la population de *Salmonella* Typhimurium sur des souches isolées entre 2000 et 2003 au CHU de Sfax en Tunisie.
- Maria Helena COSENDEY DE AQUINO, Chercheur (Universidade Federal Fluminense UFF, Brésil), 20 au 31 octobre 2014 sur l'identification des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones des souches de *Salmonella* sérotype Minnesota.
- Virginia LEO DE ALMEIDA, Chercheur (Universidade Federal Fluminense UFF, Brésil), 20 au 31 octobre 2014 sur l'identification des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones des souches de *Salmonella* sérotype Minnesota.

Liste des stagiaires au LA-RD en 2014 :

- Mathieu GENUINI, Master 2 Microbiologie Ecologie microbienne, Pathogénie des microorganismes et Anti-infectieux (Paris XI, France), décembre 2013 à octobre 2014 sur l'analyse fonctionnelle du gène *shiF* lié à l'opéron codant le sidérophore aéro bactéine chez *Escherichia coli* ».
- Nurcan SOYSAL, Master 2 Microbiologie Ecologie microbienne, Pathogénie des microorganismes et Anti-infectieux (Paris XI, France), décembre 2014 à octobre 2015 sur *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxine et virulence extra-intestinale : Epidémiologie moléculaire et conséquence thérapeutique.
- Yasmine SMAIL, 2^{ème} année de BTS BioAnalyses et Contrôles (Ecole Technique Supérieure du Laboratoire, France), 1^{er} décembre 2014 au 23 Janvier 2015 sur la caractérisation moléculaire d'un clone émergent de *Escherichia coli* O80 entérohémmorragique.

5.4 Information et conseil aux biologistes et praticiens

La plupart des informations concernant le CNR-ESS-LA (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais d'une page Internet sur le site de l'Institut Pasteur dont voici les liens :

<http://www.pasteur.fr/cnr/salmonella>

<http://www.pasteur.fr/cnr/ecoli-shigella>

<https://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/salmonella>

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

Des conseils à la fois pratiques (milieu de transport, feuille d'information...), diagnostic (importance des gènes de pathogénicité ou du sérotype détecté...), thérapeutiques et/ou épidémiologiques sont donnés de façon quasi quotidienne par téléphone ou courrier électronique (colishig@pasteur.fr ou salmonella@pasteur.fr).

6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR-ESS-LA

6.1 Activités de recherche et d'expertise en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

6.1.1 *E. coli*

6.1.1.1 *E. coli* intestinaux

- **Participation au PHRC national ZYTHROSHU 2013**

« Intérêt de l'azithromycine dans le traitement des syndromes hémolytiques et urémiques post diarrhée » Les objectifs de ce PHRC national sont :

- l'évaluation de l'intérêt d'un traitement précoce des SHU typiques post diarrhée (D+HUS) par azithromycine sur la fonction rénale à court terme (1 mois).
- l'évaluation de l'impact du traitement par azithromycine sur les différentes atteintes d'organes lors du D+HUS à la phase dite « aigue » de la pathologie (soit le premier mois après le diagnostic ou la sortie d'hospitalisation du patient)
- l'évaluation de l'impact du traitement par azithromycine sur l'éradication des EHEC à une semaine du traitement par azithromycine et le profil de résistance à l'azithromycine.

- **Etude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées chez l'homme, l'animal et dans les aliments en France – Convention de recherche et développement ANSES, VETAGRO SUP**

L'objectif général de ce projet vise à établir un bilan national (analyse de tendance et comparaison) des caractéristiques génétiques (types et profils de virulence) et phénotypiques (antibiorésistance) des souches de STEC isolées chez l'homme, dans les aliments (produits considérés comme « à risque » c'est-à-dire produits carnés laitiers essentiellement et végétaux), mais également dans le réservoir animal et son environnement. Ce bilan permettra ainsi :

- d'obtenir une analyse comparée des profils des souches animales (au sens large) et humaines et de vérifier l'existence ou non de relations clonales et de flux de gènes de virulence ou d'antibiorésistance entre ces populations.
- d'établir une surveillance des flux de gènes entre les populations de STEC présentes le réservoir animal (i.e. isolés chez les animaux, dans les denrées alimentaires ou dans l'environnement) et celles isolées chez les patients en France.
- d'obtenir par conséquent des données quant à l'émergence de nouveaux clones pathogènes pour l'homme.
- de proposer des données nécessaires à l'amélioration des systèmes de surveillance des souches de STEC en France.

Ce bilan permettra ainsi une meilleure évaluation des risques pour la santé publique liés à la présence de souches de EHEC dans les aliments en France.

- **Travaux d'expertise pour répondre à la saisine adressée au Haut Conseil de la Santé Publique le 21/05/2013 par le directeur général de la santé relative à la prise en charge des gastroentérites à EHEC**

Le Directeur Général de la Santé a adressé au Haut Conseil de la santé publique (HCSP) le 21 mai 2013, une saisine relative à la conduite à tenir en cas de gastroentérites à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). **Le CNR ESS-LA a fait partie d'un groupe de travail mis en place par la Commission spécialisée des Maladies transmissibles.**

Il était demandé au HCSP d'apporter une expertise détaillée sur les mesures de gestion des cas d'infection à EHEC comprenant :

- des éléments de conduite à tenir pour la prévention de la transmission secondaire dans l'entourage d'un cas d'infection à EHEC, en l'absence de fréquentation d'une collectivité et en situation de fréquentation d'une collectivité : dépistage, traitements, recommandations d'hygiène, éviction / réintégration,
- des éléments de conduite à tenir pour la prévention de la transmission secondaire en situation de cas groupés d'infections à EHEC en collectivité : dépistage, traitement, recommandations d'hygiène, conditions d'éviction et de réintégration, bionettoyage.

Le HCSP devait également faire des propositions sur la place des traitements antibiotiques étayées par l'analyse des données existantes.

S'appuyant sur une analyse détaillée des données existantes, le HCSP :

- émet des recommandations pour la prévention de la transmission secondaire d'infection à EHEC dans l'entourage d'un cas, ou en situation de cas groupés en collectivités ;
- précise la conduite à tenir en termes de dépistage, de mesures d'hygiène et de bionettoyage, d'éviction et de réintégration et de prise en charge thérapeutique.

De plus, le HCSP estime qu'il est nécessaire de mettre en place un réseau de surveillance des diarrhées à EHEC et de suivi de cette cohorte.

Ce rapport a été adopté par la Commission spécialisée Maladies transmissibles le 23 janvier 2015.

6.1.1.2 *E. coli* extra intestinaux (LA-RD)

- **Unité INSERM 1137**

S. Bonacorsi et P. Mariani- Kurkdjian sont membres de l'**équipe 2 de l'unité INSERM 1137** nouvellement créée en 2014. La thématique de l'unité porte sur *Escherichia coli* : épidémiologie de la résistance, étude des mécanismes de virulence avec des approches évolutives et de modélisation. Les travaux menés par les membres du LA-RD portent plus spécifiquement sur le rôle du plasmide de virulence pS88 séquencé dans les méningites néonatales, sur les apports potentiels de la phagothérapie dans le traitement des infections à *E. coli* multirésistants et sur la caractérisation d'un clone émergent de EHEC O80:H2 *stx2*.

- **Etude clinico-biologique des méningites néonatales à *E. coli* en France (LA-RD)**

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

- **Participation au PHRC national COMBAT (LA-RD)**
« Observatoire des méningites bactériennes de l'adulte » pour la caractérisation des souches de *E. coli*. Début janvier 2013.
- **Participation à l'étude du portage des BLSE dans la flore fécale chez l'enfant** en lien avec le groupe ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique du Val de Marne)
- **Participation à l'Observatoire des pyélonéphrites de l'enfant à *E. coli* BLSE sous l'égide du GPIP (LA-RD).**
- **Collaboration avec le CNR-LA de la résistance aux antibiotiques (Clermont-Ferrand).** Cette collaboration a pour but de déterminer le groupage phylogénétique des souches de *E. coli* productrices de BLSE et leur génotype de virulence "EXPEC".
- **Expertise auprès de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (LA-RD)**
S. Bonacorsi est membre du groupe de travail sur les recommandations de la SPILF 2014 « Diagnostic et traitement des infections urinaires »
- **Expertise auprès de la Haute Autorité de Santé (HAS) (LA-RD)**
S. Bonacorsi est membre d'un groupe de travail de l'HAS « Prise en charge des infections bactériennes précoces chez les nouveau-nés de plus de 34 semaines »

6.1.2 *Shigella* (CNR-ESS)

6.1.2.1 Génétique et génomique évolutive de *Shigella*

Ces travaux permettent de mieux comprendre comment évoluent les génomes au cours du temps et conduisent au développement d'outils moléculaires permettant notamment de différencier des souches épidémiques de souches sporadiques et ce même au sein de populations bactériennes génétiquement très homogènes (exemple des *S. sonnei* de biotype « g »).

Ces travaux se font en collaboration avec les Prs G. Dougan et N. Thomson du Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Royaume Uni, le Dr K. Holt de l'University of Melbourne, Australie, le Dr S. Brisse de l'Unité de Génomique Evolutive des Microbes de l'Institut Pasteur et avec le Dr C. Bouchier de la Plateforme de Génomique de l'Institut Pasteur.

Le CNR-ESS apporte son expertise sur la circulation des populations bactériennes, effectue la sélection des souches représentatives à partir de sa collection, effectue la caractérisation moléculaire et phénotypique de première intention et des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et en fonction des projets (porteur ou collaboration) recherche des financements (fonctionnement et salaires) pour le séquençage haut-débit, l'analyse et l'interprétation des résultats.

6.1.2.2 Génomique épidémiologique de *S. sonnei*

Ce projet fait suite à l'étude sur la structure des populations de *S. sonnei* (132 génomes dont 54 issus du CNR-ESS) coordonnée par le Wellcome Trust Sanger Institute et publiée en 2012 dans *Nature Genetics* (Holt et al.). Il s'agit maintenant d'utiliser le séquençage complet à haut débit (méthodologie Illumina) pour suivre et mieux comprendre les épidémies à *S. sonnei*. Une étude en cours concerne cent souches de *S. sonnei* « g » du CNR-ESS. Il s'agit de souches isolées d'écoles confessionnelles entre 1996 et 2015 en France et en Amérique du Nord ainsi que des souches de deux épidémies en lien avec des festivals en Espagne et en Ariège en 2013. Les résultats seront comparés aux méthodes traditionnelles (antibiotypie, PFGE) qui sont très peu discriminantes avec ce biotype et seront confrontés aux données épidémiologiques, en particulier plusieurs centaines de génomes issus de cas. d'écoles confessionnelles du Royaume Uni, de Belgique et de souches circulantes en Israël depuis 1991.

6.1.2.3 Etude de la structure des populations et suivi de clones internationaux de *S. flexneri*

Ce projet coordonné par le Wellcome Trust Sanger Institute concerne le séquençage complet (méthodologie Illumina) d'une collection représentative mondiale de plus de 500 souches de *S. flexneri*. Le CNR a participé de façon majeure à cette étude en sélectionnant dans sa collection 151 souches acquises entre 1918 et 2013 sur différents continents et en assurant l'analyse des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Les résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence une population de *S. flexneri* 2a ayant acquis un prophage *stx1* à Saint-Domingue et une population de *S. flexneri* 3a circulant chez des homosexuels au Royaume Uni et en France. Un article a été soumis en 2015.

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

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

Le CNR-ESS a initié et coordonné une étude de génomique évolutive de cet agent pathogène après avoir rassemblé pendant 7 ans une collection unique de plus de 350 souches isolées sur les différents continents de 1915 à 2011. Ces souches proviennent de la collection du CNR ainsi que de celles de nombreuses équipes participantes : CDC (Atlanta, USA), iccdr,b, (Dacca, Bangladesh), PHE (Colindale, Royaume Uni), PHAS (Stockholm, Suède), NIPH (Oslo, Norvège), AFRIMS (Bangkok, Thaïlande), RKI et BfR (Berlin, Allemagne), CDCC (Pékin, Chine), CIP (Paris, France), ...

L'analyse de la sensibilité aux antibiotiques de cette collection a permis d'identifier les 1ères souches multirésistantes en Asie en 1966 puis lors de la grande épidémie d'Amérique centrale en 1969-1972 (>500,000 dont plus de 20,000 décès). Lors de cette épidémie américaine, la multi résistance à la streptomycine, aux sulfamides, au chloramphénicol et à la tétracycline était médiée par un plasmide de type IncB. De 1972 à 1981, plusieurs autres plasmides, de types IncX, IncK, IncF ou IncI1, entraînant une résistance additionnelle aux aminopénicillines et au cotrimoxazole ont été identifiés. Nous avons mis en évidence qu'au cours des années 1980 à partir de l'Inde, la très grande majorité des souches avait acquis dans le chromosome

un îlot de pathogénicité (le PAI) comportant une région de multirésistance aux antibiotiques (le SRL).

A ce jour le séquençage par la méthode Illumina a été réalisé sur 332 souches. L'analyse des 16900 SNPs informatifs et du génome accessoire a permis de mettre en évidence 3 lignées génétiques avec une forte tendance phylogéographique. Cependant une transmission intercontinentale entre le sous-continent Indien et l'Afrique de l'Est a été mise en évidence à la fin des années 1980 avec un rapide remplacement des lignées africaines antérieures par cette nouvelle souche possédant le SRL. Des souches historiques ont permis de mettre en évidence une lignée génétique ayant circulé en Europe du Sud, Centrale et de l'Est depuis les années 1880 et ce jusque dans les années 1970 en Afrique du Nord

Plus de six plasmides de grande taille des différents groupes d'incompatibilité sont en cours d'assemblage après séquençage 454 pour comprendre la genèse du SRL-PAI.

Dix génomes représentant toutes les lignées et sous-lignées génétiques ont également été séquencés par la technologie PacBio.

Un article sera soumis pour publication dans un journal de haut niveau scientifique en 2015.

6.1.2.5 Méthodes de typage des souches de *Shigella*

Le typage des souches de *Shigella* repose sur le sérotypage à l'aide d'antisérums dirigés contre les antigènes somatiques O. Il est nécessaire de pouvoir disposer de méthodes moléculaires alternatives en cas de souches autoagglutinables (« rough »), de nouveaux sérotypes ou en cas de rupture de stock des sérums de typage.

Tous ces travaux se font au sein du CNR-ESS. Le but ultime étant d'avoir un dictionnaire sérotype/*fliC*/CRISPR/MLST permettant de caractériser l'ensemble des populations de *Shigella* et de EIEC. Les données génomiques seront progressivement incorporées à ce dictionnaire.

• **Caractérisation des séquences du gène *fliC* chez *Shigella***

Les souches de *Shigella* étant immobiles, le gène de la flagelline est considéré comme cryptique. Il existe une corrélation entre les allèles de *fliC* et le séro groupe des *Shigella*. Ceci a été démontré au CNR-ESS par analyse des profils de restriction de *fliC* (Roney et al. J Clin Microbiol. 2001). Cependant, le séquençage du gène *fliC* par méthode Sanger est plus informatif qu'une analyse des profils de restriction.

Depuis 2009, le CNR-ESS a complété sa base de séquences *fliC* avec 158 souches représentatives des différents sérotypes de *Shigella*. L'analyse des résultats a permis de mettre en évidence la présence de séquences d'insertion (IS) chez différents sérotypes (*S. boydii* 7, 16 & 17 ; *S. dysenteriae* 1, 9, 11 et 13). Après suppression des IS, des clusters de séquences *fliC* on été mis en évidence :

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

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

Certain stéréotypes n'ont pu être amplifiés par PCR malgré différents essais avec différentes amorces : *S. dysenteriae* 2, sérotype provisoire BEDP 02-5104, et quelques *S. boydii* 12. En 2014, une analyse par WGS de *S. dysenteriae* 2 a montré en 2014 qu'une large région comprenant une partie du gène *fliC* avait été déletée. Des primers spéciaux vont être synthétiser pour pouvoir amplifier ce gène *fliC* incomplet.

- **Etude du polymorphisme des Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) dans le génome de *Shigella***

Le terme CRISPR désigne une famille de séquences génomiques répétées. Cette famille se caractérise par des séries de répétitions directes, courtes (de 21 à 37 paires de bases) et régulièrement espacées par des séquences, généralement uniques et non codantes, de 20 à 40 paires de bases (espaceurs ou spacers). Le polymorphisme de ces régions est souvent utilisé pour sous-typé certains pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, ..

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

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

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

Le CNR-ESS est en train de compléter une base de données MLST de l'ensemble des populations de *Shigella* en suivant le protocole du «University College Cork» (<http://mlst.ucc.ie/>) utilisant 7 gènes de ménage : *adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase) et *recA* (ATP/GTP binding motif).

Le séquençage de souches de *Shigella* de différents sérotypes a débuté en 2009, et se poursuivra afin d'obtenir une base représentative de tous les profils MLST (séquençotype, ST) des *Shigella*. A l'heure actuelle, plus de 270 souches ont été typées.

6.1.3 *Salmonella* (CNR-ESS)

6.1.3.1 Contribution au développement de nouvelles méthodes de typage et sous-typage des *Salmonella*

Le CNR-ESS s'efforce de développer des outils moléculaires à haut débit, à moindre coût permettant d'analyser de façon simple et robuste les relations phylogénétiques entre les isolats tout en gardant un lien avec les méthodes de typages précédentes, comme le sérotypage, de façon à ne pas perdre les données accumulées depuis plus de 80 ans.

6.1.3.1.1 La méthode MLST

Lors d'un travail en collaboration avec le Pr M. Achtman (University College Cork, Irlande) et S. Brisse (PF8, Institut Pasteur), nous avons étudié une collection de 4257 souches de *S. enterica* appartenant à 554 sérotypes par la technique de multilocus sequence typing (MLST). La contribution du CNR-ESS et du CCOMS était de 1900 souches pour 500 sérotypes. Cette méthode, facilement automatisable, repose sur la caractérisation par séquençage de sept gènes « de ménage » non soumis à une pression de sélection. Les résultats montraient une parfaite corrélation entre sérotypes et multilocus sequence types (ST). De plus pour la majorité des sérotypes (à l'exception de Typhimurium et Enteritidis les deux plus prévalents à l'échelle planétaire) le MLST était plus discriminant que le sérotype. Ce travail concluait que l'utilisation du MLST pouvait être une alternative au sérotypage, la méthode de référence pour le typage des salmonelles depuis plus de 80 ans. L'article publié en 2012 (Achtman et al. Plos Pathogens), pour lequel le CNR-ESS partage la première position, a déjà été visualisé cité 61 fois au 10 avril 2015). L'ensemble des données associées à chaque souche (origine, sérotype, ST, phage type, ..) est accessible à la communauté scientifique via un site web dédié : *Salmonella enterica* MLST Database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

Le travail se poursuit dans le but de finaliser au cours des prochaines années les 2600 sérotypes de *Salmonella* déposés au CCOMS. Au 07 avril mars 2015, la base de donnée MLST du CNR-ESS dans le logiciel Bionumerics comprenait 2446 souches appartenant aux sous-espèces *enterica* (n=1863), *salamae* (n=240), *arizonae* (n=52), *diarizonae* (n=176), *houtenae* (n=68) et *indica* (n=15) de l'espèce *enterica* et à l'espèce *bongori* (n=32) couvrant 662 sérotypes. La *Salmonella enterica* MLST Database quant à elle comprenait plus de 6000 souches définissant 1952 ST.

6.1.3.1.2 Inventaire des séquences des gènes *fliC* et *fljB* codant pour les antigènes flagellaires H

Le sérotypage classique étant basé sur l'analyse antigénique des facteurs somatiques O et des facteurs flagellaires H, une analyse des séquences des gènes *fliC* et *fljB* codant pour les flagellines ou antigènes H permet de déterminer avec précision les antigènes H même en cas de souches non-sérotypables (rough, monophasiques ou immobiles) ou en cas de sérotypes rares entraînant des réactions croisées avec les sérums de typage. Nous continuons l'analyse extensive de la diversité de ces gènes de façon à développer un dictionnaire sérotype/séquences *fliC* et *fljB*/MLST. Au 07 avril 2014, 1166 souches ont été analysées simultanément par sérotypage, MLST et séquençage des gènes *fliC* et *fljB*.

6.1.3.1.3 Etude du polymorphisme des régions CRISPR pour typer et sous-typer les *Salmonella* en une seule étape

Le CNR-ESS a étudié une nouvelle approche pour le typage des salmonelles basée sur le polymorphisme d'une famille de séquences répétées d'ADN nommée CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Chez *Salmonella*, il existe deux régions, CRISPR1 et CRISPR2 séparées par 20 kb dont une partie contient la machinerie CAS (CRISPR-associated genes). Chaque région est caractérisée par la succession de séquences directes répétées d'ADN (DR ou direct repeats) d'une longueur moyenne de 29 pb et régulièrement intercalées par des séquences non codantes de 32 pb appelées spacers (27 en moyenne par souche). Dans un premier travail publié en 2012 (Fabre et al. Plos One, cité 41 fois et vu 7870 fois au 11 avril 2015), le contenu en spacers d'une collection globale de 750 souches représentatives de plus de 130 sérotypes dont les plus fréquemment impliqués en

pathologie humaine, comme Typhimurium et Enteritidis, a été inventorié. Plus de 3800 spacers ont été mis en évidence par séquençage Sanger des deux régions (de 500 pb à 4 kb par région). Le contenu en spacers de chaque souche (de 1 à 124 par région) était parfaitement corrélé au sérotype et même à la structure génétique des populations obtenue par MLST. Quand plusieurs souches d'un même sérotype étaient étudiées, la composition en spacers pouvait varier (duplication, SNP, variant VNTR, perte et acquisition de spacers) entre les souches et cette variabilité au sein d'un même sérotype était concordante avec les méthodes traditionnelles de sous-typage (p. ex. bonne identification des souches du clone DT104 de Typhimurium ou des souches d'Enteritidis dites Danysz, toujours utilisées comme raticide dans certains pays). Ce travail a fait également l'objet d'une demande de dépôt de brevet (no. FR07/09188 Weill et al. « Typage et sous-typage moléculaire de *Salmonella* par identification des séquences nucléotidiques variables des loci CRISPR ») avec extension internationale (no. PCT/IB200/8004004).

Le travail se poursuit et à l'heure actuelle plus de 1400 souches de plus de 200 sérotypes ont été étudiées et 7100 spacers différents décrits. Le but est de finaliser au cours des prochaines années les 2600 sérotypes de *Salmonella* déposés au CCOMS.

6.1.3.1.4 Génomique épidémiologique

L'arrivée des technologies de séquençage haut-débit sur des appareils de paillasse (GS junior, MiSeq, IonPGM) et adaptées aux génomes bactériens est en train de révolutionner le monde de l'épidémiologie moléculaire et du typage bactérien.

Nous commençons à travailler sur l'utilisation du séquençage haut-débit comme méthode unique pour le typage des salmonelles. Des financements extérieurs ont permis le recrutement d'un doctorant biologiste et d'un post-doctorant bioinformaticien ainsi que la possibilité de séquencer 1000 génomes en 3 ans. Il s'agira de génomes de 300 Typhimurium, 100 Enteritidis et 600 souches de 200 autres sérotypes d'intérêt. Les essais se font sur un petit échantillon de souches par la méthode MiSeq (2x300 pb) d'Illumina après préparation des bibliothèques avec le kit Nextera (Illumina) et multiplexage de 20 souches par flow cell à la plateforme Génomique de l'Institut Pasteur (Dr C. Bouchier). A partir de 2015 via la structure PIBnet de l'Institut Pasteur et ses séquenceurs dédiés pour cette activité de Santé Publique, plusieurs milliers de génomes pourront être réalisés par an rien que pour le CNR-ESS ouvrant la voie à l'épidémiologie génomique en temps réel une fois que les différents outils d'analyses et de les bases de données auront été développées. Plusieurs régions du génomes seront analysées à partir des séquences génomiques réassemblées : le polymorphisme de 7 (MLST) à plus de 200 gènes du core genome (cgMLST), la structure du locus *rfb* définissant l'antigène O et la séquence des gènes *fliC* et *fliB* codant pour les antigènes H, le polymorphisme des régions CRISPR, les gènes de résistance aux antibiotiques seront extraits, Ce travail bénéficiera de l'apport du dictionnaire sérotype/MLST/CRISPR décrit dans les paragraphes précédents. Une nouvelle nomenclature des souches de *Salmonella* sera à redéfinir mais celle-ci devra rester corrélée aux anciennes méthodes de typage tel le sérotypage.

Ce travail sera fait en synergie avec nos collègues de la Gastrointestinal Bacteria Reference Unit (Dr K. Grant) de Public Health England (Colindale).

6.1.3.1.5 Etude du polymorphisme des régions CRISPR sur une collection mondiale de souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium

Le CNR-ESS a mis au point en 2012 (Fabre et al. Plos One) une méthode de caractérisation rapide des souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de son variant monophasique. Cette méthode nommée CRISPOL (pour CRISpr POLymorphisms) est basée sur la présence ou non des soixante-huit spacers de ce sérotype après détection par hybridation sur microsphères (technologie Luminex). Actuellement, notre base de données contient plus de 8700 souches typées par cette technique générant 799 CRISPOL types (CT) différents.

Son utilisation en temps réel devrait permettre d'augmenter significativement la sensibilité de la détection des épidémies liées à *S. enterica* sérotype Typhimurium, l'agent pathogène responsable de 50% des salmonelloses dans notre pays.

Elle a été utilisée en 2013 pour identifier rapidement un clone prévalent et associé à des formes invasives en République Démocratique du Congo (Ley et al. Emerg Infect Dis 2014). Ce clone habituellement reconnu par son type MLST (ST313) peut maintenant être facilement identifié par son type CRISPOL (CT28) en une journée et à un coût six fois moindre que le MLST.

Cette méthodologie a été également transférée à l'ANSES à Maisons-Alfort (Dr A. Brisabois) et à l'University College Cork (Pr M. Achtman) en Irlande. Une comparaison de la base de données du CNR-ESS avec environ 1000 souches animales ou alimentaires de l'Anses est en cours. Une autre étude concernant 7300 souches mondiales (humaines et non-humaines, historiques et contemporaines) est également en cours d'analyse.

6.1.3.1.6 Etude de la coévolution entre les régions CRISPR et le core genome chez 1000 souches de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de son variant monophasique

Ce travail en collaboration avec le Pr M. Achtman (University College Cork, Irlande puis University of Warwick, RU) qui fait suite à l'analyse de la collection mondiale par la technique CRISPOL a pour but de comparer l'évolution des 2 régions CRISPR (polymorphisme du contenu en spacers) à celle du génome (principalement SNPs informatifs sur le core genome). Pour cela en plus de 600 génomes disponibles dans les bases de données, une collection de 350 souches historiques et appartenant aux différents groupes CRISPOL a été sélectionnée et séquencée au CNR-ESS. Des résultats préliminaires sur 600 génomes montraient une excellente corrélation entre les deux approches indiquant que le polymorphisme des régions CRISPR serait un moyen fiable d'apprécier la distance génétique entre deux isolats.

6.1.3.1.7 Génomique évolutive de différents sérotypes de *Salmonella*

* Une étude de **génomique évolutive sur *S. enterica* sérotype Kentucky ST198**, la souche émergente et multirésistante aux antibiotiques décrite par les responsables du CNR (Weill et al. Emerg Infect Dis 2006, Le Hello et al. J Infect Dis 2011, Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013). Après avoir rassemblé une collection globale de cet agent pathogène (souches de 1937 à 2013, humaines, animales, environnementales, des différents continents), 100 génomes ont été séquencés grâce à des financements extérieurs. L'analyse bioinformatique est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Melbourne (Dr K. Holt, scientifique ayant effectué un séjour scientifique dans l'Unité BPE en 2012). Un post-doctorant en bioinformatique a été recruté par l'Unité BPE en 2014 en partie pour ce projet et ce dans le cadre du LabEX IBEID (Prs Sansonetti et Cossart).

* Collaboration avec le Pr Jan Jacobs de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique) pour l'analyse par **génomique comparative des souches historiques et épidémiques de *S. enterica* sérotype Paratyphi A du Cambodge**. Une centaine de souches a ainsi séquencée au CNR-ESS. Ce travail fait suite à une collaboration avec les Prs M. Achtman (University of Warwick,) et G. Dougan (Sanger Institute) au cours de laquelle 149 souches de sérotype Paratyphi A (dont 91 provenaient de la collection du CNR-ESS), isolées depuis le début du 20^{ème} siècle sur tous les continents, avaient été séquencées et le travail publié en 2014 (Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014).

* Collaboration avec les Prs G. Dougan et N. Thomson (Sanger Institute) à plusieurs autres études de **génomique comparative de *S. enterica* sérotypes Paratyphi B, Weltevreden, Enteritidis** (souches invasives africaines). Ces projets de grande ampleur coordonnés par le Sanger Institute comprennent de 100 à 2000 génomes et sont au stade de l'analyse des séquences. Le CNR-ESS a contribué aux différents projets par le choix des souches appropriées (de 50 à 350 par projet) en fonction des données épidémiologiques, des caractéristiques phénotypiques et génotypiques et des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

* Collaboration avec le Dr R. Hendriksen (Technical University of Denmark) à une étude de **génomique évolutive de *S. enterica* sérotype Typhimurium DT104 et de *S. enterica* sérotype Dublin**. Le CNR-ESS a fourni 85 souches de Typhimurium et 40 de Dublin dont des souches historiques de la fin des années 1960 identifiées dans la collection du CNR-ESS.

6.1.3.2. Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Salmonella*

Le CNR *Salmonella* a mené en 2014 plusieurs travaux sur la caractérisation de souches résistantes aux antibiotiques :

* Poursuite de la caractérisation systématique de toutes les souches de *S. enterica* résistantes aux C3G isolées en France et participation aux investigations nationales (Montevideo, Brandenburg, Blockley) et internationales (Harrois et al. Clin Microbiol Infect 2013). Une attention particulière sur les souches résistantes à l'azithromycine est portée par le CNR-ESS.

* Poursuite d'un suivi international sur la diffusion de la souche de *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 (Le Hello et al. Lancet Infect Dis 2013 et Le Hello et al. Front Microbiol 2013). Parallèlement, les souches possédant le SGI1 et résistantes aux quinolones sont également en cours d'investigation microbiologique en collaboration avec l'équipe du Dr Cloeckaert (INRA de Nouzilly)

* Caractérisation des souches de *S. enterica* résistantes aux carbapénèmes (OXA-48, VIM-2, NDM-1). L'analyse globale des plasmides portant ces gènes de carbapénémases est actuellement en cours au CNR-ESS.

6.2 Liste des publications et communications 2014 pour le CNR-ESS-LA

6.2.1 Publications nationales

1. **Le Hello, S.** (2014). *Salmonella* : une bactérie multi-résistante aux antibiotiques dans nos assiettes. **Journal des Anti-Infectieux**, 2014. 16 :192-198.
2. Colomb-Cotinat, M., **Le Hello, S.**, Rosières, X., Lailler, R., **Weill, F.X.**, Jourdan-Da Silva, N. (2014). Salmonelloses chez des jeunes enfants et exposition aux reptiles domestiques : investigation en France métropolitaine en 2012. **Bulletin épidémiologique hebdomadaire**, 1-2:2-7.
3. Colomb-Cotinat, M., **Le Hello, S.**, Rosières, X., Lailler, R., **Weill, F.X.**, Jourdan-Da Silva, N. (2014). Cas publiés de salmonelloses chez les jeunes enfants secondaires à une exposition aux reptiles : revue bibliographique 1993-2013. **Bulletin épidémiologique hebdomadaire**, 1-2:8-16.
4. **Mariani-Kurkdjian, P.**, **Bonacorsi, S.** (2014). Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entéro-hémorragiques - **Feuilles de Biologie**, N° 317.
5. **Bonacorsi, S.** (2014). Diagnostic des infections bactériennes intestinales – **REMIC 2014**.

6.2.2 Publications internationales

1. Jones, G., **Le Hello, S.**, Jourdan-da Silva, N., Vaillant, V., de Valk, H., **Weill, F.X.**, and Le Strat, Y. (2014). The French human *Salmonella* surveillance system : evaluation of timeliness of laboratory reporting and factors associated with delays, 2007 to 2011. **Euro Surveillance** 19, pii :20664.
2. Baucheron, S., Monchaux, I., **Le Hello, S.**, **Weill, F.X.**, and Cloeckert, A. (2014). Lack of efflux mediated quinolone resistance in *Salmonella* serovars Typhi and Paratyphi A. **Frontiers in Microbiology** 5, 12.
3. **Issenhuth-Jeanjean, S.**, Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., and **Weill, F.X.** (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology** 165, 526-530.
4. Jure, M.A., Duprilot, M., Musa, H.E., Lopez, C., de Castillo, M.C., **Weill, F.X.**, Arlet, G., and Decre, D. (2014). Emergence of KPC-2-Producing *Salmonella* Serotype Schwarzengrund in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 58, 6335-6336.
5. Compain, F., Poisson, A., **Le Hello, S.**, Branger, C., **Weill, F.X.**, Arlet, G., and Decre, D. (2014). Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in Enterobacteriaceae. **International Journal of Medical** 304, 236-242.

6. Zhou, Z., McCann, A., **Weill, F.X.**, Blin, C., Nair, S., Wain, J., Dougan, G., and Achtman, M. (2014). Transient Darwinian selection in *Salmonella* serovar Paratyphi A during 450 years of global spread of enteric fever. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111, 12199-12204.
7. **Fabre, L., Le Hello, S., Roux, C., Issenhuth-Jeanjean, S., and Weill, F.X.** (2014). CRISPR is an optimal target for the design of specific PCR assays for *salmonella* serotypes Typhi and Paratyphi A. **PloS Neglected Tropical Diseases** 8, e2671.
8. Gay, N., **Le Hello, S., Weill, F.X.**, de Thoisy, B., and Berger, F. (2014). *Salmonella* serotypes in reptiles and humans, French Guiana. **Veterinary Microbiology** 170, 167-171.
9. Ley, B., **Le Hello, S.**, Lunguya, O., Lejon, V., Muyembe, J.J., **Weill, F.X.**, and Jacobs, J. (2014). Invasive *Salmonella* serotype typhimurium infections, Democratic Republic of the Congo, 2007-2011. **Emerging Infectious Diseases** 20, 701-704.
10. **Harrois, D., Breurec, S., Seck, A., Delaune, A., Le Hello, S., Pardos de la Gandara, M., Sontag, L.,** Perrier-Gros-Claude, J.D., Sire, J.M., **Garin, B., and Weill, F.X.** (2014). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical *Salmonella* isolates in Dakar, Senegal, from 1999 to 2009. **Clinical Microbiology and Infection** 20, O109-116.
11. King, L.A., Loukiadis, E., **Mariani-Kurkdjian, P.,** Haeghebaert, S., **Weill, F.X.,** Baliere, C., Ganet, S., **Gouali, M.,** Vaillant, V., Pihier, N., Callon, H., Novo, R., Gaillot, O., Thevenot-Sergentet, D., **Bingen, E.,** Chaud, P., and de Valk, H. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. **Clinical Microbiology and Infection** doi : 10.1111/1469-0691.12736.
12. Pedersen, K., Sørensen, G., Szabo, I., Hächler, H., and **Le Hello, S.** (2014). Repeated isolation of *Salmonella enterica* Goverdhan, a very rare serovar, from Danish poultry surveillance samples. **Veterinary Microbiology** 174, (3-4) :596-9.
13. **Mariani-Kurkdjian, P.,** Lemaître, C. Bidet, P., Perez, D., Boggini, L., Kwon, T., and **Bonacorsi, S.** (2014). Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype **New Microbes and New Infections**. 2(4):127-31.
14. Amara, M., **Bonacorsi, S.,** Bedel, J., Mira, J.P., Laurent, V., Socha, K., Bruneel, F., Pagon, B., Bédos, J.P., and Grimaldi, D. (2014). Group A *Escherichia coli*-related purpura fulminans: an unusual manifestation due to an unusual strain? **Journal of Clinical Microbiology** 52(12):4404-6.
15. Burdet, C., Clermont, O., **Bonacorsi, S.,** Laouénan, C., Bingen, E., Aujard, Y., Mentré, F., Lefort, A., Denamur, E., COLIBAFI Group (2014). *Escherichia coli* bacteremia in children: age and portal of entry are the main predictors of severity. **The Pediatric Infectious Disease Journal** 33(8):872-9.

16. Surgers, L., Bleibtreu, A., Burdet, C., Clermont, O., Laouénan, C., Lefort, A., Mentré, F., Carbonne, B., **Bingen, E.**, Meynard, J.L., Denamur, E., COLIBAFI Group (2014). *Escherichia coli* bacteraemia in pregnant women is life-threatening for fetuses. **Clinical Microbiology and Infection** 20(12):O1035-41.
17. Roubaud Baudron, C., Panhard, X., Clermont, O., Mentré, F., Fantin, B., Denamur, E., Lefort, A., **COLIBAFI Group** (2014). *Escherichia coli* bacteraemia in adults: age-related differences in clinical and bacteriological characteristics, and outcome. **Epidemiology & Infection** 142(12):2672-83.
18. Lemaître, C., Bidet, P., Benoist, J.F., Schlemmer, D., Sobral, E., d'Humières, C., and **Bonacorsi, S.** (2014). The ssbL gene harbored by the ColV plasmid of an *Escherichia coli* neonatal meningitis strain is an auxiliary virulence factor boosting the production of siderophores through the shikimate pathway. **Journal of Bacteriology** 196(7):1343-9.
19. Bidet, P., Plainvert, C., **Bonacorsi, S.** (2014). *Escherichia coli* "O45:K1:H7-B2-ST95" harbor an O-antigen cross reacting with reference antigen O45 that should be designated O45S88. **Veterinary Microbiology** 168(2-4):459.

6.2.3 Congrès/Communications nationales et internationales

6.2.3.1 Communications nationales

- S. BONACORSI. Communication Orale. Société Française De Pédiatrie, 22 au 24 Mai 2014, Lyon.
- S. LE HELLO. Communication Affichée. Journées départementales Infection & Epidémiologie de l'Institut Pasteur, 12 au 13 novembre 2014, Villiers-Le-Mahieu.
- B. GARIN. Communication Orale. Journées départementales Infection & Epidémiologie de l'Institut Pasteur, 12 au 13 novembre 2014, Villiers-Le-Mahieu.
- S. BONACORSI. Communication Orale. 34^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse, 27-28 novembre 2014, Paris.
- P. MARIANI-KURKDJIAN. 34^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse, 27-28 novembre 2014, Paris.
- B GARIN. Communication orale. Journées départementales Infection & Epidémiologie de l'Institut Pasteur, 12 au 13 novembre 2014, Villiers-Le-Mahieu.
- P. MARIANI-KURKDJIAN, S. Liguori, A. Andrianarivelo, P. Bidet, C. Jost, S. BONACORSI. Communication affichée (Poster 587). Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) : apport du nouveau test LIAISON® EHEC Toxins. 34^e RICAI, novembre 2014, Paris.
- M. Desmarest, P. MARIANI-KURKDJIAN, G. Galli-Gibertini, J.C. Mercier, S. BONACORSI, F. Angoulvant. Communication Orale. Infections urinaires à BLSE aux urgences pédiatriques en 2012. Congrès de la Société Française de Pédiatrie 2014, Lyon.

6.2.3.2 Communications internationales

- G. COSTILHES et S. LE HELLO. Communication Orale. Geographical and temporal dynamics of the new emerging iNTS serovar Typhimurium ST313 in sub-Saharan Africa. 1st Symposium LabEx-IBEID, “Can one anticipate the next emerging infectious diseases in Europe”, 15 september 2014, Institut Pasteur, Paris.

6.2.4 Conférences sur invitation

- S. LE HELLO. *Salmonella* : une bactérie multi-résistante aux antibiotiques dans nos assiettes. Journées départementales Infection & Epidémiologie, 12 mars 2014, Institut Pasteur, Paris.
- S. LE HELLO. Epidémie à *Salmonella* Kentucky ST198, dans l’œil du génome. 10ème congrès national de la société française de microbiologie, SFM, 1^{er} avril 2014, Institut Pasteur, Paris.
- F.X. WEILL. Participation à la conférence inaugurale du Prof. Mark ACHTMAN à l’université de Warwick, 28 mai 2014, Warwick.
- S. LE HELLO. L’odyssée de *Salmonella* Kentucky ST198, de 1960 à nos jours. Séminaire de l’Institut de génétique et microbiologie (IGM), Faculté des sciences d’Orsay-Paris-Sud, 3 juin 2014, Orsay.
- M. GOUALI. Infections émergentes et réémergentes : Exemple de l’épidémie à *E. coli* O104 :H4. Journée de la Société Vétérinaire Pratique de France (SVPF) du 7 octobre 2014.
- S. LE HELLO. Synthèse des données de surveillance du CNR-ESS. 18^{ème} réunion du réseau *Salmonella*, 2 décembre 2014, Maisons-Alfort.

7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d’hygiène alimentaire, environnementaux

7.1 *Salmonella*

Le CNR-ESS va poursuivre sa collaboration avec les laboratoires de l’ANSES, en particulier l’unité caractérisation et épidémiologie bactérienne de Maisons-Alfort (Dr A. Brisabois, Dr R. Lailler) et du LNR *Salmonella* à Ploufragan (Dr Bohnert, Dr Kerouanton). Le CNR-ESS apporte son expertise sur le sérotypage et au transfert de nouvelles technologies à ces laboratoires et participent conjointement aux investigations épidémiologiques. Pour exemple, la méthodologie CRISPOL a été transférée à l’ANSES à Maisons-Alfort et une comparaison de la base de données du CNR-ESS (> 6000 souches humaines) avec celle de l’ANSES (environ 1000 souches animales ou alimentaires) est en cours.

Le CNR-ESS est parfois sollicité pour avis d’experts sur certaines saisines ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2033/99/CE.

Le CNR-ESS participe en tant qu’expert au consortium « Salmonovar » coordonné par l’Institut Français du porc (Ifip) qui consiste à suivre l’évolution de souches monophasiques de Typhimurium dans des matrices de saucisson sec.

Le CNR-ESS collabore avec des laboratoires scientifiques vétérinaires nationaux et internationaux (INRA, DTU....).

7.2 *Escherichia coli*

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme les Ecoles Vétérinaires de Lyon (LNR *E. coli*) et de Maisons-Alfort, ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

A cet effet, dans le cadre d'une convention de recherche et développement de l'ANSES, VETAGRO-SUP, une étude a été initiée en 2013 portant sur **l'étude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des souches STEC isolées chez l'homme, l'animal et dans les aliments en France**. Cette étude s'est poursuivie en 2014. Ses objectifs sont décrits au paragraphe 6.1.1.1

8/ Programme d'activités 2015-2016

8.1 Apporter une expertise microbiologique

8.1.1 Infections à *E. coli*

8.1.1.1 Infections à *E. coli* entéro-hémorragiques

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

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

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

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

- l'agglutination des souches d'origine intestinale avec les antisérums : O25, O26, O44, O55, O78, O86, O91, O103, O111, O114, O118, O119, O124, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O157, O158, O164,
- la recherche par PCR des gènes de virulence : *stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA* et *AggR* sur souches bactériennes d'origine intestinale et dans les selles d'adultes,
- le sous typage des gènes *stx1* et *stx2*
 - la recherche d'anticorps anti-LPS (IgA et IgM) des principaux sérotypes de EHEC O26, O55, O91, O103, O111, O128, O145, O157 et O104) dans le sérum par la méthode de line-blot.

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

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

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

- la recherche par PCR des gènes de virulence dans les selles par PCR en temps réel et sur les souches isolées de selles,
- la recherche des variants des gènes de virulence,
- le sérotypage par PCR multiplex permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O145.

La PCR peut être réajustée en fonction des données épidémiologiques. Ainsi, devant l'augmentation de sa prévalence en 2013, le sérotype *E. coli* O80 va être ajouté à la liste des sérotypes testés.

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

Le CNR-ESS-LA poursuit le travail d'information des laboratoires et de formation de stagiaires déjà entrepris. Deux articles sur le diagnostic des EHEC sont parus en 2013 dans la Presse Médicale et dans les Feuilles de Biologie.

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

- **Développement et mise en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches. Distinction des souches responsables de cas groupés de celles responsables de cas sporadiques et affiliation des souches aux différents clones**

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

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

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

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

- Adhésines : p α mbriae (*papC*, *papGII*, *papGIII*), S α mbriae (*sfa/foc*)
- Toxines : hémolysines (*hlyC*), cytotoxique nécrotisant (*cnf1*)
- Systèmes de captation du fer : yersiniabactine (*fyuA*), aéro bactéine (*iucC*), salmochéline (*iroN*)
- Invasines : invasive brain endothelial cell (*ibeA*)

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

Les sérogroupes les plus fréquents sont recherchés par une PCR multiplex mise au point dans le laboratoire. L'ensemble de ces caractéristiques associé à la recherche phénotypique du séro groupe capsulaire K1 et des principaux antigènes somatiques O (83, 45, 18, 16, 7, 1) permettra d'affilier en temps réel chaque souche à un groupe clonal. Ce résultat sera confronté aux données cliniques de chaque patient.

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

Le laboratoire associé apportera également son expertise dans l'analyse de la survenue de cas groupés ou de la transmission mère-enfant qui pourra être réalisée grâce au typage des souches par PFGE. Ces investigations bénéficieront de l'expérience du laboratoire depuis une quinzaine d'années dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire ce qui a permis de constituer une banque de profils type.

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

Le LA-RD apportera une expertise pour l'aide au diagnostic des méningites néonatales décapitées par une antibiothérapie par la réalisation de PCR spécifiques vis-à-vis de *E.coli* et le cas échéant, vis-à-vis d'autres bactéries responsables de méningites néonatales. Le laboratoire a acquis une expérience en matière de diagnostic par PCR des méningites décapitées (Negre et al. Infect Immun. 2004).

8.1.1.3. Etude et suivi de la résistance des souches de *E.coli* aux antibiotiques en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques (LA-RD)

Le LA-RD étudie la sensibilité des souches de *E.coli* intestinaux et extra-intestinaux aux principales familles d'antibiotiques en particulier amoxicilline, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, aminosides et ciprofloxacine sera étudiée par la méthode de l'antibiogramme et la détermination des CMI. Ces techniques sont réalisées quotidiennement au laboratoire. La prévalence de la résistance pour chacun de ces antibiotiques pourra être ainsi déterminée. La présence de BLSE sera caractérisée sur le plan moléculaire à l'aide d'une PCR multiplex (Dallenne et al. J Antimicrob Chemother 2010).

Les souches présentant des résistances particulières seront adressées au CNR de la résistance aux antibiotiques.

8.1.2 Infections à *Shigella*

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

La validation de l'utilisation du séquençage haut-débit dans le cadre d'investigations d'épidémies se fera progressivement.

- **Identifier et typer les souches**

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

8.1.3 Infections à *Salmonella*

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

Le CNR-ESS va poursuivre les différents travaux entrepris dans le développement de nouvelles méthodes de typage et de sous-typage. La méthode CRISPR appliquée déjà à 1215 souches appartenant à 210 sérotypes va être appliquée à d'autres sérotypes. L'application directe par la méthode à haut débit basée sur la technologie xMAP de Luminex est mise en place en routine pour le sérotype Typhimurium et variant monophasique au CNR-ESS ainsi qu'à l'ANSES-LERQAP. L'utilisation du séquençage à haut-débit (technologie MiSeq) va être initiée. Les bases de données concernant les séquences des gènes des flagellines et les séquençotypes (MLST) vont être progressivement complétées.

- **Suivre des tendances évolutives temporelles des différents sérotypes de *Salmonella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire**

Le réseau du CNR-ESS comprenait environ 35% des LBM de France métropolitaine en 2009. Plusieurs études réalisées au cours de ces dernières années ont montré sa stabilité. En 2008, l'arrêt de l'activité de sérotypage par le laboratoire Biomnis et la plupart des laboratoires regroupés et son transfert au CNR-ESS a permis d'obtenir une couverture géographique optimale, avec une couverture de plus 90% des LBM participants en 2013.

En décembre 2009, le CNR-ESS a changé de système d'exploitation des données de laboratoire passant du logiciel BactériCentre (1992, Patrick Grimont) vers Lagon (Epiconcept). Les bases de données BactériCentre 1992-2009 ont été transférées dans une base plus adaptée pour l'utilisation des algorithmes de détection des dépassements de seuil. Un nouveau logiciel est en cours de développement (site web « Voozanoo ») pour la déclaration en ligne des souches sérotypées localement (cela remplacera les fiches information). L'algorithme de détection des épidémies a été réécrit afin d'ajouter dans la surveillance les nouveaux sérotypes ou variants de *Salmonella*, l'analyse spécifique pour la classe d'âge < 1 an. Il est étendu aux données de sous-typage pour le sérotype Typhimurium et ses variants monophasiques (CRISPOL type).

En 2012, une étude d'évaluation des délais de notification du système de surveillance des salmonelloses humaines, France 2007-2011 a été menée (Jones et al. Euro Surveill 2014). Le CNR *Salmonella* se basera sur les éléments émis de cette étude pour raccourcir les délais de transport vers le CNR et le délai de sérotypage du CNR.

- **Suivre l'évolution de la résistance des *Salmonella* aux antibiotiques et étudier leurs mécanismes de résistance et leurs supports génétiques,**

Nous allons poursuivre l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques à l'aide de méthodes standardisées (antibiogrammes suivant le CA-SFM et l'EUCAST et si nécessaire CMI par la technique des E-tests) pour une collection d'environ 2000 souches de *Salmonella* sélectionnées selon le sérotype, le suivi de certains clones multi-résistants, selon l'origine de l'acquisition (métropolitaine ou extra-métropolitaine) et selon les besoins d'investigations.

La recherche et la compréhension de l'acquisition de certaines résistances sont privilégiées. Elles concernent les résistances aux antibiotiques clés dans le traitement des salmonelloses

sévères, à savoir la ciprofloxacine, les céphalosporines de 3^{ème} génération, les carbapénèmes et une alternative que représente l'azithromycine.

- **Détecter précocement les épisodes épidémiques, par la caractérisation des souches de *Salmonella* par la méthode de typage la plus adaptée au sérotype en cause et par le développement de seuils d'alerte,**

Le CNR-ESS continuera à utiliser en routine hebdomadaire le programme de détection basé sur les trois algorithmes et développé par l'InVS. Un algorithme similaire basé sur les CRISPOL-types est en cours de développement.

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

- **En transmettant à l'InVS, en temps réel, les résultats concernant les infections à EHEC, les foyers de cas groupés notifiés au CNR des EHEC, *Salmonella* ou *Shigella***

Le CNR-ESS et le Laboratoire associé continueront de transmettre quotidiennement à l'InVS par fax et par courrier tous les foyers de cas groupés à un même groupe de EHEC (épidémies familiales, hospitalières, scolaires, crèches, toxi-infections alimentaires collectives, infections collectives) signalées au CNR-ESS-LA par les laboratoires correspondants. Tous les phénomènes d'importance seront communiqués sans attendre par téléphone. Le CNR-ESS va poursuivre son envoi hebdomadaire à l'InVS des foyers de cas groupés notifiés par les laboratoires de son réseau ainsi que les différents relevés épidémiologiques habituels.

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

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

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

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

- **Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)**

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

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

Le LA-RD poursuivra une évaluation comparative de deux méthodes d'analyse globale du génome des souches EHEC : l'analyse par PFGE et la Rep-PCR.

- Sérotypage moléculaire

Le CNR-ESS réalisera le sérotypage moléculaire des *E. coli* non sérotypables par la méthode *rfb*-RFLP et le séquençage du gène de flagelline *fliC*. Si nécessaire une analyse MLST pourra être réalisée.

Le LA-RD réalisera le sérotypage par PCR multiplex, permettant de détecter les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les pathologies liées aux EHEC : O157, O26, O111, O55, O91, O103, O104.

- **Lors de la survenue d'une épidémie, en réalisant rapidement un typage le plus discriminant possible (adapté en fonction du sérotype en cause) afin de différencier les cas épidémiques et non épidémiques et de comparer des souches isolées chez les malades et dans d'autres sources en particulier alimentaire**

Le CNR-ESS-LA va poursuivre son expertise microbiologique lors d'investigations d'épidémies en collaboration avec l'InVS (pour le choix des souches épidémiques ou non épidémiques), l'ENV-Lyon (LNR) et l'ANSES- LERQAP Maisons-Alfort (pour analyser en parallèle les souches représentatives d'origine alimentaire). Il mettra en œuvre, le plus rapidement possible, la méthode la plus appropriée en fonction du sérotype en cause (MLST, MLVA, PFGE, CRISPR, autres techniques...) et utilisera pour valider la ou les méthodes, des souches épidémiques et non-épidémiques de sa collection de façon à déterminer si les souches étudiées sont reliées génétiquement.

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

Le réseau du CNR date des années 1950, c'est un réseau stable (environ 1400-1500 laboratoires participants), il possède une bonne couverture géographique et est relativement exhaustif. La dernière enquête CNR-AFSSAPS dans le cadre du contrôle national de qualité a montré que le CNR avait connaissance de 54% des isollements de *Shigella* et 66% des *Salmonella*. La mise en place du site web-Voozoo sera prochainement opérationnel et permettra de remplacer les fiches d'informations et raccourcira ainsi les délais d'information du CNR concernant l'isolement des souches de *Shigella* et *Salmonella*.

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

Une collaboration a été engagée et se poursuivra avec les réseaux nationaux en charge de la surveillance comme l'Ecole Vétérinaire de Lyon (Dr Thevenot et Dr Loukiadis) et de Maisons-Alfort ou pour des études ponctuelles sur les STEC, dans les aliments, chez l'animal et dans l'environnement avec échange et comparaison de souches.

Le CNR-ESS va poursuivre sa collaboration avec les réseaux de l'ANSES. Il s'engage également à instaurer des collaborations avec tout autre structure en rapport avec les *Salmonella* et *E.coli*.

- **En participant avec l'InVS au réseau européen ECDC-FWD (Tessy) de surveillance des *Salmonella* et des STEC (envoi trimestriel des données de surveillance, collaboration en cas d'alerte européenne, ...)**

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

- **En collaborant aux activités des réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen notamment dans le cadre de l'application de la directive**

Le CNR-ESS-LA va poursuivre sa collaboration avec les réseaux de surveillance internationaux, notamment en répondant aux collectes annuelles de données de ces structures. Il est aussi parfois sollicité pour un avis d'expert sur certaines « saisines » ou autres projets de révisions des normes européennes en lien avec la directive 2003/99/CE

Dans le cadre des infections à *E. coli* extra-intestinaux, la surveillance épidémiologique se fera grâce au réseau national de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques...).

Le Pr E. Bingen était coordinateur de l'Observatoire national des méningites bactériennes de l'enfant. Cet observatoire a été créé à l'initiative du Groupe de Pathologie Infectieuse pédiatrique (GPIP) de la Société Française de Pédiatrie (SFP) et de l'association clinique et thérapeutique infantile du Val de Marne (ACTIV). Cet observatoire comprend un réseau de 259 services de pédiatrie et 168 services de bactériologie répartis dans toute la France.

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

Parallèlement à la caractérisation clinique, la caractérisation génétique des souches de *E. coli* sera réalisée au sein du LA-RD.

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

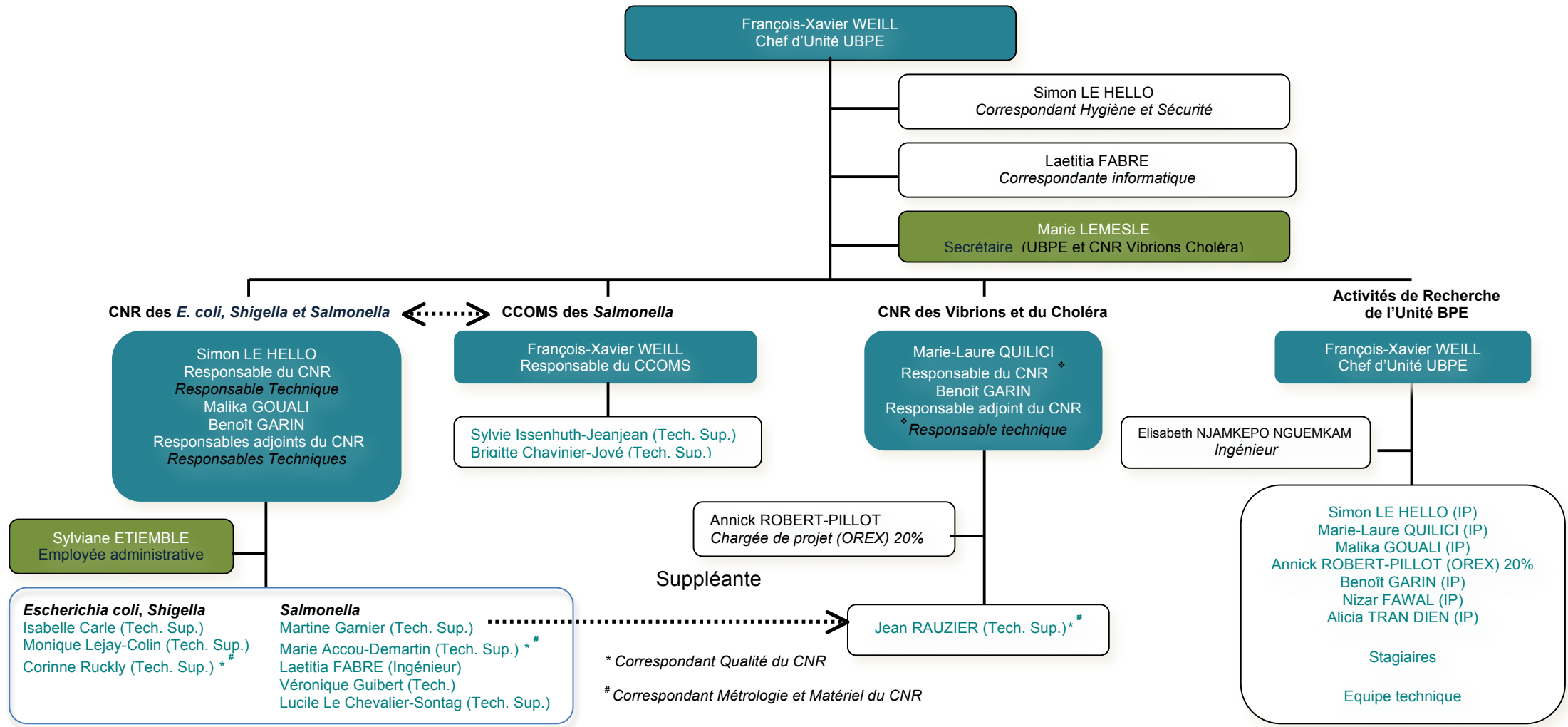
Grâce au réseau de l'Observatoire national des méningites, le LA-RD signalera à l'InVS, toute augmentation significative de cas liés à un clone ainsi que la survenue de formes cliniques particulières ou de souches inhabituelles.

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

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

Annexes

Organigramme de l'unité de recherche et d'expertise des Bactéries Pathogènes Entériques



ANNEXE 1

Annexe 1. Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

Les objectifs du Centre National de Référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS) sont de surveiller au niveau national et de caractériser les souches d'*E. coli*, *Shigella* et de *Salmonella* sur le plan moléculaire afin d'analyser leurs diversités génétiques et leurs facteurs de pathogénicité.

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

Pour les E. coli responsables d'infections digestives :

- contribuer au développement du diagnostic de routine des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et en particulier des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les laboratoires de diagnostic (CNR-ESS-LA),
- contribuer à la surveillance des infections à STEC (*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en confirmant l'infection à STEC par sérologie (CNR-ESS), et/ou mise en évidence de STEC dans les selles (CNR-ESS-LA),
- participer, en lien avec l'InVS, à l'investigation de cas groupés par typage des souches et comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources en collaboration avec les structures en charge de la surveillance ou d'études ponctuelles sur les STEC chez l'animal, dans les aliments et dans l'environnement telles que l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et l'ANSES,
- contribuer à des études de recherche appliquée (CNR-ESS-LA),
- contribuer avec l'InVS aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européen (Enter-Net) notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE (CNR-ESS-LA),
- contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, apparition de souches inhabituelles (CNR-ESS-LA).

Pour les E. coli responsables de méningites néonatales (LA-RD) :

- développer et mettre en œuvre des techniques de typage et de génotypage des souches permettant de les caractériser (typage, génotypage, empreinte de virulence) et de distinguer les souches responsables de cas groupés de celles qui sont responsables de cas sporadiques et l'affiliation des souches aux différents clones,
- développer en liaison avec l'InVS, un réseau de surveillance basé sur les laboratoires correspondants hospitaliers permettant de constituer une banque de souches isolées dans le LCR et de suivre l'évolution des caractéristiques de ces infections et leurs facteurs de risque (létalité, séquelles neurologiques, etc.),
- étudier et suivre la résistance des souches aux antibiotiques,
- apporter une expertise pour une aide au diagnostic des méningites décapitées par antibiothérapie,
- contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, cas groupés, formes cliniques ou souches inhabituelles, etc.

Pour les Shigella (CNR-ESS) :

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

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

Pour les Salmonella (CNR-ESS) :

- contribuer au développement des méthodes de typage.
- suivre les tendances évolutives temporelles des différents sérotypes de *Salmonella*, en s'appuyant sur un réseau de laboratoires d'analyse de biologie médicale sur tout le territoire.
- contribuer à la surveillance et à l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) les foyers de cas groupés notifiés au CNR-ESS.
- suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* et étudier les mécanismes de résistance notamment en collaboration avec le CNR des mécanismes de résistance aux antibiotiques.
- détecter précocement les épisodes épidémiques, par la caractérisation des souches de *Salmonella* par la méthode de typage la plus adaptée au sérotype en cause et par le développement de seuils d'alerte.
- développer la capacité, lors de la survenue d'une épidémie, de réaliser rapidement un typage le plus discriminant possible (adapté en fonction du sérotype en cause) des souches de *Salmonella* concernées afin de différencier les cas épidémiques et non épidémiques et de comparer des souches isolées chez les malades et dans d'autres sources, en particulier alimentaire.
- collaborer avec les réseaux nationaux de surveillance des salmonelles chez l'animal, dans les aliments et l'environnement.
- participer avec l'InVS au réseau européen des surveillance des *Salmonella* de l'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) : envoi trimestriel des données de surveillance, collaboration en cas d'alerte européenne, ...
- collaborer aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.
- contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS, tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, survenue de cas groupés, modification des profils de résistance, apparition de souches inhabituelles, ...

1.2 Les équipes

1.2.1 Le CNR-ESS : Effectif / Qualification du Personnel

- Effectif par catégories de fonctions

L'Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques (UBPE) a été créée en 2010 et a remplacé le laboratoire des Bactéries Pathogènes Entériques. Cette unité est dirigée par le Dr François-Xavier Weill et regroupe le CNR-ESS, le CNR des Vibrions et choléra et le Centre Collaborateur de l'OMS pour la Référence et la Recherche sur les *Salmonella*. Le personnel du CNR-ESS se répartissant de la façon suivante :

ETAT DES EMPLOIS DESTINES A L'ACTIVITE DU CNR

Noms et Prénoms	Poste	% Activité	Taux d'affectation %	ETP
François-Xavier WEILL (jusqu'au 30 août 2014)	Chef de Laboratoire	100	60	0,60
Malika GOUALI	Cadre confirmé A	100	90	0,90
Simon LE HELLO	Cadre confirmé B	100	90	0,90
Benoît GARIN (à partir du 1 ^{er} septembre)	Cadre confirmé B	100	60	0,60
Isabelle CARLE	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	1,00
Monique LEJAY-COLLIN	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	0,90
Corinne RUCKLY	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	1,00
Lucile LE CHEVALIER SONTAG	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	1,00
Chrystelle ROUX (jusqu'au 31 mai 2014)	Technicienne de laboratoire	100	50	0,50
Véronique GUIBERT	Technicienne de laboratoire qualifiée	100	100	1,00
Marie ACCOU-DEMARTIN	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	0,80
Laëtitia FABRE	Technicienne supérieure de laboratoire 1 ^{er} degré	100	100	1,00
Martine GARNIER	Technicienne supérieure de laboratoire 2 ^{ème} degré	100	100	1,00
TOTAL :				
Sylviane ETIEMBLE	Employée administrative	100	100	1,00
				1,00

Les responsables scientifiques

François-Xavier Weill

Docteur en médecine, DES de Biologie Médicale, Doctorat d'université de Microbiologie, ancien Interne et Assistant Hospitalier Universitaire (Bordeaux). Habilitation à diriger les recherches (Paris V).

Simon Le Hello

Docteur en pharmacie, DES de Biologie Médicale, DEA, ancien Interne de l'AP-HP.

Malika Gouali

Docteur en pharmacie, DEMS de Microbiologie, DESS en sécurité sanitaire des aliments.

Benoit Garin

Docteur en médecine, CES de Biologie Médicale. Habilitation à diriger les recherches (La Réunion).

Le personnel technique

*** Techniciens effectuant les analyses :**

- **Lucile Lechevalier-Sontag**, technicienne supérieure de laboratoire, licence en qualité. Expérience : 6 ans au CNR-ESS.
- **Laëtitia Fabre**, technicienne supérieure de laboratoire, Bachelor in Science (Kingston, RU), Master 2 de Microbiologie. Expérience : 13 ans au CNR-ESS.
- **Marie Accou-Demartin**, technicienne supérieure de laboratoire, Licence en Qualité (IP de Lille). Expérience : 13 ans au CNR-ESS.
- **Véronique Guibert**, technicienne de laboratoire qualifiée. Expérience : 19 ans au CNR-ESS.
- **Martine Garnier**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 11 ans au CNR des Borrelia. Expérience : 3 ans au CNR-ESS.
- **Corinne Ruckly**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 9 ans au CNR des méningocoques, 12 ans au CNR-ESS.
- **Monique Lejay-Collin**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 28 ans au CNR-ESS.
- **Isabelle Carle**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 27 ans au CNR-ESS.

*** Technicien du Centre Collaborateur OMS, décrivant les nouveaux sérotypes et développant de nouvelles techniques pour le CNR :**

- **Sylvie Issenhuth-Jeanjean**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 14 ans au CNR-ESS et au CCOMS.

*** Technicien du laboratoire de préparation réalisant les milieux spéciaux pour le CNR :**

- **Chrystelle Roux**, technicienne de laboratoire. Expérience : 30 ans.

*** Technicien du Centre Collaborateur OMS préparant les sérums et effectuant le sérotypage pour le CNR :**

- **Brigitte Chavinier-Jové**, technicienne supérieure de laboratoire. Expérience : 10 ans au CNR-ESS.

Le personnel administratif

- **Sylviane Etienne**, employée administrative du CNR-ESS, enregistrement des dossiers et archivage
- **Marie Lemesle**, BTS Assistante Secrétaire Trilingue, secrétaire de l'unité BPE. Expérience : 2 ans au CNR-ESS.

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

- Effectif par catégories de fonctions

Nom - Prénom	Libellé Emploi	ETP
M. BONACORSI Stéphane	PU-PH	0,2
Mme MARIANI-KURKDJIAN Patricia	PH	0,4
Melle LIGUORI Sandrine	ARC	1

1.3 Les locaux et équipements

1.3.1 CNR-ESS (Institut Pasteur)

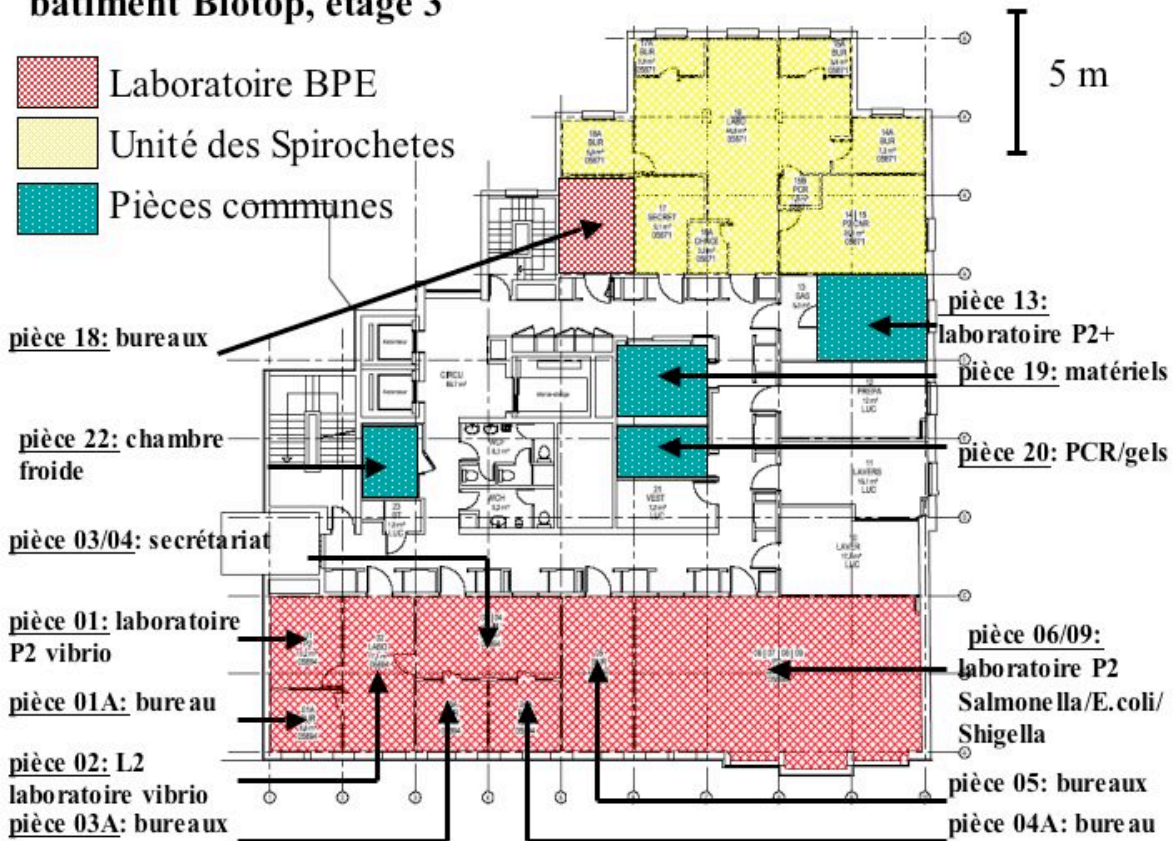
Le CNR-ESS, le CNR des Vibrions et du choléra, le CCOMS des *Salmonella* font partie de l'Unité d'Expertise et de Recherche des Bactéries Pathogènes Entériques dont les locaux se situent au 3^{ème} étage du bâtiment Biotop.

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

- Pièce bureaux : directeur du CNR (pièce 4a), 2 directeurs adjoints (pièce 3a), 2 secrétaires (pièce 03/04), 8 techniciennes (pièce 5) et 1 technicienne, 2 postes stagiaires partagés avec 1 technicien et 1 stagiaire du CNR Choléra (pièce 18) avec un ordinateur par personne.
- Laboratoire P2 avec PSM (pièce 06/09) de 72.8m² avec 12 paillasse dont 6 sont dédiées à l'activité *Salmonella* (5 techniciennes + 1 stagiaire), pour le sérotypage, la détermination de la résistance aux antibiotiques et les amplifications géniques (PCR). Les autres paillasse se répartissent en 4 pour l'activité *E. coli/Shigella* et 2 pour le CCOMS *Salmonella*,
- Trois petites pièces climatisées partagées avec l'unité postulante des Spirochètes et les 3 CNR de l'UBPE : une pièce de 7,7 m² avec les électrophorèses en agarose et thermocycleurs, une pièce 13,5 m² (P2+) où se trouvent les appareils à champ pulsé et une pièce de 11,6 m² où se trouvent les agitateurs Infors, l'appareil d'acquisition d'image de gels Geldoc, les 2 congélateurs à -80°C et l'ultracentrifugeuse.

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

bâtiment Biotop, étage 3



Au 4^{ème} étage : deux bureaux d'une superficie de 5 m² chacun donnant sur un laboratoire de 22,5 m²

Les deux bureaux numérotés 4A et 3A pouvant accueillir 2 personnes chacun sont occupés par une technicienne supérieure dédiée à l'activité de recherche et développement du CNR-ESS (4A), par la collaboratrice principale du CCOMS (3A) et par une ingénieure de recherche de l'Unité BPE (3A).

Le laboratoire déjà fonctionnel est consacré aux activités de recherche (techniques MLST, CRISPR, MLVA...) et est équipé du matériel suivant :

- 2 congélateurs à -20°C
- 2 réfrigérateurs à +4°C
- Un bain-marie sec
- Une étuve à 37°C
- Une centrifugeuse de paillasse

Au 1^{er} étage, l'Unité BPE a acquis des locaux qui seront partagés avec le CNR des Leptospires (Unité des Spirochètes). Ces locaux de 33 m² ont été aménagés pour un circuit de marche en avant pour réaliser de la PCR diagnostique.

La mise en place d'une marche en avant permettra d'envisager l'accréditation COFRAC de ces méthodes de diagnostic selon la norme NF EN ISO 15189 dans les meilleures conditions.

Ces laboratoires ont été équipés par les deux unités.

Matériel, équipement du CNR-ESS :

- Équipement habituel d'un laboratoire de bactériologie : enceintes climatiques (+4°C, 30°C, 37°C, réfrigérée de 4° à 30°C)
- Postes de sécurité microbiologique de type II (x 2)
- Matériel d'électrophorèse en agarose et d'hybridation, capture électronique d'images *
- Thermocycleurs (x 5)
- Appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad)
- Appareil d'électrophorèse en champ pulsé Bio-Rad DRIII (x2)
- Système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan (I2A) avec logiciel d'épidémiologie
- Équipement informatique : 6 ordinateurs Macintosh, 11 PC
- Congélateur à -80°C
- Laverie et autoclaves. *

*** Partagé avec les autres CNR de l'Unité et § de l'Unité des Spirochètes.**

Moyens extérieurs à la structure :

- Collaboration importante avec la Plateforme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique de l'Institut Pasteur (PF8) jusqu'à sa fermeture en juillet 2013 pour les différents projets de recherche impliquant du séquençage à haut débit (Illumina), séquençages des amplicons (MLST, PCR de caractérisation des gènes de résistances aux antibiotiques), électrophorèse capillaire, gene Mapper (MLVA), Luminex (CRISPOL).
- Structures transversales notamment (CIBU, Plate-forme génomique Puces à ADN, séquences, Coordination épidémiologique), mais aussi les structures disponibles sur le campus (animaleries, etc....) et nécessaires aux missions du CNR.
- Réseau informatique de l'Institut Pasteur et le Centre d'Information pour la Biologie.
- L'assistance d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé en routine au CNR depuis novembre 2009 pour enregistrer les analyses et éditer les résultats.

1.3.2 LA-RD

Le Laboratoire Associé est situé dans le Service de Microbiologie du CHU Robert Debré (APHP). Il comprend :

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

Matériels et Equipements de la structure actuelle :

Matériel appartenant au laboratoire :

- Poste de sécurité microbiologique de type II
- Étuve
- Microscope
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur à -20°C
- Maldi-TOF Brucker Microflex pour identification bactérienne

En commun :

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

Moyens extérieurs à la structure :

- Accès à la structure de recherche IAME (Université Paris Diderot- Unité INSERM 1137)
- Utilisation d'un prestataire de service (Génome Express) pour le séquençage d'ADN

1.4 Démarche qualité

Le CNR-ESS

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Pour des raisons de coûts mais également d'harmonisation du système de management de la qualité, la démarche d'accréditation des différents CNR est considérée comme une accréditation multi-sites. L'ensemble des CNR faisant partie de ce que l'on a appelé : Le laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Sites (LREMS)

L'accréditation des activités analytiques au sein des différents CNR se fera en trois vagues en tenant compte de l'état d'avancement de leur système de management de la qualité.

C'est ainsi qu'en 2014, des activités analytiques ont été accrédités au sein des CNR des Leptospires, de la Coqueluche et autres bordetelloses, Corynebactéries, Virus Influenzae et la Rage. Le LREMS est accrédité par le COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 pour une partie de ses activités analytiques depuis le 21 mars 2014.

Le CNR-ESS fait partie de la 3^{ème} vague des CNR et sera audité par le COFRAC en novembre-décembre 2015.

Le LA-RD

En raison de l'obligation faite aux laboratoires de biologie de respecter la norme NF EN ISO 15189 (ordonnance du 13 janvier 2010), le service de Microbiologie ainsi que le Pôle de Biologie du CHU Robert Debré sont entrés dans la démarche d'accréditation en 2013. Des procédures spécifiques à l'activité du laboratoire associé ont été rédigées : procédures générales, procédures pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

La visite d'accréditation a eu lieu le 31 mars et le 1^{er} avril 2014. Le service de Microbiologie et l'ensemble du Pôle de Biologie ont été accrédités (Accréditation n°8-3318). Aucun écart critique n'a été relevé au cours de cette évaluation, seuls des axes d'amélioration ont été définis.

ANNEXE 2

Annexe 2. Capacités techniques du CNR

2.1 Pour *Salmonella*

2.1.1 Liste des techniques de référence

* Des techniques d'identification du genre, des espèces et des sous-espèces de *Salmonella*

Bactériologie classique

- **Culture sur différents milieux** (Drigalski, TSA, BCP, XLT4, Hektoen, Kligler–Hajna, Mannitol-Mobilité).

- **Tests biochimiques** réalisés en macro-galerie :

- Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose, du Mucate, du Citrate de Christensen, de l'Acétate de Trabulsi et du Glycérol. Production de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H₂S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (Indole), bêta-galactosidase (ONPG) et bêta-glucuronidase. Culture sur Citrate de Simmons. Lyse par le phage 01. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

Autres méthodes de différenciation d'espèces et de sous-espèces utilisables si besoin

- **Séquençage du gène *rrs*** (codant pour l'ARN 16S) ou du **gène *rpoB*** (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches au genre *Salmonella* (*rrs*) et aux différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* (*rpoB*) grâce à la comparaison des séquences obtenues à celles contenues dans la base de données de l'UBPE.

* Des techniques d'identification des sérotypes

- Le **sérotypage classique par agglutination**. Il nécessite l'emploi d'environ 200 antisérums (polyvalents et monovalents) polyclonaux absorbés, préparés chez le lapin. Le 1/3 des sérums est d'origine commerciale (principalement BioRad), le reste est préparé dans l'UBPE. Le sérotypage classique par agglutination reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2500 sérotypes.

- Le **sérotypage moléculaire** d'une souche de *Salmonella*. Trois techniques permettent de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique :

- **L'analyse MLST** (Multilocus sequence typing). Cette méthode est basée sur l'analyse de la séquence de 7 gènes conservés (dits gènes de ménage) après amplification génique. Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman *et al*, PloS Pathogens 2012).

- **Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB*.** Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*.

- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 7100 spacers différents ont été décrits par cette méthode ; ils sont accessibles sur le site web dédié (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>). Cette méthode originale a été mise au point au CNR-ESS (Fabre L *et al*, PloS One 2012).

*** Des techniques de sous-typage des *Salmonella* :**

- **L' électrophorèse en champ pulsé** (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée et de référence PulseNet, accessible à <http://www.cdc.gov/pulsenet/>).

- **L' analyse MLVA** (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour les sérotypes Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011). Des schémas MLVA pour les sérotypes Enteritidis, Derby, Dublin, Typhi, Paratyphi A et Newport existent et sont en cours de validation et/ou harmonisation.

- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques **basée sur** le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein par le CNR-ESS en 2009, repose sur la détection de 68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes (68 spacers et 4 variants de spacers) fixées sur des microbilles grâce à la **technologie xMAP de Luminex®**.

De façon plus spécifique, le CNR-ESS dispose des techniques pour :

- **Le profil d'hybridation à l'aide d'une sonde IS200** pour le sérotype Paratyphi B,

- **La recherche par PCR de la présence de prophages** pour le sérotype Typhimurium,

*** Des techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella***

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

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

2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Le sérotypage est la méthode de référence du typage des *Salmonella*. Il permet de différencier 2579 sérotypes (FX Weill et PAD Grimont « formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* » 9^{ème} édition, 2007). Un sérotypage complet est réalisé systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR-ESS. Pour les sérotypes les plus fréquents (trois sérotypes, Typhimurium et son variant monophasique, et Enteritidis représentent près de 70% des *Salmonella* isolées chez l'homme en France depuis 2011), une ou plusieurs techniques de sous-typage pré-citées et adaptées au sérotype en cause seront réalisées lors des investigations de cas groupés pour apprécier la clonalité des souches et leur lien avec une souche non

humaine de *Salmonella*. Parfois le profil de résistance aux antibiotiques peut être un marqueur épidémiologique utile.

2.1.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Toutes les souches adressées au CNR-ESS depuis 1947 ont été conservées en tubes gélosés gardés à température ambiante. La collection du CNR-ESS comprend plus de 300.000 souches. L'ensemble de tous les sérotypes connus de *Salmonella* est conservé sous forme lyophilisée au Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur les *Salmonella* (CCOMS). Certaines souches possédant des résistances particulières aux antibiotiques sont conservées à -80°C. Les informations relatives aux souches sont disponibles sur des cahiers et sur des fichiers informatiques. La mise à disposition de ces souches se fait avec l'accord du ou des responsables du CNR-ESS sous forme de contrat MTA (Material Transfert Agreement).

2.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR

Le **sérotypage** des souches doit être réalisé conformément au schéma de White-Kauffmann-Le Minor (WKL) (9^{ème} édition 2007), maintenu par le CCOMS (dirigé par les responsables du CNR-ESS). La demande d'un schéma WKL en format pdf se faisant en écrivant à l'adresse whosalm@pasteur.fr (prière de mentionner les coordonnées professionnelles) ou téléchargeable en version anglaise ou française à l'adresse www.pasteur.fr/ccoms/salmonella.

Le sous-typage par **électrophorèse en champ pulsé** doit être réalisé à l'aide d'un protocole standardisé sur le plan international (protocole PulseNet disponible à <http://www.cdc.gov/pulsenet/>). Des renseignements techniques sont disponibles auprès des responsables du CNR-ESS.

- **L'analyse MLVA** pour le sérotype Typhimurium est standardisée et harmonisée depuis 2011. Le CNR-ESS aide à la mise en place et à l'harmonisation de cette technique pour les laboratoires français.

- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques est utilisée en routine au CNR-ESS (Institut Pasteur, Paris) et au Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES, Maisons-Alfort).

2.2 Pour *Escherichia coli*

2.2.1 Liste des techniques de référence

2.2.1.1 au CNR-ESS

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

Bactériologie classique

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

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose et du Glycérol. Production d'o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG), de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H₂S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (indole) et bêta-glucuronidase. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisées en routine

- La recherche par **PCR du gène *iudA*, codant pour la bêta-glucuronidase**, la présence de ce gène permet de valider l'identification *E. coli* –*Shigella*.

- **La détection par PCR des gènes codant pour l'invasivité (*ial* et *ipaH*)** pour différencier une souche déficiente de *E. coli* d'une *Shigella*. Ces gènes sont aussi présents chez les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), mais ces derniers sont plus rares.

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisables si besoin

- **Le séquençage du gène *rpoB*** (codant pour la sous unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches aux genres *E. coli-Shigella* ou de les classer avec les autres entérobactéries correspondantes grâce à la comparaison aux bases de données de l'Unité BPE.

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

Le sérotypage classique

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

Le sérotypage moléculaire

L'agglutination des souches de *E. coli* est la technique de base, mais cette méthode immunologique est très souvent mise en défaut pour *E. coli* en raison d'un nombre de sérotypes très élevé (plus de 170 antigènes O et 50 antigènes H connus) et le schéma

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

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

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

c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR

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

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

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

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

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

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

*d. Techniques de sous-typage des *E. coli**

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

e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des E. coli

- L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et détermination de la CMI à tous les antibiotiques par la méthode E-test (BioMérieux),
- L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support).

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

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

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

2.2.1.2 Techniques du LA-RD

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

a. Diagnostic/identification

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

b. Typage

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

c. Sensibilité aux anti-infectieux

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

2.2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

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

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

2.2.3 Collection de souches

Au CNR-ECS, toutes les souches de *E. coli* et *Shigella* ont été conservées au laboratoire, sur milieu gélosé sans glucose, depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs dizaines de milliers de souches conservées avec leurs informations microbiologiques et cliniques (si disponible). Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances aux antibiotiques. Les souches importantes sont en plus conservées à -80°C , parmi ces souches, on trouve :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *E. coli*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines,

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

Au LA-RD à l'hôpital Robert Debré, les souches sont conservées à -80°C dans une pièce dédiée. Plusieurs collections de souches humaines sont ainsi disponibles depuis 1987 :

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

2.2.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS-LA

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

Un autre article de référence est paru en janvier 2013 rédigé par le CNR-ESS (Gouali M et Weill FX) : Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. Jan 2013, Volume 42, N°1. 68-75). Cet article a l'avantage de rappeler les caractéristiques, la pathogénie, l'épidémiologie et les méthodes de diagnostic des infections à EHEC.

2.3 Pour *Shigella*

2.3.1 Liste des techniques de référence

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

Bactériologie classique

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

- Tests biochimiques réalisés en macro-galerie :

Fermentation du Lactose, du Mannitol, du Dulcitol, du Rhamnose, du Xylose et du Glycérol. Production d'o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG), de Gaz/Glucose, de Gaz/Mannitol, de sulfure d'hydrogène (H₂S), et de la tétrathionate réductase (TTR). Activité Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), tryptophanase (indole) et bêta-glucuronidase. Possibilité de réalisation de micro-galerie (API 20E, BioMérieux).

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisées en routine

- La recherche par **PCR du gène *iudA*, codant pour la bêta-glucuronidase**, la présence de ce gène permet de valider l'identification *E. coli* –*Shigella*.

- **La détection par PCR des gènes codant pour l'invasivité (*ial* et *ipaH*)** pour différencier une souche déficiente de *E. coli* d'une *Shigella*. Ces gènes sont aussi présents chez les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), mais ces derniers sont plus rares.

Autres méthodes de différenciation d'espèces utilisables si besoin

- **Le séquençage du gène *rpoB*** (codant pour la sous unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches aux genres *E. coli*-*Shigella* ou de les classer avec les autres entérobactéries correspondantes grâce à la comparaison aux bases de données de l'Unité BPE.

b. Techniques d'identification de Shigella

Le sérotypage classique

*** *Shigella***

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

Le sérotypage moléculaire

Celui-ci est utile quand les souches ne sont pas sérotypables (nouveaux sérotypes en l'absence d'antisérums spécifiques ou quand les souches sont autoagglutinables [rough]).

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

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

c. Détection des gènes de pathogénicité par PCR des Shigella

- Les gènes *ipah* et *ial*
- Le gène *stx* chez *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga-toxine 1).

d. Techniques de sous-typage des Shigella

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

e. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des Shigella

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

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

2.3.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Dans le cas de *Shigella*, le sérotypage est lui aussi essentiel pour vérifier que c'est bien le même sérotype et le PFGE peut aussi être utilisé pour vérifier la clonalité des souches mais la diversité est moins grande que celle observée chez *E. coli*. Il peut être très intéressant dans certains cas de se baser aussi sur le profil de sensibilité aux antibiotiques.

Toutes les techniques décrites précédemment peuvent être utilisées en association comme marqueurs épidémiologiques.

2.3.3 Collection de souches

Au CNR-ESS, toutes les souches de *Shigella* ont été conservées au laboratoire, sur milieu gélosé sans glucose, depuis plus de 30 ans, ce qui représente plusieurs dizaines de milliers de souches conservées avec leurs informations microbiologiques et cliniques (si disponible). Ceci permet des études rétrospectives sur l'évolution des types ou des résistances aux antibiotiques. Les souches importantes sont en plus conservées à -80°C , parmi ces souches, on trouve :

- les souches de référence pour les gènes de pathogénicité de *Shigella*.
- les souches de référence des différents sérotypes O et H pour le typage moléculaire.
- toutes les souches du CNR possédant des gènes de pathogénicité, particulièrement les Shiga-toxines.
- les souches de *S. dysenteriae* de type 1.
- les souches de *Shigella* présentant une résistance particulière aux antibiotiques.

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

2.3.4 Techniques recommandées par le CNR-ESS

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

2.4 Sélection de 10 publications représentatives de l'année 2014

Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical *Salmonella enterica* isolates in Dakar, Senegal, from 1999 to 2009

D. Harrois^{1,2,*}, S. Breurec^{2,3,*}, A. Seck², A. Delauné¹, S. Le Hello¹, M. Pardos de la Gándara¹, L. Sontag¹, J.-D. Perrier-Gros-Claude², J.-M. Sire², B. Garin^{2,4} and F.-X. Weill¹

1) Institut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Paris, France, 2) Institut Pasteur de Dakar, Unité de Bactériologie Médicale et Environnementale, Dakar, Senegal, 3) Institut Pasteur de Bangui, Laboratoire de Biologie Médicale, Bangui, République Centrafricaine and 4) Institut Pasteur de Madagascar, Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Antananarivo, Madagascar

Abstract

A total of 1623 clinical isolates of *Salmonella* belonging to 229 serotypes were received by the Senegalese Reference Center for Enterobacteria from January 1999 to December 2009. The most common serotypes were Enteritidis (19% of the isolates), Typhi (8%), Typhimurium (7%) and Kentucky (4%). A significant increase in the prevalence of resistance to amoxicillin (0.9% in 1999 to 11.1% in 2009) and nalidixic acid (0.9% in 1999 to 26.7% in 2009) was observed in non-typhoidal *Salmonella* serotypes. For critically important antibiotics, notably ciprofloxacin and extended-spectrum cephalosporins (ESCs), the rates of resistance were low: 0.3% and 0.5%, respectively. Seven ESC-resistant *Salmonella* strains and three additional ESC-resistant strains from Senegal (1990) and Mali (2007) were studied to identify the genetic basis of their antibiotic resistance. All ESC-resistant strains produced an extended-spectrum β -lactamase (ESBL). These were CTX-M-15 ($n = 6$; 2000–2008), SHV-12 ($n = 3$; 2000–2001) and SHV-2 ($n = 1$; 1990). A large IncHI2 ST1 pK29-like plasmid was found in six strains (three producing SHV-12 and three CTX-M-15), whereas IncN and IncF plasmids were found in three strains and one strain, respectively. The association of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnrB1* and *aac(6)-Ib-cr* was found in four ESBL-producing strains, leading to decreased susceptibility and even full resistance to ciprofloxacin (MIC range 0.75–2 mg/L) despite the absence of mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*. This association of ESBL and multiple PMQR mechanisms within the same strains is therefore a serious concern as it hampers the use of both ESCs and fluoroquinolones for severe *Salmonella* infections.

Keywords: AAC(6)-Ib-cr, antimicrobial resistance, CTX-M, extended-spectrum β -lactamase, IncHI2 plasmid, IncN plasmid, Qnr, *Salmonella enterica*, Senegal, SHV

Original Submission: 5 February 2013; **Revised Submission:** 3 July 2013; **Accepted:** 14 July 2013

Editor: R. Cantón

Article published online: 18 July 2013

Clin Microbiol Infect 2014; **20**: 0109–0116

10.1111/1469-0691.12339

Corresponding author: F.-X. Weill, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

E-mail: francois-xavier.weill@pasteur.fr

*These authors contributed equally.

Introduction

Human *Salmonella* infections are generally either typhoid fever, a systemic disease caused by *S. enterica* serotypes

Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B (non-*d*-tartrate-fermenting variant) and Paratyphi C, or gastroenteritis caused by a large number of non-typhoidal *Salmonella* (NTS) serotypes. Typhoidal serotypes are human-restricted whereas NTS have large animal reservoirs. Although most salmonellosis due to NTS is self-limiting, serious complications, including systemic infection and death, can occur. Such infections have consistently been reported as a leading cause of bacteraemia in Africa and are associated with a high risk of death [1]. As rates of resistance to all classes of antibiotics have increased throughout the world, conventional antibiotics such as ampicillin, chloramphenicol and cotrimoxazole are no longer

Transient Darwinian selection in *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A during 450 years of global spread of enteric fever

Zhemín Zhóu^{a,b,1}, Ángela McCann^b, François-Xavier Weill^c, Camille Blin^{b,2}, Satheesh Nair^d, John Wain^{d,e,3}, Gordon Dougan^e, and Mark Achtman^{a,b,1}

^aWarwick Medical School, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, United Kingdom; ^bEnvironmental Research Institute and Department of Microbiology, University College Cork, Cork, Ireland; ^cInstitut Pasteur, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, 75724 Paris, France; ^dSalmonella Reference Service, Public Health England, Colindale, London NW9 5EQ, United Kingdom; and ^eWellcome Trust Genome Campus, The Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge CB10 1SA, United Kingdom

Edited by Roy Curtiss III, Arizona State University, Tempe, AZ, and approved July 14, 2014 (received for review June 12, 2014)

Multiple epidemic diseases have been designated as emerging or reemerging because the numbers of clinical cases have increased. Emerging diseases are often suspected to be driven by increased virulence or fitness, possibly associated with the gain of novel genes or mutations. However, the time period over which humans have been afflicted by such diseases is only known for very few bacterial pathogens, and the evidence for recently increased virulence or fitness is scanty. Has Darwinian (diversifying) selection at the genomic level recently driven microevolution within bacterial pathogens of humans? *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A is a major cause of enteric fever, with a microbiological history dating to 1898. We identified seven modern lineages among 149 genomes on the basis of 4,584 SNPs in the core genome and estimated that Paratyphi A originated 450 y ago. During that time period, the effective population size has undergone expansion, reduction, and recent expansion. Mutations, some of which inactivate genes, have occurred continuously over the history of Paratyphi A, as has the gain or loss of accessory genes. We also identified 273 mutations that were under Darwinian selection. However, most genetic changes are transient, continuously being removed by purifying selection, and the genome of Paratyphi A has not changed dramatically over centuries. We conclude that Darwinian selection is not responsible for increased frequency of enteric fever and suggest that environmental changes may be more important for the frequency of disease.

pathogen evolution | historical reconstruction | phylogeography

The most recent common ancestors (MRCA) of some bacterial pathogens such as *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* existed nearly 100,000 ya (1, 2), setting a lower limit for how long they have infected humans. Other MRCAs are much younger, ranging from ~3,000 y for *Yersinia pestis* and *Mycobacterium leprae* (3, 4) to only decades for individual clones of *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella sonnei* (5–7). However, the ages of most bacterial pathogens remain unknown. Here, we use genomic analyses of 149 isolates of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A to address the age and microevolutionary history of one of the major causes of enteric fever.

Enteric fever is a generic epidemiological designation for clinically similar syndromes of prolonged, systemic human salmonellosis that are called typhoid fever when caused by serovar Typhi, and paratyphoid fever when caused by serovars Paratyphi A, B, or C. Each of these serovars corresponds to a distinct, human-specific, genetically monomorphic bacterial population according to multilocus sequence typing (8). However, these four populations are not related to each other at the genetic level, nor do we know which convergent genetic features are responsible for causing similar disease syndromes.

The annual global burden of enteric fever has been estimated as 27 million cases of clinical disease and 200,000 deaths (9), almost all of which are caused by Typhi or Paratyphi A. It is not possible to reconstruct what the disease burden of enteric fever

was in the past because of insufficiently discriminatory historical descriptions of clinical syndromes. Until the mid-19th century, enteric fever was not even reliably distinguished from typhus (10), which is caused by *Rickettsia*, and the distinction between serovars Typhi and Paratyphi A was first achieved in 1898 (11). At that time, Paratyphi A was relatively common in North America (12). Today, Paratyphi A accounts for a sizable fraction (14–64%) of all enteric fever in India, Pakistan, Nepal, Indonesia, and China (13–16), but has largely disappeared from Europe and North America, except for travelers returning from South and Southeast Asia (17, 18). Otherwise, little is known about its historical patterns of spread or its evolutionary history.

Phylogeographic reconstructions of genetically monomorphic pathogens can be achieved by comparative genomics (3, 4, 6, 19). However, only two complete Paratyphi A genomes (20, 21) and five draft genomes (16) have been described. Comparisons of the

Significance

The most recent common ancestor of Paratyphi A, one of the most common causes of enteric fever, existed approximately 450 y ago, centuries before that disease was clinically recognized. Subsequent changes in the genomic sequences included multiple mutations and acquisitions or losses of genes, including bacteriophages and genomic islands. Some of those evolutionary changes were reliably attributed to Darwinian selection, but that selection was only transient, and many genetic changes were subsequently lost because they rendered the bacteria less fit (purifying selection). We interpret the history of Paratyphi A as reflecting drift rather than progressive evolution and suggest that most recent increases in frequencies of bacterial diseases are due to environmental changes rather than the novel evolution of pathogenic bacteria.

Author contributions: Z.Z., A.M., F.-X.W., J.W., and M.A. designed research; Z.Z., A.M., C.B., S.N., and G.D. performed research; Z.Z., F.-X.W., S.N., and J.W. contributed new reagents/analytic tools; Z.Z., A.M., F.-X.W., C.B., S.N., and M.A. analyzed data; and Z.Z., F.-X.W., S.N., and M.A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: The sequence data have been deposited with the European Nucleotide Archive, www.ebi.ac.uk/ena (accession nos. ERR028897–ERR028999, ERR030042–ERR030144, ERR033909–ERR034063, ERR134160–ERR134255, and ERR237537–ERR237542); individual genome assemblies have been deposited under accession nos. PRJEB5545–PRJEB5690). The accession numbers for each strain are listed in Dataset S1, tab 9.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: zhemin.zhou@warwick.ac.uk or m.achtman@warwick.ac.uk.

²Present address: Microbial Evolutionary Genomics, Institut Pasteur, 75724 Paris, France.

³Present address: Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, United Kingdom.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1411012111/-DCSupplemental.

CRISPR Is an Optimal Target for the Design of Specific PCR Assays for *Salmonella enterica* Serotypes Typhi and Paratyphi A

Laetitia Fabre, Simon Le Hello, Chrystelle Roux, Sylvie Issenhuth-Jeanjean, François-Xavier Weill*

Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, WHO Collaborative Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France

Abstract

Background: Serotype-specific PCR assays targeting *Salmonella enterica* serotypes Typhi and Paratyphi A, the causal agents of typhoid and paratyphoid fevers, are required to accelerate formal diagnosis and to overcome the lack of typing sera and, in some situations, the need for culture. However, the sensitivity and specificity of such assays must be demonstrated on large collections of strains representative of the targeted serotypes and all other bacterial populations producing similar clinical symptoms.

Methodology: Using a new family of repeated DNA sequences, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), as a serotype-specific target, we developed a conventional multiplex PCR assay for the detection and differentiation of serotypes Typhi and Paratyphi A from cultured isolates. We also developed EvaGreen-based real-time singleplex PCR assays with the same two sets of primers.

Principal findings: We achieved 100% sensitivity and specificity for each protocol after validation of the assays on 188 serotype Typhi and 74 serotype Paratyphi A strains from diverse genetic groups, geographic origins and time periods and on 70 strains of bacteria frequently encountered in bloodstream infections, including 29 other *Salmonella* serotypes and 42 strains from 38 other bacterial species.

Conclusions: The performance and convenience of our serotype-specific PCR assays should facilitate the rapid and accurate identification of these two major serotypes in a large range of clinical and public health laboratories with access to PCR technology. These assays were developed for use with DNA from cultured isolates, but with modifications to the assay, the CRISPR targets could be used in the development of assays for use with clinical and other samples.

Citation: Fabre L, Le Hello S, Roux C, Issenhuth-Jeanjean S, Weill F-X (2014) CRISPR Is an Optimal Target for the Design of Specific PCR Assays for *Salmonella enterica* Serotypes Typhi and Paratyphi A. PLoS Negl Trop Dis 8(1): e2671. doi:10.1371/journal.pntd.0002671

Editor: Edward T. Ryan, Massachusetts General Hospital, United States of America

Received: September 10, 2013; **Accepted:** December 13, 2013; **Published:** January 30, 2014

Copyright: © 2014 Fabre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut Pasteur, the Institut de Veille Sanitaire and by the French Government "Investissement d'Avenir" programme (Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" Laboratory of Excellence, grant no. ANR-10-LABX-62-IBEID). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois-xavier.weill@pasteur.fr

Introduction

Typhoid and paratyphoid fevers remain a major health problem in the developing world, particularly in South East Asia and Africa, with estimates of more than 20 million illnesses and over 200,000 deaths due to typhoid fever and more than 5 million illnesses due to paratyphoid fever in 2000 [1]. The causal agents of these diseases, *Salmonella enterica* serotypes Typhi and Paratyphi A, respectively, must be identified early and accurately, to ensure appropriate antimicrobial therapy for the individual concerned, particularly in endemic areas in which the main differential diagnosis is malaria. Correct identification is also fundamental for prevalence and monitoring studies of typhoid and paratyphoid fevers, for the implementation, strengthening and evaluation of health policies (vaccination campaigns, sanitation, water supply treatment, empirical antimicrobial therapy). In high-income countries, in which typhoid fever mostly affects travelers, laboratory confirmation is

based on culture, mostly semi-automated blood culture, and further serotyping and antimicrobial drug susceptibility testing of the bacterial isolates. The cost of typing sera and the generalization of accreditation for private laboratories have resulted in the restriction of serotyping to public health laboratories or national reference centers, delaying diagnosis by several days. Furthermore, some isolates of serotypes Typhi and Paratyphi A may not be serotypable due to rough phenotypes (autoagglutination due to the complete or partial loss of lipopolysaccharide) and non motility, and some isolates of serotype Typhi may be classified as not serotypable if overexpression of the Vi polysaccharide masks the O antigens and the Vi antigen is not destroyed by heating before O agglutination. In the regions in which these diseases are endemic, both culture and serotyping are considered expensive and are rarely used. Thus, despite their low sensitivity and/or specificity, serological tests, such as the Widal test, are the predominant method for typhoid diagnosis in these regions [2].

Invasive *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infections, Democratic Republic of the Congo, 2007–2011

Benedikt Ley, Simon Le Hello, Octavie Lunguya, Veerle Lejon, Jean-Jacques Muyembe, François-Xavier Weill, and Jan Jacobs

Infection with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium sequence type (ST) 313 is associated with high rates of drug resistance, bloodstream infections, and death. To determine whether ST313 is dominant in the Democratic Republic of the Congo, we studied 180 isolates collected during 2007–2011; 96% belonged to CRISPOL type CT28, which is associated with ST313.

Salmonella enterica serotype Typhimurium multilocus sequence type (ST) 313 has been reported as an emerging cause of invasive salmonellosis in sub-Saharan Africa (1). ST313 is almost exclusively from sub-Saharan Africa, is characterized by a degraded genome capacity similar to that of *S. enterica* ser. Typhi, has high rates of antimicrobial drug resistance, and is associated with bloodstream infections and mortality rates >25% (2). Whole-genome sequence analysis of 129 ST313 strains, isolated during 1988–2010 from 7 countries of sub-Saharan Africa, identified 2 dominant genetic lineages, I and II. These lineages emerged ~52 and ~32 years ago, respectively, possibly co-evolving with the spread of HIV (3). Although lineage I has not been observed since the mid-2000s, lineage II has been observed with increasing frequency. However, data from Central Africa, particularly the Democratic Republic of the Congo (DRC) are scarce, and information is limited to 10 genomes from strains isolated >20 years ago (3). To

determine whether ST313 is the dominant ST among invasive *Salmonella* Typhimurium in the DRC, we studied 180 isolates collected during 2007–2011.

The Study

We earlier described a series of invasive non-Typhi *Salmonella* isolates from blood cultures collected in 7 of the 11 provinces in the DRC during 2007–2011 (Figure 1) (4). In that study, a health care facility–based survey was administered to persons who met the eligibility criteria of suspected bacteremia at time of presentation and patient age >2 months. Blood culture vials were shipped to Kinshasa and processed according to standard identification procedures (4). A total of 233 non-Typhi *Salmonella* isolates were recovered, 184 (79%) of which belonged to serotype Typhimurium (4). The serotypes for all *S. enterica* ser. Typhimurium isolates were determined locally and later confirmed at the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium. Most (180/184, 98.7%) *S. enterica* ser. Typhimurium isolates were subsequently shipped to the Pasteur Institute, Paris, France, for further analysis.

The population structure of these 180 *S. enterica* ser. Typhimurium isolates was assessed by CRISPOL typing. CRISPOL is a recently developed high-throughput assay based on clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) polymorphisms (5). This bead-based hybridization assay is designed to detect the presence or absence of 72 short variable DNA sequences (spacers) from both CRISPR loci of *S. enterica* ser. Typhimurium. Initially, 245 different CRISPOL types (CTs) were identified in a 2012 study that included 2,200 isolates (5); just before we conducted the study reported here, the CRISPOL *Salmonella* Typhimurium database of the Pasteur Institute contained >7,000 strains comprising >750 different CTs.

A total of 174 (96.7%) *S. enterica* ser. Typhimurium isolates from the DRC belonged to the CT28 group, of which 163 (90.5%) were CT28. A total of 11 (6.1%) isolates belonged to 7 other CTs that were single-spacer variants (loss of a single spacer), single-event variants (loss of ≥2 contiguous spacers), or double-event variants of CT28 (Figure 2). Six (3.3%) isolates belonged to 2 CTs not related to CT28. CT28 had been associated with ST313 in a multidrug-resistant DT56 *S. enterica* ser. Typhimurium isolate from Senegal and in the D23580 ST313 lineage II genome (5). In contrast, the analysis of raw pyrosequence data for genome A130 (3), representative of ST313 lineage I, corresponded to CT698, distinct from the CT28 group.

To confirm the association of ST313 to the CT28 group, we performed multilocus sequence typing (MLST) (6) on 12 isolates. A total of 3 isolates belonged to CT28, and 1 isolate of each single-spacer, single-event, and double-event variant was tested, resulting in 10 isolates from the CT28 group. We also performed MLST on 1 isolate of

Author affiliations: Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium (B. Ley, J. Jacobs); Institut Pasteur, Paris, France (S. Le Hello, F.-X. Weill); Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo (O. Lunguya, J.-J. Muyembe); and Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France (V. Lejon)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.131488>

Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011

L. A. King¹, E. Loukiadis^{2,3}, P. Mariani-Kurkdjian⁴, S. Haeghebaert¹, F.-X. Weill⁵, C. Balier⁴, S. Ganet^{2,3}, M. Gouali⁵, V. Vaillant¹, N. Pihier⁶, H. Callon⁶, R. Novo⁷, O. Gaillot⁸, D. Thevenot-Sergentet^{2,3}, E. Bingen^{4,†}, P. Chaud¹ and H. de Valk¹

1) Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice and Lille, 2) Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes/Laboratoire National de Référence pour les *Escherichia coli* y Compris les *E. coli* Producteurs de Shiga-toxines, Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, 3) UMR 5557 Ecologie Microbienne, CNRS, VetAgro Sup, Equipe « Bactéries Pathogènes et Opportunistes », Université de Lyon, Villeurbanne, 4) Centre National de Référence Associé des *Escherichia coli*, AP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, Paris, 5) Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, 6) Mission des Urgences Sanitaires, Direction Générale de l'alimentation, Paris, 7) Service de Néphrologie Pédiatrique, CHRU Lille, Lille, and 8) Laboratoire de Bactériologie, CHRU Lille, Lille, France

Abstract

Sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] is a particularly virulent clone of *E. coli* O157:H7 associated with a higher incidence of haemolytic uraemic syndrome and a higher case fatality rate. Many fundamental aspects of its epidemiology remain to be elucidated, including its reservoir and transmission routes and vehicles. We describe an outbreak of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:[H7] that occurred in France in 2011. Eighteen cases of paediatric haemolytic uraemic syndrome with symptom onset between 6 June and 15 July 2011 were identified among children aged 6 months to 10 years residing in northern France. A strain of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:[H7] *stx2a eae* was isolated from ten cases. Epidemiological, microbiological and trace-back investigations identified multiply-contaminated frozen ground beef products bought in a supermarket chain as the outbreak vehicle. Strains with three distinct pulsotypes that were isolated from patients, ground beef preparations recovered from patients' freezers and from stored production samples taken at the production plant were indistinguishable upon molecular comparison. This investigation documents microbiologically confirmed foodborne transmission of sorbitol-fermenting of *E. coli* O157 via beef and could additionally provide evidence of a reservoir in cattle for this pathogen.

Keywords: *E. coli* O157, France, haemolytic uraemic syndrome, outbreak, Shiga toxin-producing *E. coli*

Original Submission: 20 March 2014; **Revised Submission:** 17 June 2014; **Accepted:** 17 June 2014

Editor: F. Allerberger

Article published online: 24 June 2014

Clin Microbiol Infect 2014; **20**: O1136–O1144

10.1111/1469-0691.12736

Corresponding author: L. A. King, Département des Maladies Infectieuses, Institut de Veille Sanitaire, 12 rue du Val d'Osne, 94415 Saint-Maurice Cedex, France
E-mail: l.king@invs.sante.fr

[†]In memoriam of E. Bingen

Introduction

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7, also known as pathogenic Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O157:H7, is an established worldwide cause of diarrhoeal illness and haemolytic uraemic syndrome (HUS). The inability

of this EHEC serotype to ferment sorbitol is a phenotypic characteristic key to its microbiological identification.

However, non-motile strains of EHEC O157:[H7] capable of fermenting sorbitol (SF) have also emerged as important human pathogens in continental Europe since their identification in southern Germany in 1988 [1–4]. Although more rarely isolated from human patients than classic EHEC O157:H7, preliminary evidence suggests that SF O157:[H7] infections are associated with a higher HUS incidence and case fatality rate [2–4].

We present here the investigation of a foodborne outbreak of SF EHEC O157:[H7] that was identified on 14 June 2011 following the diagnosis of five paediatric HUS cases between 10 and 13 June in a single administrative district in northern France.

Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme[☆]

Sylvie Issenhuth-Jeanjean^a, Peter Roggentin^b, Matthew Mikoleit^c, Martine Guibourdenche^a,
Elizabeth de Pinna^d, Satheesh Nair^d, Patricia I. Fields^c, François-Xavier Weill^{a,*}

^a Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France

^b *Salmonella*-Zentrale, Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany

^c Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

^d Public Health England, Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, Colindale, UK

Received 4 July 2014; accepted 6 July 2014

Available online 15 July 2014

Abstract

This supplement (no. 48) of the White–Kauffmann–Le Minor scheme reports on the characterization of 63 new *Salmonella* serovars and 25 new variants of previously described *Salmonella* serovars recognized by the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* between 2008 and 2010. Forty-four new serovars were assigned to *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, 12 to subspecies *salamae*, two to subspecies *arizonae*, two to subspecies *diarizonae* and three to subspecies *houtenae*. All these new serovars or new variants are described with their multilocus sequence type.

© 2014 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Salmonella*; Serovars; Taxonomy; MLST; White–Kauffmann–Le Minor scheme

The genus *Salmonella* consists of only two species, *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. *S. enterica* is divided into six subspecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, and *S. enterica* subsp. *indica*. This nomenclature reflects present understanding of *Salmonella* taxonomy [1,2]. The species called *Salmonella subterranea* [3] does not belong in the genus *Salmonella* (Table 1, Fig. 1).

Serovars belonging to *S. enterica* subsp. *enterica* are typically designated by a name usually related to the geographical

place where the serovar was first isolated [7]. The serovar name is written in non-italicized Roman letters and the first letter capitalized. Serovars belonging to other subspecies are designated by their antigenic formulae, following the subspecies name. The antigenic formulae of *Salmonella* serovars are available in the White–Kauffmann–Le Minor scheme [7] at: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrechr/salmoms/WKLM_En.pdf

Updating this scheme is the responsibility of the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHO-Salm), Institut Pasteur, Paris, France. The current edition (9th) issued in 2007 comprises antigenic formulae validated as of January 1st 2007. In 2010, Supplement 47 reported the characterization of 70 new *Salmonella* serovars recognized between January 1st 2003 and December 31st 2007 [8].

[☆] In memory of Prof. Michel-Yvan Popoff (1945–2013) who headed the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* at the Pasteur Institute between 1989 and 2003.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 45 68 83 45; fax: +33 1 45 68 88 37.
E-mail address: fxweill@pasteur.fr (F.-X. Weill).

The French human *Salmonella* surveillance system: evaluation of timeliness of laboratory reporting and factors associated with delays, 2007 to 2011

G Jones (gabriele.jones@ars.sante.fr)¹, S Le Hello², N Jourdan-da Silva¹, V Vaillant¹, H de Valk¹, F X Weill², Y Le Strat¹

1. French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS), Saint-Maurice, France

2. Institut Pasteur, National Reference centre for *Salmonella*, Paris, France

Citation style for this article:

Jones G, Le Hello S, Jourdan-da Silva N, Vaillant V, de Valk H, Weill FX, Le Strat Y. The French human *Salmonella* surveillance system: evaluation of timeliness of laboratory reporting and factors associated with delays, 2007 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19(1):pii=20664. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20664>

Article submitted on 23 November 2012 / published on 09 January 2014

Given the regular occurrence of salmonellosis outbreaks in France, evaluating the timeliness of laboratory reporting is critical for maintaining an effective surveillance system. Laboratory-confirmed human cases of *Salmonella* infection from whom strains were isolated from 2007 to 2011 in France (n=38,413) were extracted from the surveillance database. Three delay intervals were defined: transport delay (strain isolation, transport from primary laboratory to national reference laboratory), analysis delay (serotyping, reporting) and total reporting delay. We calculated the median delay in days and generated the cumulative delay distribution for each interval. Variables were tested for an association with reporting delay using a multivariable generalised linear model. The median transport and analysis delays were 7 and 6 days respectively (interquartile range (IQR: 6–10 and 4–9 respectively), with a median total reporting delay of 14 days (IQR: 11–19). Timeliness was influenced by various external factors: decreasing serotype frequency, geographical zone of primary laboratory and strain isolation on Sundays were the variables most strongly associated with increased length of delay. The effect of season and day of the week of isolation was highly variable over the study period. Several areas for interventions to shorten delays are identified and discussed for both transport and analysis delays.

Introduction

A primary aim of infectious disease surveillance is to detect changes in disease incidence in order to mount an appropriate public health response [1]. There are inherent delays in surveillance between symptom onset and reporting to health agencies, and the reporting chain consists of multiple steps at which delays can accumulate [2].

In France, the human *Salmonella* surveillance system is a voluntary laboratory-based network headed by the National Reference Centre for *Salmonella* (NRC) based at the Pasteur Institute in Paris. Participating

laboratories (1,392/2,253 (62%) in 2011) send around 8,000 *Salmonella* isolates to the NRC per year. The NRC performs serotyping analysis and runs weekly outbreak detection algorithms, notifying exceeded thresholds to the French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS) [3]. The NRC also signals in real time to the InVS any suspected clusters based on observations of serotyping results in the course of their analysis. During outbreaks, serotyping results are notified to the InVS in real time. In 2008, it was estimated that the *Salmonella* surveillance system detected 66% of laboratory-confirmed human *Salmonella* infections in France [4].

Reporting timeliness reflects the speed with which a case of a reportable disease passes through each stage in the reporting chain from symptom onset to reporting to health authorities and is a key component of any disease surveillance system [5]. For *Salmonella*, which is a consistent source of outbreaks in France (representing 92 of 210 laboratory confirmed food-borne outbreaks (44%) in 2010) [6], rapid detection of clusters is a critical element of an outbreak investigation. Every day gained from timely reporting of cases can aid health authorities in leading an investigation that can identify the source of contamination and control the spread of illness (Figure 1). Therefore, regularly evaluating the timeliness of surveillance systems is crucial for maintaining an effective system [7,8].

Previous timeliness studies have been conducted for a number of countries and reportable diseases, including salmonellosis, but no standardised method has been established [1,7,9–11]. The impact of individual factors, such as reporting method (paper or electronic), has been studied [12,13]; however, the effect of multiple factors, including those related to the structure of the surveillance system (primary laboratory type and location) or to the disease in question (seasonality, serotype), has not been explored. Identifying areas for improvement would allow for targeted efforts to

Escherichia coli Bacteremia in Children

Age and Portal of Entry Are the Main Predictors of Severity

Charles Burdet, MD, MPH,*† Olivier Clermont, PhD,† Stéphane Bonacorsi, MD, PhD,‡§

Cédric Laouénan, MD, MPH,*† Edouard Bingen, PharmD,‡§ Yannick Aujard, MD,‡¶ France Mentré, MD, PhD,*†

Agnès Lefort, MD, PhD,†|| and Erick Denamur, MD, PhD† for the COLIBAFI Group

Background: *Escherichia coli* bacteremia is a major cause of severe sepsis in children. Little is known about predictors of severity.

Methods: We analyzed 84 children ≤18 years of age with *E. coli* bacteremia from the prospective COLIBAFI study performed during 2005–2007. The severity of bacteremia was defined as occurrence of death or transfer to intensive care unit. Studied characteristics included age, gender, birth weight, history of prematurity, immunodepression, nosocomial infection, portal of entry, phylogenetic group and subgroup belonging, O-type, virulence gene content and antimicrobial susceptibility. We compared bacterial characteristics in urinary- versus digestive-source bacteremia, in children ≤3 versus >3 month of age, and in children versus adults. We also searched for risk factors of severity.

Results: Median age was 2.4 months, 57% males. Most frequent portals of entry were urinary (66.2%) and digestive (19.5%) tracts. Most isolates (63.1%) belonged to B2 phylogroup. Strains in children ≤3 months of age exhibited more virulence genes, especially *neuC* and *fyuA/irp2*, and were less resistant to antibiotics than in children >3 months of age. Comparing community-acquired urinary-source bacteremia between children and adults, we found that bacteremia were less severe in children, whose strains exhibited a specific virulence gene repertoire and had a higher resistance score than in adults. Seventeen children (20.2%) had a severe bacteremia and 8 died. Non-urinary portal of entry and age ≤3 months of age were the only risk factors associated with severity.

Conclusions: *E. coli* strains responsible for bacteremia exhibit specific characteristics according to age of children. However, host characteristics and portal of entry are the main determinants of severity of *E. coli* bacteremia in children, as observed in adults.

Key Words: bacteremia, *Escherichia coli*, children, portal of entry, prognosis, severity, death, intensive care units, virulence

(*Pediatr Infect Dis J* 2014;33:872–879)

Accepted for publication February 2, 2014.

From the *AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Biostatistiques; †IAME, UMR 1137, INSERM, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; ‡EA 3105, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; §AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Laboratoire de Microbiologie; ¶AP-HP, Hôpital Robert Debré, Service de Néonatalogie, Paris; and ||AP-HP, Hôpital Beaujon, Service de Médecine Interne, Clichy, France.

C.B., O.C. and S.B. contributed equally to the work.

E.B. is deceased.

Authors' contribution: C.B., S.B. and E.D. wrote the article. O.C. performed and analyzed the bacterial data. C.B., C.L. and F.M. performed the statistical analyses. A.L., S.B., E.B., Y.A. and E.D. conceived the study.

The COLIBAFI study was supported by grants from "Réseau de Recherche Clinique" (INSERM: RBM-03-58) and "Projet Hospitalier de Recherche Clinique" (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris: AOR 04 053). The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

This work has partly been reported at the 32nd Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), held in Paris, France on November 21–22, 2012 (poster 548).

Address for correspondence: Erick Denamur, MD, PhD, IAME, UMR 1137 INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. E-mail: erick.denamur@inserm.fr.

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0891-3668/14/3308-0872

DOI: 10.1097/INF.0000000000000309

Severe sepsis in children remains a common cause of hospitalization.¹ Bacteremia account for 25% of hospitalization for severe bacterial infections, and mortality rate is as high as 17%.¹ Few temporal changes in the distribution of bacterial species in bloodstream infections have been reported.² In industrialized countries, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* figure among the 5 more frequently isolated organisms.³

E. coli is a commensal bacteria of the gut.⁴ Some strains can cause however intestinal or extraintestinal infections because of specific virulence factors.⁵ The structure of *E. coli* population is mainly clonal,⁶ with 7 principal phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E and F) and numerous clonal complexes.^{4,7–10} Most clinical extraintestinal pathogenic *E. coli* belong to the B2 phylogroup and to a lesser extent to the D phylogenetic group.¹¹ Some clones or clonal complexes have been linked to specific syndromes.^{12,13}

In adults, mortality of *E. coli* bacteremia has been reported to be as high as 13% in a recent study performed by our group.¹⁴ We showed that host factors and the portal of entry are the main drivers of mortality during *E. coli* bacteremia. The only bacterial characteristic influencing the prognosis was the presence of virulence factor *ireA*, which was negatively associated with death. Phylogenetic belonging of the strains was not a significant predictor.

Studies of *E. coli* bloodstream infections in children, especially in urinary-source bacteremia, linked some virulence factors to the development of bacteremia.^{15–17} They include adhesins, iron uptake systems, protectins and toxins, with differences according to the portal of entry. A higher content in virulence factors was thus reported in strains causing urosepsis when compared with strains causing urinary tract infections without bacteremia.¹⁶ However, there is a lack of prospective studies taking into account both host and bacterial characteristics versus the clinical outcome of *E. coli* bacteremia in children.

To better understand the pathophysiology and severity of *E. coli* bacteremia in children, we analyzed the cohort of children ≤18 years of age of the COLIBAFI study.¹⁴ We compared bacterial characteristics (1) in bacteremia from urinary versus digestive origin, (2) in children ≤3 versus >3 months of age and (3) in community-acquired urinary-source bacteremia in children versus adults. Then we searched for clinical and bacterial risk factors associated with the severity of *E. coli* bacteremia in children.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Setting

This study is part of the COLIBAFI study, a large prospective observational study conducted in 15 French hospitals between January 2005 and November 2007 in which 1051 adults and 84 children with *E. coli* bacteremia were enrolled. The methodology has been previously published.¹⁴ *E. coli* bacteremia was defined as the presence of *E. coli* in ≥1 aseptically filled blood culture vial(s). The follow up ended at hospital discharge or at day 28 after the first positive blood culture. The study was approved by the institutional Ethics Committee (Hôpital Saint-Louis, Paris, France).

Haemolytic–uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype

P. Mariani-Kurkdjian^{1,2,3,a}, C. Lemaître^{1,2,3,a}, P. Bidet^{1,2,3}, D. Perez⁴, L. Boggini⁵, T. Kwon⁶ and S. Bonacorsi^{1,2,3}

1) Centre National de Référence associé *Escherichia coli*, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, 2) IAME, UMR 1137, INSERM, 3) IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, 4) Service de Réanimation, Centre hospitalier de Lons-le-Saunier, Lons-le-Saunier, 5) Service de Microbiologie, Centre hospitalier de Lons-le-Saunier, Lons-le-Saunier and 6) Service de Néphrologie, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France

Abstract

We describe a new atypical Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) responsible for a severe episode of haemolytic–uraemic syndrome in an adult with a relapse associated with bacteraemia. This STECs train of serotype O80:H2 harboured *stx2c* and *stx2d* gene subtypes, the rare *eae* ξ variant and a ColV plasmid with a conserved virulence plasmidic region involved in virulence of human and avian extraintestinal pathogenic *E. coli*. This atypical hybrid pathotype, which represents a new threat, is a further demonstration that STEC may be a recipient for extraintestinal virulence factors and raises again the question of antibiotic therapy during STEC infection.

Keywords: bacteraemia, ColV plasmid, extraintestinal virulence factors, haemolytic–uraemic syndrome, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Original Submission: 7 February 2014; **Revised Submission:** 18 April 2014; **Accepted:** 24 April 2014

Article published online: 27 May 2014

New Microbe and New Infect 2014; **2**: 127–131

Corresponding author: S. Bonacorsi, Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, 48 boulevard Sérurier, 75019 Paris, France
E-mail: stephane.bonacorsi@rdb.aphp.fr

Funding Information: None.

^aThese authors have contributed equally.

Introduction

Among the intestinal pathogenic *Escherichia coli*, Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) are major food-borne emerging pathogens that cause bloody diarrhoea, which may be complicated by the potentially fatal haemolytic–uraemic syndrome (HUS), an important cause of acute renal failure [1]. The main virulence factor of STEC is the phage-encoded cytotoxin called Shiga-toxin that exists as two main types—Stx1 and Stx2 [2]. In most cases, STEC also carry an enterocyte effacement pathogenicity island that causes the attaching and effacing lesions on infected epithelial cells. While other intestinal virulence factors have been described in STEC, extraintestinal manifestations are rare and virulence factors characteristic of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) have been rarely reported.

Case Report

In April 2013, a 39-year-old male was admitted to the intensive care unit because of afebrile generalized tonic–clonic seizure followed by coma without focal abnormalities. White-cell count was 10 200/mL, haemoglobin was 10 g/dL and platelet count was 25 200/mm³ with indirect evidence of haemolysis. The electrolyte balance was normal. Cultures of cerebrospinal fluid, blood and urine were initially sterile. A computed tomographic brain scan revealed bilateral ischaemic lesions in posterior cerebral artery territory and diffuse cerebral oedema. An electroencephalographic study showed attenuation of background activity without spike-wave discharges. Furthermore, the patient received intravenous amoxicillin-clavulanate during the first 5 days of hospitalization for suspected aspiration pneumonia.

Oligoanuric acute renal failure with hypertension occurred 3 days after admission. The serum creatinine concentration increased up to 365 μ mol/L. Blood tests revealed persistent thrombopenia and haemolytic anaemia (haemoglobin 6.3 g/dL) with schistocytes (3.5%). At the same time, the patient presented one episode of non-bloody diarrhoea. Stool cultures yielded a Shiga-toxin-2-producing *E. coli*, which confirmed the diagnosis of HUS. The patient required continuous veno-venous haemofiltration (21 days) and received several erythrocyte, platelet and plasma transfusions.

The *ssbL* Gene Harbored by the ColV Plasmid of an *Escherichia coli* Neonatal Meningitis Strain Is an Auxiliary Virulence Factor Boosting the Production of Siderophores through the Shikimate Pathway

Chloé Lemaître,^{a,b} Philippe Bidet,^{a,b} Jean-François Benoist,^{c,d} Dimitri Schlemmer,^c Elsa Sobral,^b Camille d'Humières,^b Stéphane Bonacorsi^{a,b}

Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, EA3105, Paris, France^a; Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France^b; Service de Biochimie-Hormonologie, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France^c; Université Paris-Sud, Chatenay-Malabry, France^d

The ability to capture iron is a challenge for most bacteria. The neonatal meningitis *Escherichia coli* strain S88 possesses several iron uptake systems, notably including siderophores. Transcriptional analysis of the ColV plasmid pS88 has shown strong induction of a previously undescribed gene with low identity to three *E. coli* chromosomal genes encoding phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolases involved in aromatic amino acid and catecholate/phenolate siderophore biosynthesis through the shikimate pathway. Here, we investigated the role of this gene, *ssbL_p* (*ssbL* carried on the plasmid), in siderophore biosynthesis and, consequently, in S88 virulence. We constructed an S88 mutant designated S88 Δ *ssbL_p*, which exhibited reduced growth under low-iron conditions compared to the wild-type strain. Liquid chromatography-mass spectroscopy analysis of culture supernatants showed that the mutant secreted significantly smaller amounts of enterobactin, salmochelin SX, and yersiniabactin than the wild-type strain. The mutant was also less virulent in a neonatal rat sepsis model, with significantly lower bacteremia and mortality. Supplementation with chorismate, the final product of the shikimate pathway, restored the wild-type phenotype *in vitro*. In a collection of human extraintestinal *E. coli* isolates, we found that *ssbL* was present only in strains harboring the *iro* locus, encoding salmochelins, and was located either on the chromosome or on plasmids. Acquisition of the *iro* locus has been accompanied by acquisition of the auxiliary gene *ssbL*, which boosts the metabolic pathway essential for catecholate/phenolate siderophore biosynthesis and could represent potential therapeutic targets.

Iron is a transition metal essential for fundamental processes in humans and most microorganisms (1, 2). In aerobic environments, iron exists primarily in the oxidized ferric form Fe³⁺, which is highly insoluble at physiological pH and is mainly bound to host proteins, such as transferrin and lactoferrin in humans (1, 3). The concentration of free iron is therefore very low, and pathogens have developed specific mechanisms to acquire iron from their hosts. Strategies for iron acquisition include the secretion of low-molecular-weight molecules called siderophores (4, 5). Siderophores can scavenge Fe³⁺ from host proteins with extremely high affinity (6, 7). Most extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains synthesize several siderophores belonging to different families, such as catecholates (enterobactin and salmochelins), phenolates (yersiniabactin) related to the catecholates family, and hydroxamates (aerobactin) (8, 9).

We have previously performed transcriptional analysis of the ColV plasmid pS88 carried by the *E. coli* neonatal meningitis (NMEC) strain S88, which is involved in meningeal virulence by supporting high, sustained bacteremia (10, 11). This plasmid harbors a conserved virulence plasmidic (CVP) region characterized by several virulence factors, including aerobactin and salmochelins, and initially was described in avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains (11, 12). Under low-iron conditions, transcription of all the iron uptake systems was increased. However, one of the most strongly upregulated genes (more than 100-fold) had no known function although amino acid sequencing showed 45 to 50% identity with three *E. coli* chromosome-encoded phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolases, AroF, AroG, and AroH (EC 2.5.1.54 in the *E. coli* nomenclature). These enzymes catalyze the first reaction of the shikimate biosynthesis pathway, leading to the pro-

duction of chorismate, which is involved in the biosynthesis of both aromatic amino acids and catecholate/phenolate siderophores (Fig. 1) (9, 13–15). Of note, this highly upregulated gene was located on pS88, just upstream of the *iro* locus, encoding salmochelins. A nucleotide homology search using the BLAST program showed that this gene has homologues on ColV and ColBM plasmids (99% identity) and also on the chromosome of uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains such as CFT073 (gene c1220) and UTI536 (gene ECP_0281), with 93% identity.

Because of this gene's strong inducibility under iron-depleted conditions, together with its putative function and physical link to the *iro* locus, we postulated that it might be an auxiliary gene of catecholate/phenolate siderophores that boosts their synthesis by enhancing the production of chorismate through the shikimate pathway. This gene was subsequently designated siderophore synthesis booster (*ssbL*). Here, we show that a strain with a deletion of this gene is deficient for growth and catecholate/phenolate siderophore production under low-iron conditions. In a neonatal rat sepsis model, the deletion strain caused significantly lower bacteremia and mortality than the wild-type strain. Epidemiological

Received 10 October 2013 Accepted 1 January 2014

Published ahead of print 17 January 2014

Address correspondence to Stéphane Bonacorsi, stephane.bonacorsi@rdp.aphp.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01153-13