



**L'interaction entre l'épidémiologie et le séquençage du génome de l'agent dans l'identification d'une source d'épidémie : l'exemple de *Salmonella* poona**

**Francois-xavier weill**

**Centre national de référence *salmonella***

**Institut Pasteur**

**Nathalie Jourdan-Da Silva**

**Direction des Maladies Infectieuses**

**Santé publique France**

**Cette intervention est faite en tant que personnel de Santé publique France, organisateur de la manifestation.**

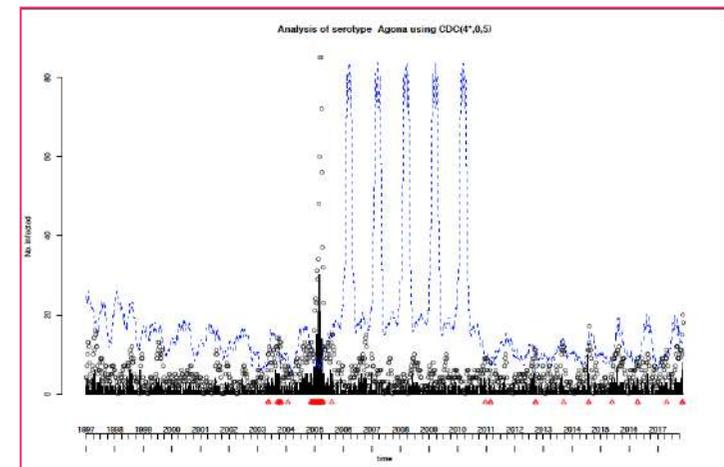
**Je n'ai pas de lien d'intérêts avec le sujet traité.**



**Cette intervention est faite en tant que personnel de L'INSTITUT PASTEUR.**

**Je n'ai pas de lien d'intérêts avec le sujet traité.**

- Réseau de laboratoires adressant des isolats bactériens
- Laboratoire expert (CNR) effectuant des typages sur ces isolats
- Partage rapide des informations entre CNR et SpF



# Le sérotypage

## Avantages

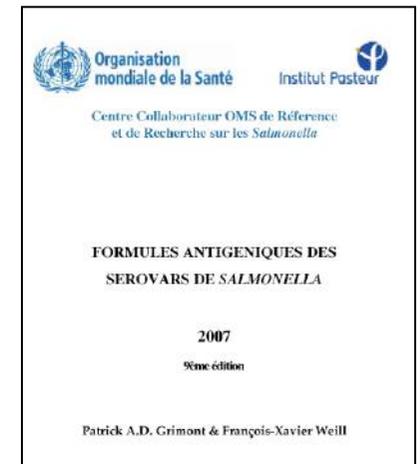
- Méthodologie simple et robuste
- Résultats en trois à quatre jours
- > 2700 sérotypes décrits

## Inconvénients

- Argument économique ++++ (coût des sérums et nombreux sérums nécessaires, date de péremption, ....) avec accréditation ISO15189
- 2 sérotypes (Typhimurium et Enteritidis) représentent 70 % des isolements



1930



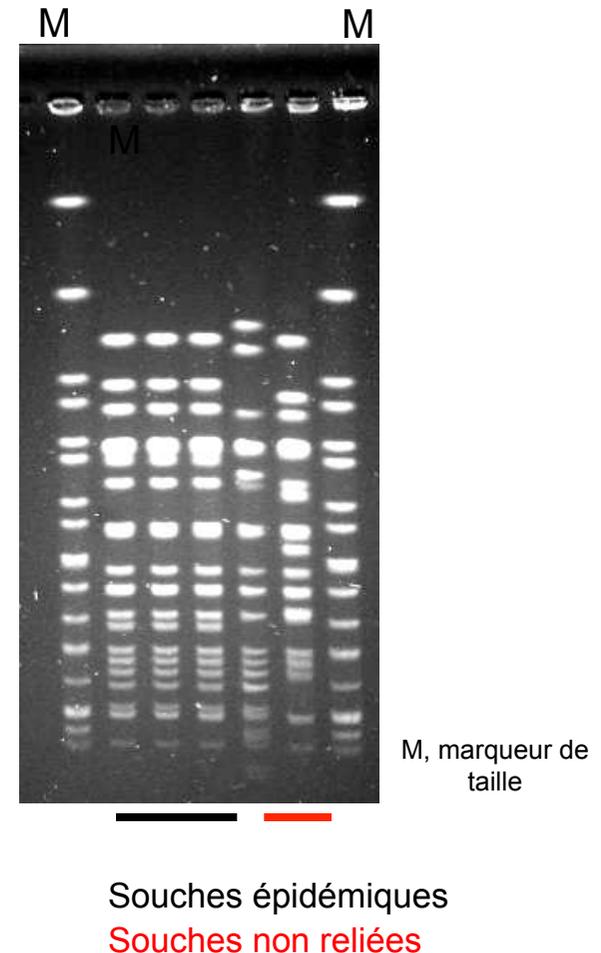
# Le sous-typage

L' électrophorèse en champ pulsé (ECP/PFG)

1992

- Marche sur tout sérotype
- Protocole standardisé PulseNet 2005
- **Inconvénients:**
  - techniquement lourd (pas plus de 18 souches/technicien/j)
  - distance génétique entre les souches difficilement évaluable

Utilisation lors de l'investigation  
d'épidémies (pas en surveillance)



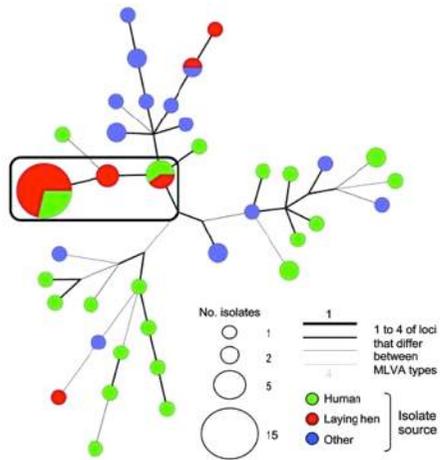
# AUTRES METHODES MOLECULAIRES DE SOUS-TYPAGE DES *SALMONELLA*

Analyse des VNTR (MLVA)

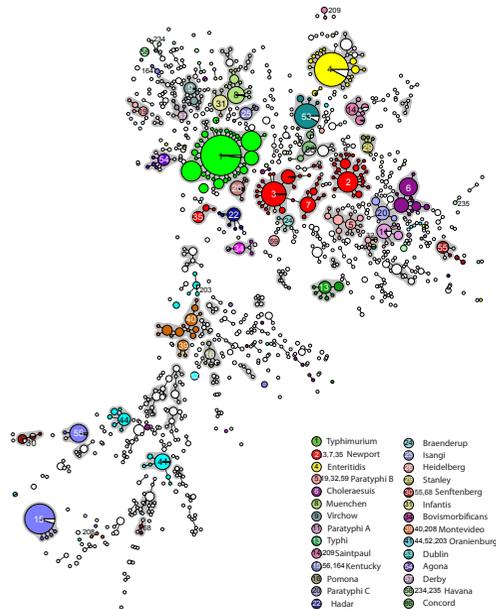
Multi locus Sequence Typing (MLST)

Analyse des spacers des régions CRISPR (CRISPOL-typing)

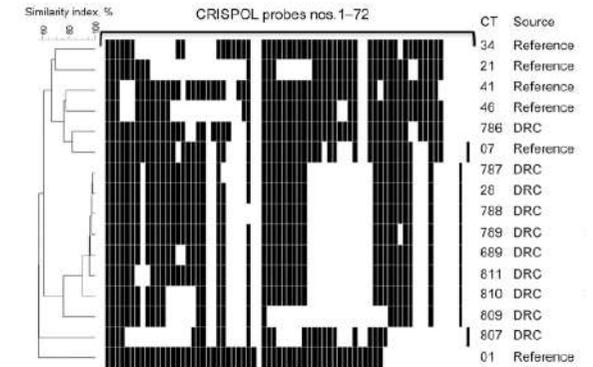
Taille de 5 gènes contenant des répétitions très courtes d'ADN



Séquençage de 7 gènes conservés



Présence ou non de 72 séquences courtes d'ADN



2004

2011

2012

## Sous-typage avant 2017

### Typhimurium et variant monophasique

CRISPOL

MLVA

PFGE  
standardisée

1<sup>ère</sup> intention

-2<sup>ème</sup> intention si  
CT prévalent (ex  
CT1, CT21)

-lors épidémie  
pour alerte  
européenne

-lors épidémie  
pour alerte  
européenne

### Sérotype Enteritidis

### Autres sérotypes

PFGE  
standardisée

MLVA

PFGE  
standardisée

1<sup>ère</sup> intention

-2<sup>ème</sup> intention si  
PFGE type  
prévalent (ex  
X1, X2)

- Complexe
- En deux temps
- Pas utilisé en surveillance

## La méthode du futur pour le typage des *Salmonella*

- Automatisable
- Rapide
- Discriminante (type et sous-type en une seule étape)
- Résultats facilement échangeables entre laboratoires (séquences nucléotidiques)
- Si possible avec une correspondance avec les « sérotypes »

=Whole genome sequencing (WGS) mais avec étude des bonnes cibles issues de travaux antérieurs (MLST7, MLST étendu, sérotypage moléculaire, ....)

# Les premiers essais lors de travaux de recherche

## High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi

Kathryn E Holt<sup>1</sup>, Julian Parkhill<sup>1</sup>, Camila J Mazzoni<sup>2,3</sup>, Philippe Roumagnac<sup>3,4</sup>, François-Xavier Weill<sup>5</sup>, Ian Goodhead<sup>1,8</sup>, Richard Rance<sup>1</sup>, Stephen Baker<sup>1,6</sup>, Duncan J Maskell<sup>7</sup>, John Wain<sup>1</sup>, Christiane Dolecek<sup>6</sup>, Mark Achtman<sup>2,3</sup> & Gordon Dougan<sup>1</sup>

NATURE GENETICS VOLUME 40 | NUMBER 8 | AUGUST 2008

## *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe

Kathryn E Holt<sup>1</sup>, Stephen Baker<sup>2</sup>, François-Xavier Weill<sup>3</sup>, Edward C Holmes<sup>4,5</sup>, Andrew Kitchen<sup>4</sup>, Jun Yu<sup>6</sup>, Vartul Sangal<sup>6</sup>, Derek J Brown<sup>7</sup>, John E Coia<sup>7</sup>, Dong Wook Kim<sup>8,9</sup>, Seon Young Choi<sup>8</sup>, Su Hee Kim<sup>8</sup>, Wanderley D da Silveira<sup>10</sup>, Derek J Pickard<sup>11</sup>, Jeremy J Farrar<sup>2</sup>, Julian Parkhill<sup>1</sup>, Gordon Dougan<sup>11</sup> & Nicholas R Thomson<sup>11</sup>

NATURE GENETICS VOLUME 44 | NUMBER 9 | SEPTEMBER 2012

## Global phylogeography and evolutionary history of *Shigella dysenteriae* type 1

François-Xavier Weill et al.\*

NATURE MICROBIOLOGY | VOL 1 | APRIL 2016

19 genomes

132 genomes

331 genomes

## Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa

François-Xavier Weill,<sup>1,2\*</sup> Daryl Domman,<sup>2</sup> Elisabeth Njamkepo,<sup>1</sup> Cheryl Tarr,<sup>3</sup> Jean Rauzier,<sup>1</sup> Nizar Fawal,<sup>1</sup> Karen H. Keddy,<sup>4,5</sup> Henrik Salje,<sup>6,7</sup> Sandra Moore,<sup>8</sup> Asish K. Mukhopadhyay,<sup>9</sup> Raymond Bercion,<sup>10,11</sup> Francisco J. Luquero,<sup>12</sup> Antoinette Ngandjio,<sup>13</sup> Mireille Dosso,<sup>14</sup> Elena Monakhova,<sup>15</sup> Benoit Garin,<sup>11,†</sup> Christiane Bouchier,<sup>16</sup> Carlo Pazzani,<sup>17</sup> Ankur Mutreja,<sup>18,19</sup> Roland Grunow,<sup>20</sup> Fati Sidikou,<sup>21</sup> Laurence Bonte,<sup>22,†</sup> Sébastien Breurec,<sup>10,†</sup> Maria Damian,<sup>23</sup> Berthe-Marie Njanpop-Lafourcade,<sup>24</sup> Guillaume Sapriel,<sup>25,26</sup> Anne-Laure Page,<sup>12</sup> Monzer Hamze,<sup>27</sup> Myriam Henkens,<sup>28,†</sup> Goutam Chowdhury,<sup>9</sup> Martin Mengel,<sup>24</sup> Jean-Louis Koeck,<sup>29,§</sup> Jean-Michel Fournier,<sup>30</sup> Gordon Dougan,<sup>2,18</sup> Patrick A. D. Grimont,<sup>31</sup> Julian Parkhill,<sup>2</sup> Kathryn E. Holt,<sup>32</sup> Renaud Piarroux,<sup>8</sup> Thandavarayan Ramamurthy,<sup>19</sup> Marie-Laure Quilici,<sup>1,30||</sup> Nicholas R. Thomson<sup>2,33||</sup>

Weill et al., *Science* **358**, 785–789 (2017) 10 November 2017

1070 genomes

# Whole-genome sequencing

## Avantages

**Une seule méthode** remplaçant toutes les autres avec **maintien du lien avec sérotype** et **analyse de la parenté génétique** entre les souches

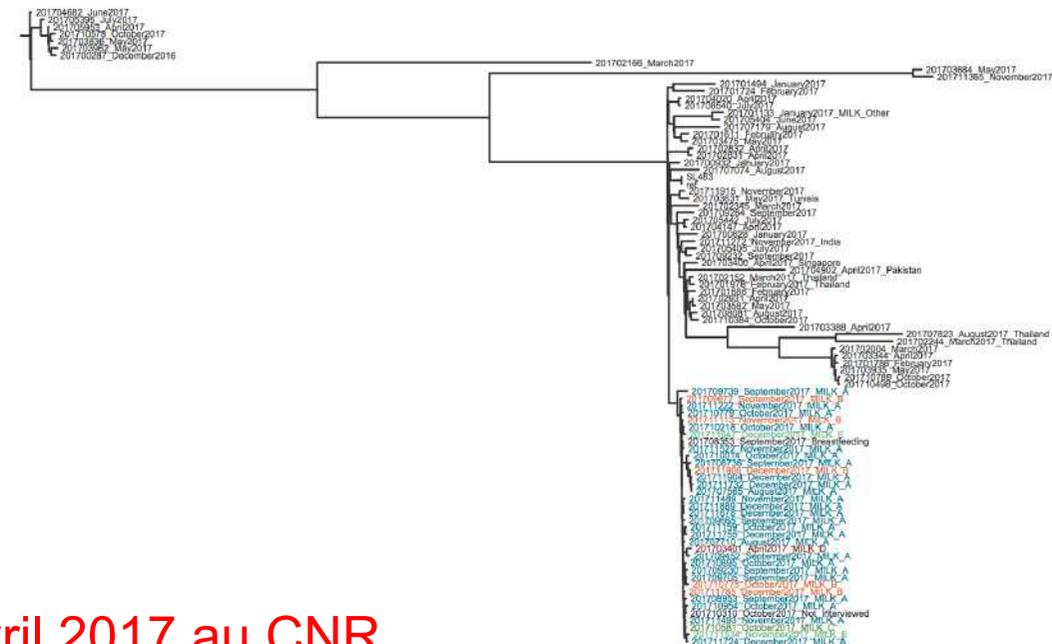
**Automatisable** et **résultats échangeables facilement** entre laboratoires

**Surveillance des populations génétiquement homogènes** (Typhimurium monophasique ST34 CT1 et Enteritidis ST11)

## Inconvénients

- délai (minimum 8-10 jours),
- accès à une plateforme génomique,
- expertise en bioinformatique,
- coûts (72 € par génome plus personnel),
- formation du personnel,
- définition d'une souche bactérienne

Phylogenetic tree of *Salmonella* Agona strains received at the National Reference Centre, France, 2017 (n = 88)



**Passage en WGS en avril 2017 au CNR**

En 2018, 6942 séquences (76% des souches de *Salmonella*)

# Exemple de l'épidémie S.Poona chez des nourrissons, 2018-2019



## infections à *Salmonella*

- dans les 3 jours suivant l'ingestion
- Gastro-entérite avec vomissements, diarrhée +/-sanglante, et fébrile
- L'apparition de ces signes **chez un nourrisson** doit conduire les familles à consulter un médecin sans attendre.

## *Salmonella poona*

- 2 000 sérotypes de *Salmonella* pathogènes chez l'homme.
- De 2016 à 2018, le CNR des *Salmonella* a identifié environ 50 souches de *Salmonella* Poona par an.
- Sérotype retrouvé en France dans divers réservoirs animaux (volailles, produits laitiers, aliments pour animaux).
- Sérotype également retrouvé chez des reptiles.

## épidémies passées de salmonellose à S.POONA

- Epidémie attribuée à la consommation de lait en poudre chez des nourrissons en Espagne en 2010-2011
- 3 épidémies aux Etats-Unis: consommation de concombre, contacts avec petites tortues, consommation de melon

# ALERTE ET INVESTIGATIONS

**Mi janvier 2019, nombre inhabituel (4) de souches de S.Poona isolées chez <1 an sur 5 jours (20-24/12)**

**————→ Déclenchement de l'alerte et des investigations épidémiologiques dès le 18/01 auprès des parents des bébés concernés.**

**Menées par SpF en lien avec le CNR, la DGCCRF et la DGS.**

**Interrogatoire par téléphone des familles des cas:**

- Survenue de la maladie
- Aliments consommés les 3 jours avant le début des signes
- Habitudes de préparation, conservation et nettoyage des biberons de lait

**————→ Consommation par les BB avant leurs symptômes de laits à base de protéines de riz d'une même marque.**

**21/01:** laits fabriqués dans la même usine en **Espagne**, et distribués par 1 seul distributeur en France.

**A partir du 21/01:** Nouveaux cas identifiés par le CNR: consommateurs de lait de cette marque

***Le retrait rappel de ces laits aura lieu dès le 24/01:***

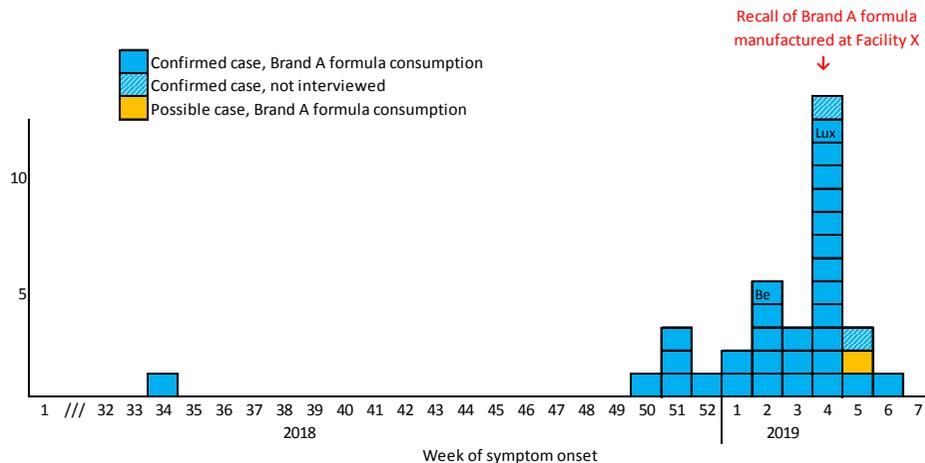
- Rappel de l'ensemble des formules à base de protéines de riz au-delà des deux lots concernés à date
- Et, par précaution, de l'ensemble des formules infantiles fabriquées dans l'usine concernée en Espagne

**25/01: Rappel de laits d'une autre marque fabriqués sur le même site en Espagne, par précaution**

**31 nourrissons (18 M, 13 F), 11 régions**

**Age médian 10 mois (min : 2 mois, max : 28 mois)**

**Début des symptômes: fin 08/2018 à début 02/2019**



## Parents de 29 nourrissons interrogés

- 13 hospitalisés
- Lors des interrogatoires téléphoniques, les parents rapportaient que leurs bébés allaient bien.

## Consommations de laits tous élaborés sur un même site de production en Espagne:

- Lait M. riz 1<sup>er</sup> âge (0-6 mois) (2 nourrissons)
- Lait M.riz 2<sup>ème</sup> âge (6-12 mois) (16 nourrissons)
- Lait M. riz 2<sup>ème</sup> âge AR (6-36 mois) (11 nourrissons)

## **SpF a alerté, le 21 Janvier 2019 :**

- Ses homologues (Agences et instituts nationaux de santé publique)
- Les microbiologistes des CNR de la communauté Européenne

**Les informations sur les produits à retirer de la vente** ont été diffusées internationalement via le System européen d'alerte rapide des aliments (European Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)),

**Deux cas** d'infection à S.Poona chez des nourrissons ayant consommé du lait de la liste identifiés hors France : **un enfant en Belgique et un enfant au Luxembourg**

**L'ECDC et l'Agence Européenne de sécurité Alimentaire (EFSA)**, en lien étroit avec les autorités sanitaires françaises et SpF, ont conduit une analyse rapide du risque de cet événement.

Analyse des souches épidémiques de *S. Poona* par WGS.

☞ Confirmation des nouveaux cas par sérotypage du fait du délai pour obtenir WGS

Analyse de souches non françaises contemporaines via Enterobase ou échange de séquences avec les CNR du Luxembourg et de Belgique

Analyse de souches historiques de *S. Poona* de l'épidémie de 2010-2011 en lien avec le CNR espagnol

# Phylogénie basée sur 2,597 mutations nucléotidiques (SNP)

2018—2019 S. Poona outbreak isolates

2010—2011 S. Poona outbreak isolates

## Country of isolation

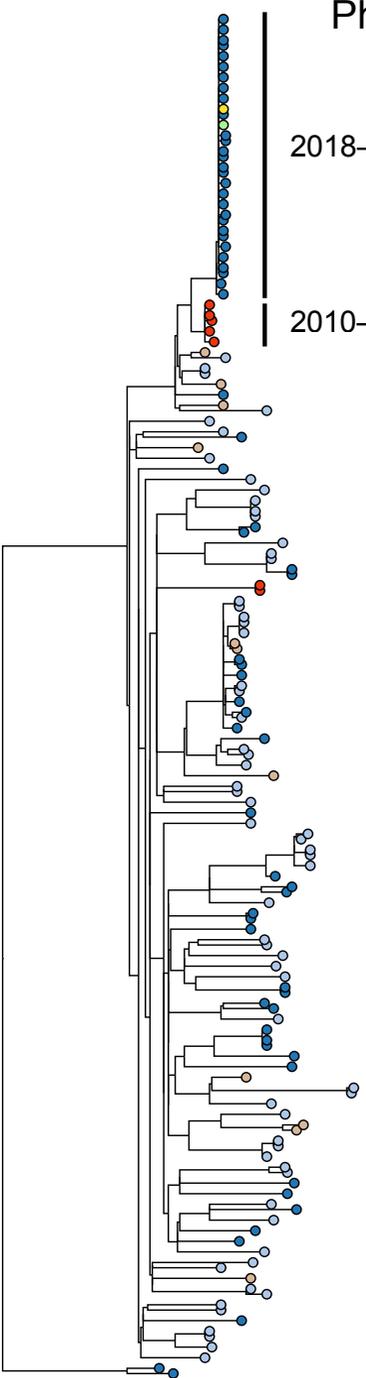
- France ( $n = 67$ )
- United Kingdom ( $n = 64$ )
- United States ( $n = 11$ )
- Spain ( $n = 7$ )
- Belgium ( $n = 1$ )
- Luxembourg ( $n = 1$ )

Les souches de S. Poona des 31 cas de l'épidémie de 2018-2019 forment un cluster net.

Les souches épidémiques de 2018-2019 dérivent de souches isolées lors de l'épidémie survenue en Espagne en 2010-2011 et liée à la consommation de laits infantiles produits dans la même usine.

151 souches appartenant au cgMLST HC50 | 1288  
(Enterobase)

0.00001



## France

Laits consommés/achetés provenant de 7 lots différents (informations disponibles pour 18 cas)

## Espagne

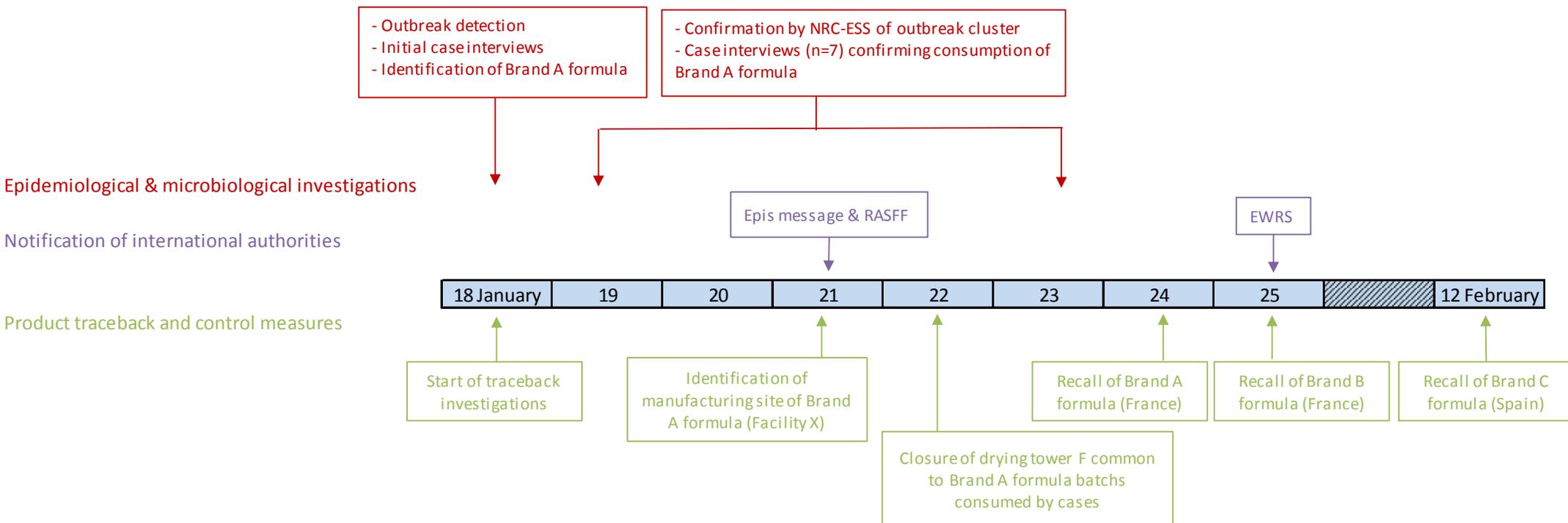
Une même tour de séchage ayant servi à produire ces 7 lots, décision de fermer cette tour de séchage , par précaution, le 22/01

12/02: rappel de laits d'une autre marque passés par cette tour de séchage, et vendus en Espagne (pas de cas de salmonellose associés identifiés par le CNR espagnol)

## Prélèvements tous négatifs au 28/03:

Laits prélevés aux domiciles des cas, laits provenant d'autres lots, prélèvements environnementaux au sein de l'usine

# CHRONOLOGIE



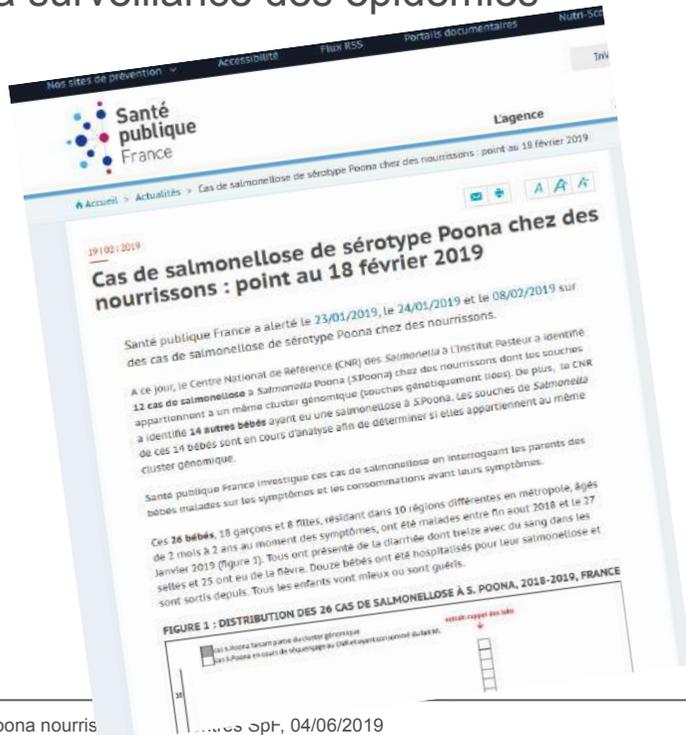
# Rappel des conseils à l'attention des parents – recommandations de la Société Française de Pédiatrie



- **Changer immédiatement de lait.**
- **Substitutions possibles +faire bouillir le lait si pas d'alternative**
- **Recommandations transmises** aux médecins généralistes, pédiatres, sages-femmes, pharmaciens.
- **SpF sur son site** rappelle les principes d'hygiène à respecter lors de la préparation des biberons :
  - chaque manipulation doit être précédée d'un lavage soigneux des mains à l'eau et au savon ;
  - les biberons ne doivent pas être préparés à l'avance ;
  - les biberons doivent être nettoyés aussitôt après usage.

## Concerne le bilan sanitaire

- Via notre site Web : points du 23/01, 24/01, 08/02, 18/02/2019
- Communication aux professionnels de santé via la revue médicale Eurosurveillance, spécialisée dans la surveillance des épidémies



## Où en est-on?

- investigations en cours au sein de l'usine espagnole afin d'identifier la source de contamination
- persistance d'une souche au sein d'une usine de production de lait en poudre pendant au moins 8 ans: cf epidemie S.agona 2017
- limites de détection salmonella dans laits en poudre

# CONCLUSIONS

- **Révolution en microbiologie de Santé publique**
- **Technologie permettant notamment le suivi a long terme de souches « sensibles » (agona 2017, Poona 2018)**
- **Toujours en phase d'apprentissage (définition génomique d'une souche épidémique, typage génomique et concordance épidémiologique)**
- **En France, Accumulation de données génomiques sur plus de 15000 génomes de *Salmonella*. Pour l'instant que des souches humaines. Vers une surveillance One Health ?**
- **Accès aux données génomiques d'autres pays via Enterobase: aide aux investigations**

# REMERCIEMENTS

- **parents qui ont accepté de répondre aux questions des épidémiologistes**
- **Épidémiologistes de Spf qui ont interrogé les parents des bébés**
- **CNR *Salmonella***
- **DGCCRF**
- **DGS**