

Rapport annuel d'activité

2019

**Centre national de référence des
Staphylocoques**

Directeur : Pr F. Vandenesch

Co-directeurs : Pr F. Laurent et Dr A. Tristan

**Année d'exercice
2018**



1	MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	7
2	ACTIVITES D'EXPERTISE	9
2.1	ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES.....	9
2.2	TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES	10
2.3	TECHNIQUES TRANSFERÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	11
2.4	COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	11
2.5	ACTIVITES D'EXPERTISE	11
2.6	ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	12
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	14
3.1	DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES	14
3.2	SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	15
3.2.1	<i>Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique</i>	15
3.2.2	<i>Syndromes d'exfoliation staphylococcique</i>	17
3.2.3	<i>Infections suppuratives à S. aureus PVL+</i>	18
3.2.4	<i>Furonculoses familiales</i>	20
3.2.5	<i>Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine</i>	21
3.2.6	<i>Intoxications alimentaires individuelles et collectives</i>	23
3.2.7	<i>Ostéites et infections ostéo-articulaires</i>	23
3.2.8	<i>Surveillance du clone CC152-MSSA en France</i>	24
3.2.9	<i>Sérologies PVL et TSST-1</i>	25
3.3	SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	27
3.3.1	<i>Définition de l'échantillon de souches testées</i>	27
3.3.2	<i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	28
3.3.3	<i>Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances</i>	28
3.3.3.1	Résistance aux bêta-lactamines	28
3.3.3.2	Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides	31
3.3.3.3	Détection de la résistance au linézolide.....	31
3.3.3.4	Détection de la résistance à la daptomycine	33
3.3.3.5	Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux.....	34
3.3.4	<i>Analyse des tendances</i>	34
3.4	INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	35
3.5	ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	36
4	ALERTE.....	37
4.1	LA PROCEDURE D'ALERTE DE SANTE PUBLIQUE FRANCE ET DE LA DGS EN CAS DE DETECTION DE PHENOMENE ANORMAL, LES EVENEMENTS AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE AU COURS DE L'ANNEE	37
4.2	DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	37
4.2.1	<i>Épidémies de S. aureus dans plusieurs services de néonatalogie en France</i>	37
4.2.2	<i>Epidémie d'infections cutanées dans un ITEP</i>	41
4.2.3	<i>Recherche de lien de clonalité</i>	41
4.2.4	<i>Alerte Vitek</i>	44
4.3	ANALYSER DES TENDANCES ET LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME LORS DE L'ALERTE.....	46
5	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	46
5.1	CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE.....	46
5.1.1	<i>Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé, Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques</i>	46
5.1.2	<i>Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)</i>	47
5.1.3	<i>Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :</i>	47
5.1.4	<i>Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...</i>	47
5.2	CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	48
5.3	CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC ...)	49
6	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	50
6.1	ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS LORS DE L'ANNEE N, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR.....	50

6.2	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE L'ANNEE N	58
7	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	64
8	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....	64
8.1	ACTIVITES D'EXPERTISE	64
8.1.1	<i>Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer.....</i>	64
8.1.2	<i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu</i>	65
8.1.3	<i>Les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés</i>	65
8.1.4	<i>Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.</i>	66
8.2	ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION	67
8.2.1	<i>Les projets de formation envisagés.....</i>	67
8.2.2	<i>Les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR.....</i>	67
8.2.3	<i>Les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales</i>	67
8.3	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	67
8.3.1	<i>Les projets de constitution, développement, animation de réseaux de partenaires.....</i>	68
8.3.2	<i>La contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels...</i>	68
8.3.3	<i>La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux.....</i>	68
8.3.4	<i>Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance</i>	68
8.4	CONTRIBUTION A L'ALERTE	69
ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	70	
1.1	MISSIONS DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES	70
1.2	ORGANISATION DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES	71
1.3	LOCAUX ET EQUIPEMENTS.....	72
1.4	COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	74
1.5	DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE	74
1.5.1	L'ENJEU DE L'ACCREDITATION	74
1.5.2	<i>La structure qualité du laboratoire</i>	74
1.5.3	<i>Les audits</i>	76
1.5.4	<i>Le logiciel de gestion de la qualité</i>	76
1.5.5	<i>Avancement de la démarche qualité.....</i>	76
1.5.6	<i>Les contrôles qualité</i>	76
1.5.6.1	CQE Européen de l'ESGS	76
1.5.6.2	Mise en place d'échanges inter-laboratoires.....	77
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	78	
2.1	LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE	78
2.1.1	<i>Diagnostic/identification.....</i>	78
2.1.1.1	<i>Techniques d'identification</i>	78
2.1.1.2	<i>Techniques de caractérisation de la virulence.....</i>	79
2.1.1.3	<i>Techniques immunologiques de diagnostic indirect.....</i>	80
2.1.2	<i>Typage (marqueurs épidémiologiques).....</i>	81
2.1.3	<i>Techniques de séquençage.....</i>	82
2.1.4	<i>Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :</i>	83
2.2	LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR	85
ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS (NON DESTINEES A ETRE RENDUES PUBLIQUES).....	86	
ANNEXE 4 : RESULTATS ENQUETE RESEAU RESISTANCE	87	
ANNEXE 5 : LETTRE D'AGREMENT POUR TRANSFERT DE MATERIEL DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES STAPHYLOCOQUES	88	
ANNEXE 6 : SOMMAIRE DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES DU CHU DE LYON	90	

Préambule

Un rapport annuel d'activité pour l'année N doit être transmis par chaque CNR à Santé publique France à la fin du premier trimestre de l'année N+1.

*L'objectif de ce document est de fournir aux CNR un cadre de présentation homogène (**plan-type**) des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés lors de l'année N.*

*Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter **un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.***

*Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année N. **Il doit être concis**, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un **travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.***

*Ce rapport doit inclure un **résumé analytique (en français et en anglais)** destiné à être publié sur le site de Santé publique France.*

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- *Les **annexes 1 et 2** ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. **Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...)** doivent figurer dans le corps du rapport.*
- *L'**annexe 3** regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT, détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées. Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.*

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité.

A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

Résumé analytique

Expertise, surveillance, alerte, information, formation et conseil sont les mots clés des missions des CNR. Sur cette base les principaux résultats et faits marquants de l'année 2018 du CNR des staphylocoques sont les suivants :

- **en matière d'expertise**, le CNR a poursuivi son activité d'expertise sur un rythme toujours très soutenu 3002 souches et ADN analysées, 561 souches et ADN distribués avec un nombre de correspondants toujours très élevé

- **en matière de surveillance et d'alerte**, le CNR a été pro-actif vis à vis de la surveillance épidémiologique sur les points sensibles que sont :

- la détection de cas groupés et l'affirmation ou l'infirmité de la transmission grâce à l'implémentation du NGS qui est devenu l'outil de choix pour l'investigation de ces cas, avec plus de 20 épisodes ou situations épidémiques investiguées en 2018 ; la précision de l'analyse au SNP près ayant parfois permis de conclure formellement là où les méthodes conventionnelles ne l'auraient pas pu.

- un nombre soutenu de signalements et d'investigation de cas groupés et d'épidémies dans les services de néonatalogie impliquant des souches SASM et SARM de différentes lignées dont un cas avec des souches CC30-MSSA PVL+. Ce phénomène est peut-être en lien avec l'augmentation de la prématurité, les pratiques favorisant les liens physique parents-nouveaux nés (peau-à-peau, banalisation des téléphone portables dans l'environnement des couveuses) et les tensions en matière de ressources en personnel dans les services de néonatalogie.

- la détection croissante de souches de staphylocoques résistantes au linézolide particulièrement chez les staphylocoques non-*aureus* alors que le phénomène reste anecdotique chez *S. aureus*

- la surveillance de l'évolution des clones de SASM et de SARM en France où l'on note une relative stabilité des clones de SARM communautaires historiques (ST80 et USA300) mais toujours une augmentation de fréquence de la lignée CC152 PVL+ incluant des souches SASM mais aussi l'apparition de SARM depuis 2018.

- **en matière de conseil, de formation, d'information et d'animation scientifique**, outre leur participation à différentes cellules de gestion d'épidémie, le CNR a poursuivi son activité de diffusion de la connaissance :

- par l'organisation en 2018 dans le cadre du groupe ESGS de l'ESCMID d'un contrôle de qualité à destination des CNR Européens.

- par sa participation à un groupe de travail de l'HAS sur la prise en charge des infections cutanées bactériennes courantes, sa participation à l'élaboration des recommandations du CA-SFM pour la détermination de la sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques

- enfin, le CNR participant **d'une recherche intégrée** « bed to bench & bench to bed » associée à notre équipe de recherche INSERM thématisée sur les staphylocoques, un nombre important d'articles scientifiques en lien direct avec l'activité du CNR a été publié, de même que des articles plus fondamentaux ayant des retombées potentielles en Santé.

Analytic Summary

Expertise, Surveillance, alert, information, formation, advices are the key words of the NRC missions. On this basis the major achievement of the year 2018 are the following:

- **regarding expertise**, the NRC received as in the past year an impressive number of strains and DNA for characterization (3002), conversely, 561 strains or DNA were sent to requesting laboratories.

- **regarding surveillance and alert**, the NRC has been active in its activities on the following points:

- detection, prove or disprove transmission based on NGS approaches which has become our routine tool to investigate more than 20 suspected cases, allowing definite conclusion because of its resolution at the SNP level, contrasting with the use of previous methods that imposed more cautious conclusions.

- a significant number of signaling and outbreak investigation in neonates ICU involving both MSSA and MRSA of various lineages with on episode involving a CC30-MSSA PVL+ strain. This phenomenon might be a consequence of increase premature child, the development of parental contact with neonates (skin-to-skin, common use of cell-phone in the vicinity of incubators), and the human resources shortages in neonate ICU.

- the continuous increase detection of linezolid-resistant staphylococci, essentially in non-*aureus* staphylococci, whilst the resistance remains anecdotic for *S. aureus*.

- the surveillance of the evolution in the epidemiology of MRSA and MSSA in France showing a stability of the historical CA-MRSA lineages (ST80 and USA300) and a rising of new lineages such as CC152 PVL+ that includes both MSSA and MRSA.

- **regarding advice, formation, information and scientific animation**, beside its participation to various ad-hoc committees for outbreak investigation, the NRC has achieved the following activities:

- Within the frame of the European study group on Staphylococci (ESG) of the ESCMID, the French NRC organized in 2018 an external quality control for the other European NRCs.

- the NRC was involved in the elaboration of the French recommendation for the management of cutaneous infections and participated to the elaboration of the CA-SFM recommendation for antibiotic susceptibility determination of Staphylococci.

- Finally, the NRC participates to **an integrative research** « bed to bench & bench to bed » through a strong link with our INSERM research team focused on Staphylococcal Pathogenesis. An important number of research articles with direct link to the NRC activity were published as well as more fundamental articles with potential input for human health.

1 Missions et organisation du CNR

Au sein de l'Institut des Agents Infectieux, les personnels affectés au CNR des staphylocoques comprennent des personnels affectés spécifiquement et exclusivement au CNR (techniciens et ingénieur) et des personnels qui consacrent une partie de leur temps seulement au CNR selon un principe de multi-affectation (biologistes, secrétaires, cadre médico-technique).

Les personnels affectés à l'activité de ce CNR pour tout ou partie de leur temps de travail sont les suivants :

François Vandenesch – Directeur du CNR PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : francois.vandenesch@univ-lyon1.fr
Anne Tristan – Directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@chu-lyon.fr
Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr

1. Secteur virulence et épidémiologie

Anne Tristan – Directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@chu-lyon.fr
Claude-Alexandre Gustave AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : claude-alexandre.gustave@chu-lyon.fr
Michèle Bes Biologiste contractuel-IAI	E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Gérard Lina PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr
Jérôme Etienne PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : jerome.etienne@univ-lyon1.fr

2. Secteur résistance

Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux-Chabert PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle-Ranc PH-IAI	E-mail : anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr

3. Secteur sérologie

Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux-Chabert PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux@chu-lyon.fr

Patricia Martins-Simoes Ingénieure – IAI	E-mail : patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr
---	---

Yves Gillet (Réfèrent infectiologue pédiatre) PH - Hôpital Femme Mère Enfant PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : yves.gillet@chu-lyon.fr
Tristan Ferry (Réfèrent infectiologue adultes) PH - Hôpital de la Croix-Rousse PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : tristan.ferry@chu-lyon.fr
Pascal Del Giudice (Réfèrent dermatologie) PH- CHI Fréjus Saint Raphaël	E-mail : del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr

Cadre Hélène Rutschi	
Techniciennes Nadia Boulegroun Caroline Bouveyron Christine Gardon Emelyne Jeanne Charline Vuillot	
Secrétaires Yamina Lakehal / Laurence Morales	

Le CNR des staphylocoques est accrédité pour la PCR PVL en urgence sur les souches (extension demandée en 2015, audit du COFRAC effectué en 2016, confirmation du COFRAC suite à notre déménagement en janvier 2017, l'audit interne LBMMS effectué en mars 2017 n'a relevé aucun écart et souligné la bonne gestion des risques lors du déménagement) de même que l'audit de surveillance COFRAC 2018.

Les dossiers d'ajout pour la recherche de toxines, les PCR (*mecA*, *mecC*, *gyr*, *kos*, *agr*) sont prêts mais en raison d'un chevauchement avec le secteur de bactériologie conventionnelle dans lesquels interviennent également les membres du CNR, les dossiers finalisés ne seront déposés en ajout que pour 2019. L'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici 2020.

Cf Annexe 1.

2 Activités d'expertise

Pour l'ensemble des souches staphylocoques (*S. aureus* et *S. non-aureus*), la technique utilisée en routine pour l'identification d'espèce est la spectrométrie de masse.

Les souches de *S. aureus* reçues au CNR pour recherche de toxines sont actuellement expertisées avec une technique de puces à ADN.

Pour les recherches de liens de clonalité, en fonction des espèces de staphylocoques, l'expertise est effectuée soit avec les puces à ADN soit le NGS. Le CNR implémente actuellement les approches génomiques, en vue d'une part d'une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones épidémiques et d'autre part à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés.

Concernant les souches de staphylocoques reçues pour évaluation de la sensibilité aux antibiotiques, les techniques sont également identiques à celles utilisées précédemment en attendant l'implémentation prévues en 2019 d'un automate permettant de disposer de résultats de CMI vraies (Plaques Sensititre® (Thermo Scientific™)). Cette technique avec lecture automatisée a fait l'objet d'une évaluation favorable en 2017-2018 Cf paragraphe 2.1 .

Éléments clés en termes de production d'expertise :

- 2713 souches reçues
- 95 départements métropolitains ou DROM COM,
- Expertise virulence -> puces à ADN et antibiogramme,
- Expertise clonalité -> puces à ADN et/ou séquençage
- Expertise résistance -> Antibiogramme par diffusion +/- CMI en microdilution + analyse de population pour les glycopeptides +/- gènes de résistance
- Délai moyen de réalisation d'expertise (entre date d'envoi et rendu, hors séquençage) < 7 jours (72h pour PVL urgente)

2.1 Évolutions des techniques

Séquençage génome entier (NGS)

Cette activité en plein développement est détaillée au chapitre 2.6.

Protéomique

En collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon UMR CNRS 5280 (Jérôme Lemoine), le CNR développe actuellement une méthode de protéomique haut débit¹ ciblant une centaine de facteurs de virulence et de régulateurs globaux en vue de déterminer l'expression de ces facteurs dans les souches cliniques. A terme, cette approche permettra de sélectionner de nouveaux biomarqueurs et de développer éventuellement des tests rapides d'identification des pathovars. Ce projet a été déposé à l'ANR en 2019 dans le cadre d'un consortium associant le CNR de la résistance aux antibiotiques, le CNR des staphylocoques et l'Institut des Sciences analytiques. Voir l'annexe confidentielle pour plus de détails.

Détermination de la résistance aux antibiotiques (Sensititre®)

Conformément aux recommandations des comités de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et européenne (EUCAST), le CNR adapte ses méthodes de détermination de la sensibilité des Staphylocoques aux antibiotiques en complétant les méthodes actuellement utilisées (Vitek2®, diffusion et e-tests®) par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide. Dans cette perspective, le CNR a évalué le système Sensititre® (Thermo Scientific™) selon une configuration regroupant des

¹ Rougemont B et al. Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by *Dickeya dadantii* Proteomic Analysis during Plant Infection. *Anal Chem.* 2017 Feb 7;89(3):1421-1426.

plaques d'incubation lyophilisées ou congelées de 96 puits, un ensemenceur automatisé, un lecteur optique automatisé (Thermo Scientific™ Sensititre™ OptiRead™ System), un lecteur optique manuel (Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ System), et un système informatique de gestion des résultats. L'étude s'est déroulée en deux phases (évaluation de la justesse, puis reproductibilité) entre septembre 2016 et avril 2017. Cent-dix souches de Staphylocoques ont été incluses selon la répartition suivante :

- Phase 1 : évaluation de la justesse
 - o 50 *Staphylocoques non aureus*,
 - o 50 *Staphylococcus aureus* (dont 25 SASM et 25 SARM)
- Phase 2 : évaluation de la reproductibilité
 - o 5 *Staphylocoques non aureus*
 - o 5 *Staphylococcus aureus*

Au vu des résultats de cette étude, des panels d'antibiotiques disponibles et de leurs tarifs, ainsi que des recommandations du CA-SFM/EUCAST, le CNR basculera vers ce système de réalisation des antibiogrammes courant mai 2019. En raison d'un coût unitaire plus élevé que l'antibiogramme actuellement réalisé, la détermination des CMI par ce système sera ciblée sur un nombre plus limité de souches et non sur l'ensemble des souches reçues comme actuellement.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Évaluation des performances du test MRSA Assay Panther Fusion® Hologic pour le dépistage du portage nasal de *Staphylococcus aureus*.

Objectif : Évaluer les performances du test MRSA Assay Panther Fusion® Hologic (PF) pour le dépistage nasal de *S. aureus* (SASM/SARM) par rapport aux techniques classiques de culture.

Méthode : 434 écouvillons nasaux en provenance des Hospices Civils de Lyon ont été testés simultanément en culture et par PF. La technologie PF repose sur la détection de 3 cibles par PCR : une cible appelée GAPDH spécifique de *S. aureus*, les gènes *mecA/mecC* (résistance à la méticilline) et la jonction *orfX*-cassette *SCCmec* (cassette contenant le gène *mec*). En cas de discordances entre les deux techniques, l'échantillon natif a été retesté avec un deuxième test de BM, Xpert® SA nasal complete GeneXpert (Cepheid) et une culture enrichie a également été effectuée. En cas de culture positive mais de discordance avec les tests de BM, la souche a été analysée par le CNR des Staphylocoques (caractérisation par puce à ADN)

Résultats : Pour l'analyse des résultats, il a été considéré un prélèvement SARM+ ou SASM+ si celui-ci est positif en culture ou si les deux tests de BM sont positifs et concordants. La concordance globale de PF est de 97,5% et 97,9% pour la détection de *S. aureus* et de SARM respectivement. 4 souches de SARM ont été faussement détectées comme SASM en raison d'une cassette *SCCmec* atypique et 2 souches de SASM *drop-out* ont été faussement détectées SARM par les deux tests de BM. 7,1% des échantillons étaient positifs et concordants en BM mais négatifs en culture primaire. Après enrichissement, 3,5 % des prélèvements totaux sont restés stériles en culture démontrant le défaut de sensibilité de la culture par rapport à la biologie moléculaire.

Conclusion : Le test de dépistage nasal MRSA Assay Panther Fusion® est un outil fiable et rapide de dépistage nasal du SASM/SARM. La principale limite, commune aux techniques de biologie moléculaire reste l'analyse des souches particulières telles que des souches de SARM présentant des une cassette *SCCmec* atypique (faussement rendu SASM), ou des souches de SASM dites *drop-out* (faussement rendues SARM). Cet outil en *random access* permet une analyse rapide en moins de 3 heures et correspond à une nouvelle étape vers l'automatisation complète de la biologie moléculaire (communication affichée : Maurin E, Ranc AG, Tristan A, Bes B, Gustave CA, Vandenesch F, Laurent F. Dépistage nasal SASM/SARM : Évaluation du système Panther Fusion® Hologic. 38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris).

Évaluation des performances du test UMIC Daptomycine pour les souches staphylocoques

Objectif : Évaluer les performances du test UMIC Daptomycine® Biocentric pour la détermination de la CMI des staphylocoques à la daptomycine par rapport à la technique Etest®

Méthode : 55 souches de staphylocoques (SA et SCN ; 20 sensibles dont la majorité avec une CMI proches des

concentrations limites et 35 résistantes en Etest) ont été testés pour leur niveau de sensibilité au linézolide avec le test UMIC Daptomycine. La technique repose sur une approche de type microdilution en milieu liquide avec une gamme de 10 concentrations croissantes de daptomycine.

Résultats : Par rapport à la technique Etest, la sensibilité et la spécificité de la technique UMIC pour déterminer la sensibilité/résistance à la daptomycine était respectivement de 95 et 94,8%. Les CMI obtenues par technique Etest et celles déterminées en utilisant technique UMIC Daptomycine présentaient une excellente corrélation ($R^2=0.9$)

Conclusion : Le test UMIC Daptomycine® Biocentric est une technique intéressante pour la détermination des CMI pour cet antibiotique chez les souches de staphylocoques. (Résultats présentés dans le cadre de la communication orale : Laurent F. Mécanismes de résistance aux nouveaux anti-infectieux : Daptomycine et *Staphylococcus* sp. 38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris, article en cours de préparation).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR est à la disposition des laboratoires académiques et hospitaliers pour les accompagner dans l'implantation locale des techniques d'identification et de caractérisation des souches de staphylocoques dans leur laboratoire.

En 2018, nous avons notamment transmis à plusieurs laboratoires les protocoles PCR et les souches contrôles permettant l'identification des souches de SARM portant le gène *mecC* et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine.

2.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve la totalité des échantillons (congélation à -20 °C) qui lui sont adressés qu'il s'agisse de souches cliniques, de souches type ou de référence, de sérums et autres prélèvements cliniques (pus, biopsies...). Il dispose aussi d'une DNAtèque de la totalité des souches reçues au laboratoire depuis 2005. En 2018, le CNR a reçu **2713** souches pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles (Cf paragraphe 2.5) et **289** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

En 2018, nous avons envoyé **561 souches ou ADN** à nos correspondants en France (488) et à l'étranger (Allemagne : 9, Angleterre : 48, Danemark : 10, Portugal : 1, Tchéquie : 5)

Cf Annexe 1.

2.5 Activités d'expertise

Entre 2006 et 2018, le CNR a reçu **28 655** souches de staphylocoques pour expertise (Figure 1) avec une augmentation constante du nombre de souches reçues pour expertise. (A noter les pics en 2011 et 2015 qui correspondent aux nombreuses souches reçues au CNR dans le cadre de différents protocoles.)

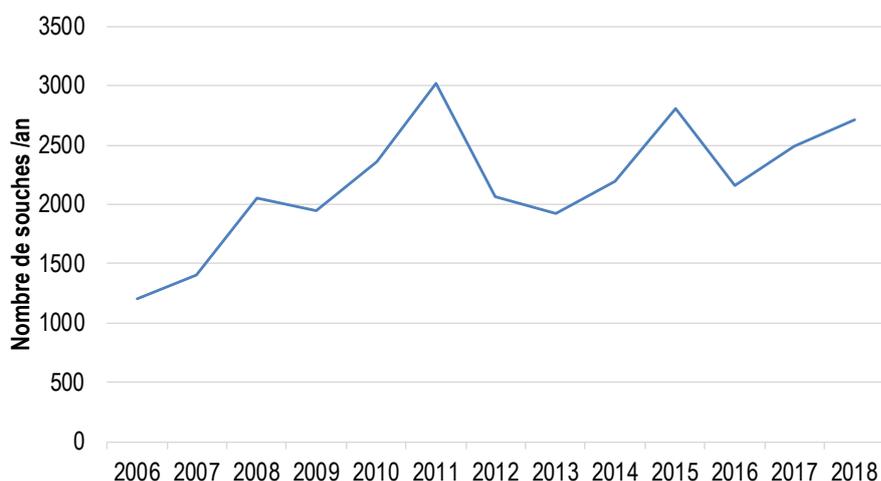


Figure 1- Évolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2018.

En 2018, le CNR a reçu **2713 souches** pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles.

Ces souches provenaient de **95 départements métropolitains ou des DROM COM**. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 30 % (Auvergne Rhône-Alpes), 17 % (Ile de France), 10 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions. Quatre pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco et du Luxembourg.

Toutes les souches reçues pour **expertise virulence** ont bénéficié d'une caractérisation complète de la souche par puces à ADN et un antibiogramme.

Toutes les souches reçues pour **recherche de lien de clonalité** ont bénéficié d'une caractérisation complète de la souche par puces à ADN ou par séquençage.

Toutes les souches reçues pour **expertise résistance** ont bénéficié d'une détermination de la sensibilité aux antibiotiques en diffusion ou en méthode automatisée et une caractérisation spécifique en fonction de la demande du prescripteur avec une augmentation de la demande d'expertise de la sensibilité aux glycopeptides en raison des modifications du CA-SFM/EUCAST.

Le délai de réalisation moyen d'une expertise (hors séquençage) est inférieur à une semaine. Dans le cadre des suspicions de pneumonies nécrosantes, la recherche des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine est réalisée dans un délai de 72H maximum à réception de la souche.

En 2018, nous avons reçu **289** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

2.6 Activités de séquençage

Au cours de l'année de 2018, le CNR des Staphylocoques a poursuivi la montée en charge de l'utilisation du séquençage haut-débit (NGS) dans son activité de routine. Le CNR a utilisé pour cela la plateforme NGS des Hospices Civils de Lyon qui met à disposition 1 séquenceur Illumina Miseq et 2 séquenceurs Illumina NextSeq.

Concernant les analyses bio-informatiques, le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines maison. Il faut noter qu'une bio-informaticienne a été recrutée en avril 2017, sur un poste d'ingénieur hospitalier au sein du CNR pour gérer l'ensemble des analyses et projets NGS.

- **Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?** oui

- Si OUI :

- Type d'accès (interne ou externe au CNR) : plateforme NGS interne des Hospices Civils de Lyon
- Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : Illumina Miseq et NextSeq

- **Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?** oui

- Si OUI :

- Type d'accès (interne ou externe au CNR) : interne
- Outils utilisés pour l'analyse des séquences : le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines.

- **Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?** oui

- Si OUI, pour quelles activités :

- Investigations d'épidémies : OUI (Cf paragraphe alerte)
- Surveillance : OUI (Cf paragraphe surveillance)

- **Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si**

elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles). Les analyse bio-informatiques comprennent les étapes suivantes :

- Analyse qualité et nettoyage des données brutes en utilisant : FastQC v0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), Trimmomatic v0.36², Kraken v0.10.5-beta³ et de nouveau FastQC des données trimées,

- Assignement des souches séquencées à un profil MLST (les systèmes MLST publiques des espèces : *S. aureus*, *S. epidermidis* sont utilisés) en utilisant le logiciel SRST⁴ et les bases MLST publiques à jour (<http://www.mlst.net/databases/>),

- Recherche de variants et construction d'arbres phylogénétiques en utilisant une souche de référence adaptée au complexe clonal étudié et les logiciels Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>), bwa-mem⁵, samtools et bcftools⁶, IGV^{7,8}-

- Détermination in silico du profil des puces ADN de *Staphylococcus aureus*, tel qu'ils sont définis par Alere⁹, en particulier les profils d'entérotoxines et la PVL en utilisant le logiciel Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>) et une base de données des séquences nucléotidiques des gènes utilisés dans les puces d'ADN ;

- Détermination des profils de résistance en utilisant Abricate et les bases de données ResFinder v3¹⁰

- Détermination des profils de virulence en utilisant Abricate et les bases de données VFDB¹¹ et Virulencefinder¹²

- Analyses de génomique comparative en utilisant un workflow d'assemblage : Kmergenie v1.7044, SPAdes v3.10.1¹³ et Quast v4.5¹⁴, suivi des alignements multiples de génomes¹⁵

- Vérification d'insertions et/ou délétions de régions entre souches isogéniques ou des souches mère/filles en utilisant un workflow de mapping de reads : bwa-mem, samtools, bcftools et IGV.

- **Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies** : nombre de séquences réalisées dans l'année. En 2018, 77 souches ont été séquencées dans le cas d'investigation d'épidémies ou de cas groupés. (Cf paragraphe 4.2)

- **Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance** : nombre de séquences réalisées dans l'année et modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées. En 2018, 108 souches ont été séquencées comprenant des *S. aureus* et des *S. epidermidis*. En 2018, le CNR a donc opéré une sélection basée sur un compromis entre l'urgence, l'intérêt épidémiologique, la nécessité de constituer une base de données pertinente pour le CNR. L'objectif pour les *S. aureus* était la surveillance du clone CC152-MSSA-PVL+ qui est le clone PVL+ le plus prévalent en France depuis plusieurs années (Cf paragraphe 3.2.) et pour *S. epidermidis*, l'objectif était la surveillance de la résistance notamment au linézolide et la diffusion des clones multirésistants (Cf paragraphes 3.3.3.3 et 3.5)

² Bolger A et al. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

³ Wood DE and Salzberg SL. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15:R46.

⁴ Inouye, M et al. (2014). SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Medicine*, 6(11), 90.

⁵ Li H and Durbin R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589-595.

⁶ Li H (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27(21):2987-2993.

⁷ James TR et al. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26.

⁸ Helga T et al. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14, 178-192.

⁹ Monecke S et al. (2008). Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *Clin Microbiol Infect*, 14(6), 534-45.

¹⁰ Zankari E et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2640–2644.

¹¹ Liu B et al. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D687-D692.

¹² Joensen KG et al. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52(5): 1501-1510.

¹³ Anton B et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.

¹⁴ Alexey G et al. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*, 29 (8), 1072-1075.

¹⁵ Darling AE et al. (2010). progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS one* 5 (6), e11147.

- Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastaq files) :
 - Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales) : Oui en première intention
 - Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans métadonnées associées. Les séquences deviennent publiques, via des bases de données publiques (ENA ou NCBI), quand elles sont associées à la publication d'articles scientifiques. Dans ces cas, des métadonnées utilisées dans les articles sont aussi associées aux séquences.

3 Activités de surveillance

Éléments clés en termes de surveillance :

- Maintien d'un haut niveau de notification des chocs toxiques staphylococciques
- Stabilisation du nombre de souches d'infections suppuratives avec un fort taux de PVL (>50%)
- Poursuite de l'émergence des CC152 MSSA PVL. Apparition de CC152-MRSA à suivre.
- Augmentation du nombre de souches de staphylocoques résistantes au linézolide
- Tentative de structuration d'un réseau de surveillance conjoint avec le CNR de la résistance aux ATB

3.1 Description du réseau de partenaires

Les souches reçues au CNR des staphylocoques sont envoyées par l'ensemble des CHU, CHG de France métropolitaine mais aussi par un nombre croissant de LABM en 2018 notamment pour l'expertise résistance.

En 2018, le CNR a reçu **2713 souches** pour expertise (virulence et résistance) qui sont bien le reflet de l'épidémiologie de l'ensemble des régions françaises hors protocoles.

Ces souches provenaient de **95 départements métropolitains ou des DROM-COM**. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 30 % (Auvergne Rhône-Alpes), 17 % (Ile de France), 10 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (cf. Figure 2). Quatre pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco et du Luxembourg.

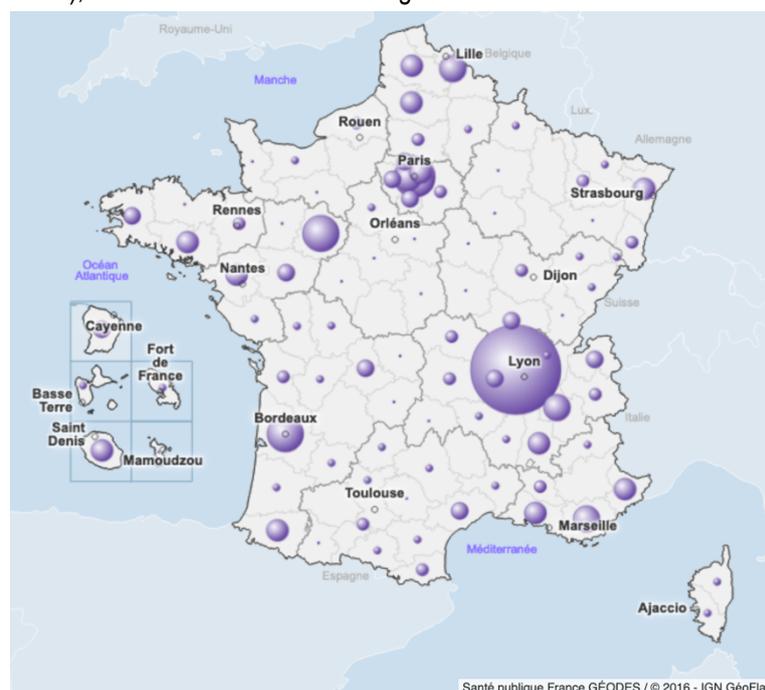


Figure 2- Répartition géographique des souches reçues en 2018 pour expertise (identification, recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques)

Nous avons reçu **289** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé 697 souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et 50 souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

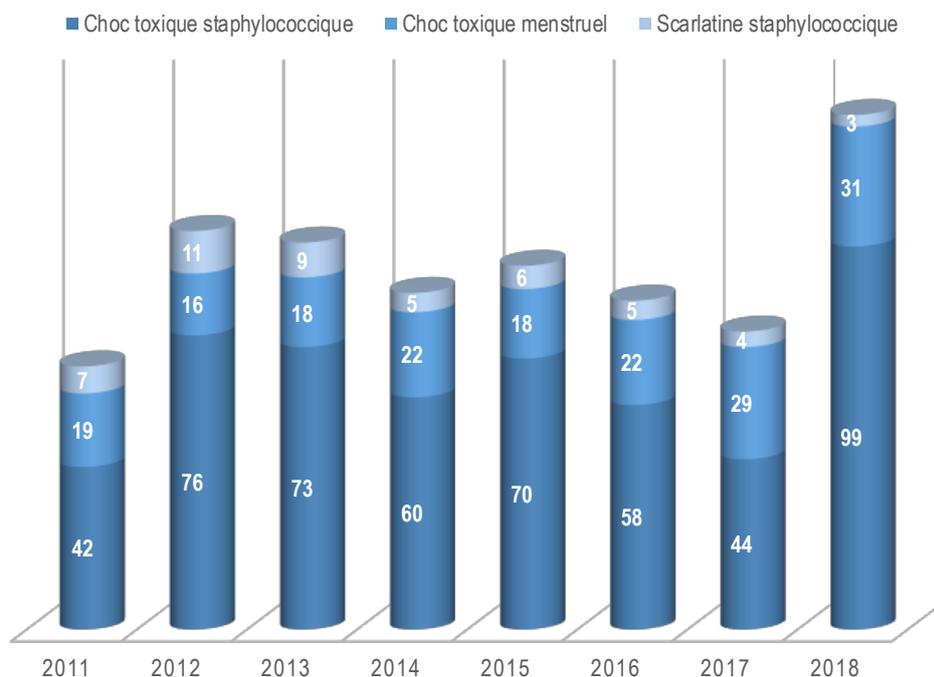


Figure 3- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2011 et 2018.

En 2018, **133 cas de CTS** ont été rapportés, dont **31 cas de CTS menstruels** ; tandis que le nombre de souches associées à un CTS menstruel reste stable par rapport à 2017, celui des CTS non menstruels est plus que doublé, passant de 44 à 99.

Concernant les cas de chocs menstruels, l'âge des patientes s'étend de 13,5 à 51,3 ans avec une médiane de 19,6 ans. Quand l'information est disponible, le pronostic a toujours été favorable. **87,1% des souches analysées possèdent le gène codant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1)**. Parmi les souches pour lesquelles un assignement clonal a été possible (n = 29), 86,2% des souches (n = 25) appartiennent au complexe clonal CC30-MSSA correspondant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. Parmi les 4 souches restantes, on retrouve 1 souche appartenant au complexe clonal CC22-MSSA (TSST-1+), 1 souche au CC45-MSSA (TSST-1+), 1 souche au CC97-MSSA (SEC+) et une souche de CC152-MSSA pourvue de la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) mais sans superantigène. Aucune souche de SARM n'est retrouvée.

Lors de la transmission des résultats à ses prescripteurs, le CNR œuvre pour rappeler les données épidémiologiques à sa disposition, ainsi que les éléments de prévention, y compris par la réalisation de sérologie anti-TSST-1 visant à évaluer le risque de récurrence. Sur 16 sérologies anti-TSST-1 réalisées dans le cadre d'un CTS menstruel, 87,5% révélaient l'absence d'anticorps anti-TSST-1. Il a été rappelé aux prescripteurs que cette absence de séroconversion est associée à un risque accru de récurrence de CTS menstruel et doit conduire à la contre-indication du port de tampons ou coupelles périodiques.

En France, la surveillance des CTS repose sur les données recueillies par le CNR des staphylocoques. Tous les cas de CTS recensés au CNR sont le fait de déclarations spontanées des cliniciens ou des microbiologistes à des fins diagnostiques ou épidémiologiques. Ainsi, depuis que le CNR des staphylocoques recense ces cas, une **augmentation continue des déclarations spontanées** a été enregistrée entre les années 2000 et 2018 (Figure 4). Il n'est cependant pas possible de déterminer si cette augmentation est la conséquence d'une notoriété croissante du CNR, d'une meilleure sensibilisation des médecins à cette maladie ou d'une réelle augmentation de l'incidence de cette pathologie.

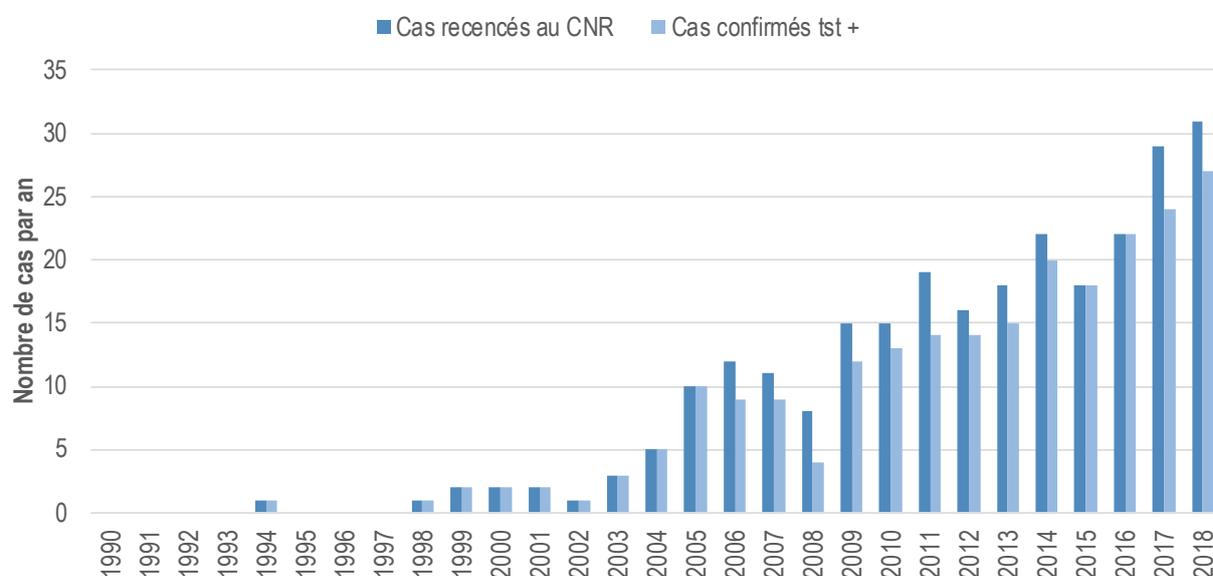


Figure 4– Évolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle (CTS mensuel) entre 1990 et 2018. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tst-1*.

Concernant les chocs non menstruels, le CNR a reçu **98 souches** durant l'année 2018, toutes associées à des chocs survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. 1 souche de *S. epidermidis* résistant à la méticilline a également été expertisée dans le cadre d'une bactériémie associée à choc toxique fatal (mais sans qu'aucun facteur de virulence imputable ne soit détecté). L'âge des patients s'étend de 0 à 86,7 ans avec une médiane d'âge de 54,5 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 2,1. On compte 13,3% de SARM (n = 13) répartis comme suit :

- 3 clones « Lyon » (CC8-MRSA-IV ; clone nosocomial diffusant en France) ;
- 1 clone ST239-MRSA-III (« Vienna/Hungarian/Brazilian Clone », clone nosocomial historiquement le plus prévalent au monde) ;
- 1 clone CC8 ST8-MRSA-[IV+ACME] (PVL+), « USA300 » (clone communautaire épidémique d'Amérique du Nord, rarement isolé en France de cas sporadiques ou de petits foyers épidémiques) ;
- 1 clone CC80-MRSA-IV (PVL+) (clone communautaire parmi les plus prévalent en Europe, Maghreb et Proche-Orient) ;
- 1 clone CC121-MRSA-IV (PVL+) (clone communautaire) ;
- 1 clone ST59-MRSA-V
- 1 clone CC8-MRSA-V
- 1 clone ST8-MRSA-[IVG/E+*ccrAB4*]
- 3 souches pour lesquelles un assignement clonal n'était pas possible

Sur l'ensemble des 98 souches de *S. aureus*, l'analyse de l'équipement toxinique a mis en évidence :

- 26,5% (n = 26) de souches possédant au moins le gène codant la TSST-1 ;
- 22,4% (n = 22) de souches négatives pour le gène codant la TSST-1 mais possédant au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC) ;

- 44,9% (n = 44) de souches ne possédant aucun superantigène majeur ;
- 6,1% (n = 6) de souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine.

En 2018, **trois cas de scarlatine** staphylococcique ont été rapportés. L'âge des patients, tous de sexe masculin, était respectivement de 3,5, 5,9 et 8,1 ans. Ces trois cas sont survenus au décours d'infections cutanées communautaires, et d'une ostéomyélite de la cheville associée à une bactériémie. Chacune des souches possède au moins un gène codant un superantigène (TSST-1, SEA, SEB, SEC). Parmi ces souches on compte 1 CC22-MSSA, 1 CC30-MSSA et un CC45-MSSA.

3.2.2 Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé au total **443 souches** isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **159 cas de maladie exfoliante généralisée** (*staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) ou de *mild* SSSS et **284 cas d'impétigo bulleux** (Figure 5)



Figure 5- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2011 et 2018.

En 2018, le CNR a analysé **84 souches** de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont **20 cas de maladie exfoliante généralisée** et **64 cas d'impétigo bulleux**. On constate donc encore une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR dans le cadre d'impétigo bulleux par rapport à l'année précédente ; tandis que le nombre de souches associés aux syndromes d'exfoliation généralisée semble stable.

Dans la continuité de la collaboration avec le Dr. Pascal Del Giudice, nous avons poursuivi la surveillance d'une forme mineure de la maladie exfoliante généralisée (caractérisée par un exanthème desquamatif du cou, des plis axillaires et périnéaux, un syndrome fébrile et un impétigo facial) associée à des souches porteuses d'exfoliatines. En 2018, nous n'avons pas observé de cas de cette forme mineure de maladie exfoliante généralisée. Les souches transmises au CNR par le Dr. Del Giudice (n = 11) étaient associées à un impétigo bulleux localisé (essentiellement sur le cuir chevelu ou les cuisses), ainsi qu'à des surinfections de lésions de varicelle ou d'eczéma. La surveillance se poursuit.

En 2018, pour les 20 cas de patients ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique classique, l'âge s'étend de zéro à 87,7 ans avec une médiane à 4,4 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1. Les profils toxiques révélaient :

- 8 souches possédant les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB),
- 4 souches seulement pourvues de l'ETA seule,
- 1 souche avec l'ETB seule.

Sept cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes (âgés de 33,9 à 87,7 ans). Pour les cas dont nous disposons des informations cliniques, on retrouve :

- 1 cas d'exfoliation staphylococcique généralisée, survenue chez une femme de 54,1 ans au décours d'une grippe B traitée par oseltamivir. D'abord imputée à une épidermolyse toxique liée à l'oseltamivir, cette exfoliation généralisée a été rattachée à une origine staphylococcique sur arguments anatomopathologiques (biopsie cutanée). L'analyse de la souche de *S. aureus* isolée d'hémocultures a permis d'identifier un clone CC5-MSSA pourvu de l'ETA.

- 1 cas d'impétigo bulleux disséminé, survenu chez un homme de 33,9 ans. L'histoire clinique retrouvait un contage récent avec sa sœur souffrant de varicelle surinfectée par *S. aureus* avec impétigo bulleux. L'analyse de la souche de *S. aureus* isolée d'un prélèvement cutané a permis d'identifier un clone CC121-MSSA pourvu des ETA et ETB.

- 1 cas concomitant survenu chez la compagne du patient ci-dessus, âgée de 34,7 ans, et également associée à un CC121-MSSA pourvu des ETA et ETB.

Parmi les 20 souches associées aux cas de maladie exfoliante généralisée, on compte 1 SARM apparenté au clone CC913-MRSA, pourvu de l'ETA et isolé de lésions bulleuses chez un nouveau-né.

Par comparaison, en 2018, l'âge des 64 patients ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de zéro à 90,6 ans avec une médiane de 10,3 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1,13. L'analyse du profil toxique de ces 66 souches a permis de révéler :

- 14 souches possédant les gènes codant ETA et ETB,
- 17 souches pourvues de l'ETA seule,
- aucune souche possédant l'ETB seule.

Parmi les 64 souches associées aux cas d'impétigo bulleux, on ne retrouvait aucun SARM.

3.2.3 Infections suppuratives à *S. aureus* PVL+

Le CNR reçoit un nombre important de souches dans le cadre d'infections cutanées (hors syndromes d'exfoliation) principalement dans deux contextes :

(i) Isolement de souches de *S. aureus* dans un contexte d'infections récidivantes, d'infections nécessitant un drainage chirurgical ou dans un contexte de diffusion intra-familiale d'infections staphylococciques. Ces souches sont majoritairement sensibles à la méticilline.

(ii) Isolement de souches de *S. aureus* présentant un profil de résistance évocateur de SARM communautaire (SARM-C) qui alerte le bactériologiste et l'incite à adresser la souche au CNR.

Nous recevons, depuis 2011, de nombreuses souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 6). En 2018, on constate une **légère diminution** du nombre de souches reçues en raison de l'efficacité de notre prestation de conseil sur l'intérêt des prescriptions. En effet, il n'est pas nécessaire de faire parvenir au CNR des souches de surinfection ou de colonisation d'escarre-ulcère car l'habillage toxique de ces souches est généralement non contributif et n'entraîne pas de modification de la prise en charge des patients.

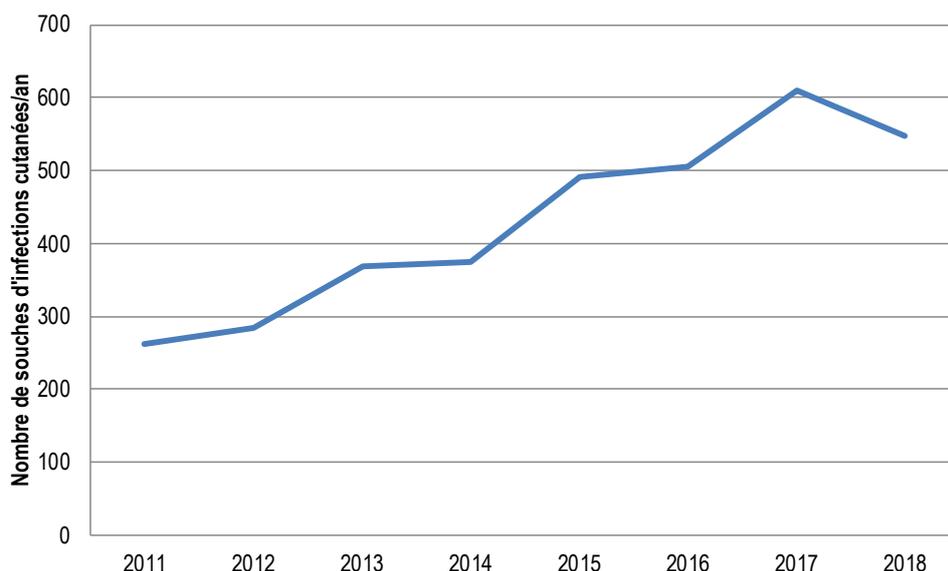


Figure 6- Évolution du nombre de souches reçues dans le cadre d'infections suppuratives (hors épidémies).

Ainsi en 2018, nous avons expertisé **547 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, érysipèle...) hors épidémies. La **proportion de souches PVL+** est de **55%** au total mais de **93,2%** lorsque l'on ne considère que les infections primitives (Figure 7).

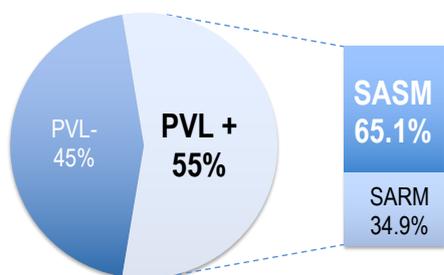


Figure 7- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2018 (n=547).

Parmi les souches PVL+ :

(i) **65,1 % sont des SASM** (Figure 7). On note une grande diversité des clones de SASM PVL. Le clone majoritaire est le **clone CC152-MSSA** (Figure 8a). Nous observons depuis 2013 une augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal. Il n'était qu'en quatrième position en 2013 et représentait moins de 11% des souches de SASM PVL+ alors qu'en 2018, il est en première position et représente 34% des souches de SASM PVL+ responsables d'infections suppuratives toujours en augmentation par rapport à 2017 où il représentait 31% de ces souches.

(ii) **34,9 % sont des SARM** (Figure 7). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés avec évidemment une majorité des clones diffusant actuellement en Europe et en Afrique du nord : le clone ST80 (*agr3*, PVL+, *mecA*+) reste le principal clone identifié de façon stable (25% en 2018, 26% en 2017). Nous observons toujours des cas d'infections avec le clone d'origine Nord-américaine et à diffusion mondiale : le clone USA300 (*agr1*, PVL+, *mecA*+) mais sa prévalence est restée stable au cours des 5 dernières années (Figure 8b). Ces observations de terrain sont en accord avec les modèles bayésiens qui prédisent une stabilité, voire une diminution de la démographie de ces deux clones (Stegger, Mbio 2014, Glaser Mbio 2016).

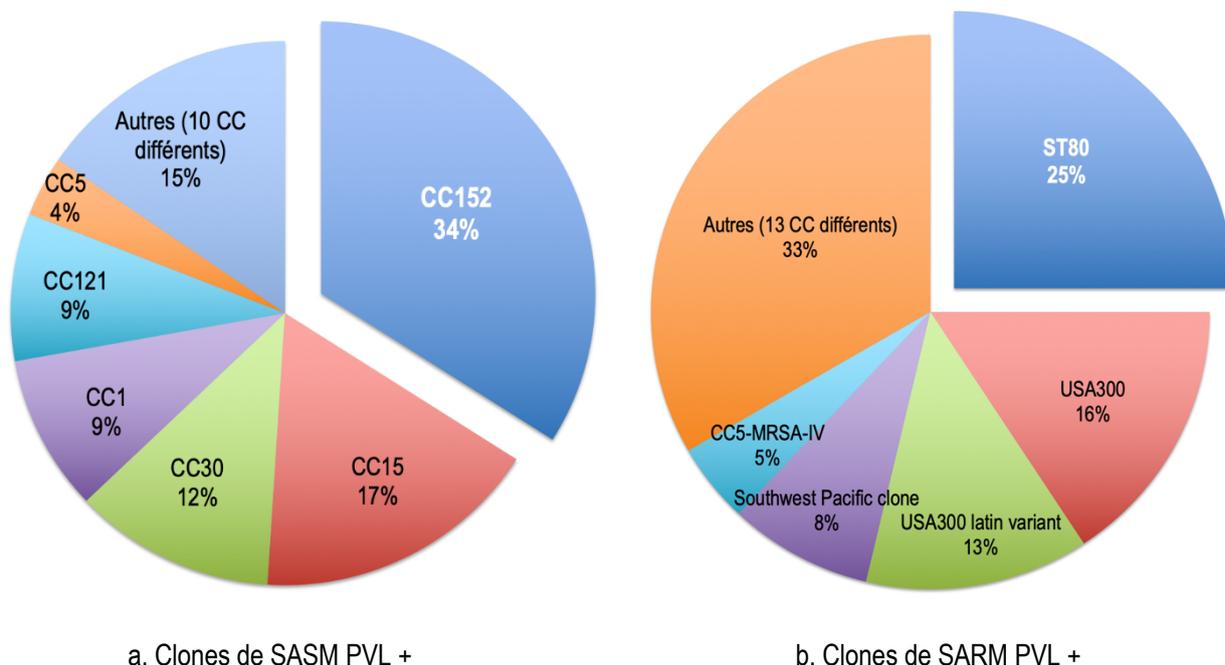


Figure 8- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ (SASM et SARM) responsables d'infections suppuratives en 2018

La proportion relativement faible (16%) du clone USA 300 au sein des souches de SARM isolées d'infections cutanées suppuratives est en accord avec les observations de l'étude Européenne initiée par le CNR français établissant la prévalence des SARM et notamment celle des clones communautaires dans les infections cutanées sévères des patients admis dans les services d'urgence (Bouchiat, JAC 2017) .

Il convient de poursuivre la **surveillance du clone CC152-MSSA PVL+**. En effet, on note une nette augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal qu'il s'agisse d'infections cutanées mais également dans le contexte des pneumonies (cf. 3.2.5). Une étude génomique de ce complexe clonal est en cours afin de mieux comprendre son épidémicité. Par ailleurs, nous observons l'**apparition d'un clone CC152-MRSA PVL +** en France, dont il conviendra de suivre la diffusion.

3.2.4 Furonculoses familiales

En 2018, **78 recherches directes** sur prélèvement des gènes codant la PVL dans un contexte de furonculose familiale ont été effectuées à partir d'écouvillonnage de différents sites de portage (nez, gorge, périnée, anus) à l'hôpital femme/mère/enfant (en collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Yves Gillet, Dr Laure Hees)), pour la détection des porteurs sains ou symptomatiques et vérifier l'efficacité de la décontamination. Le CNR suit notamment les souches isolées à partir des prélèvements positifs afin de surveiller l'acquisition de résistance à la mupirocine et la chlorhexidine lors de protocoles de décontamination répétés. Il n'y a pas eu d'échec de décolonisation, ni d'acquisition de résistance (mupirocine, chlorhexidine) au cours de l'année 2018.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu **64 demandes d'expertise** pour recherche de leucocidine de Panton Valentine dans un contexte d'infections cutanées à diffusion intrafamiliale avec différentes souches d'infections et de portage pour chacun des membres des différentes familles.

3.2.5 Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine

Sur l'année 2018, **256 souches** de *S. aureus* ont été envoyées au CNR dans des contextes de pneumopathies et/ou d'abcès pulmonaires. Parmi ces souches, 71 (27,7%) étaient sécrétrices de PVL tandis que la majorité des souches ne produisaient pas ce facteur de virulence. L'épidémiologie des pneumopathies à *S. aureus* suit parallèlement l'épidémie hivernale de la grippe, comme observé au cours des années précédentes (Figure 9).

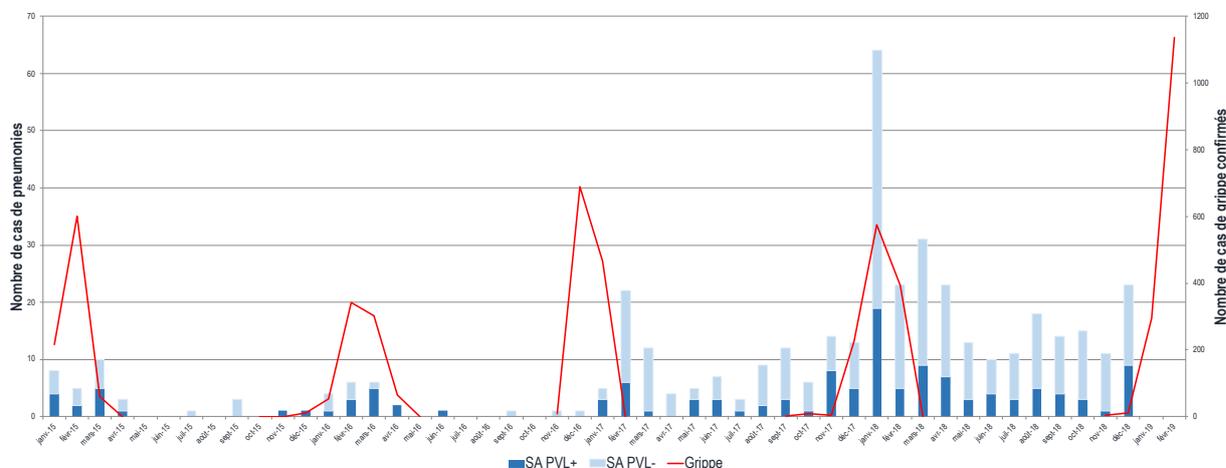


Figure 9. Nombre de souches reçues au CNR dans un contexte de pneumopathie et/ou d'abcès pulmonaires, sécrétrices ou non de PVL en fonction de l'épidémie grippale hivernale.

A noter que le nombre de cas de grippe rapporté représente les cas confirmés par le CNR de la grippe (Lyon) mais reflètent les tendances nationales.

L'augmentation du nombre de souches de *S. aureus* observée dans la figure 9 est liée à une comptabilisation de l'ensemble des souches reçues au CNR dans des contextes de pneumopathies et/ou d'abcès pulmonaires. Avant janvier 2017, seuls les cas inclus dans le PHRC étaient comptabilisés, expliquant cette différence importante du nombre de souches sur 2017 et 2018. Ainsi ces données ne doivent pas être interprétées comme une augmentation de l'incidence des pneumopathies communautaires à *S. aureus*.

En 2018, la proportion de SARM entre les souches produisant la PVL et celles ne la produisant pas est similaire (Figure 10), contrairement à la tendance observée en 2017 qui montrait plus de SARM chez les souches productrices de PVL (environ 12%).

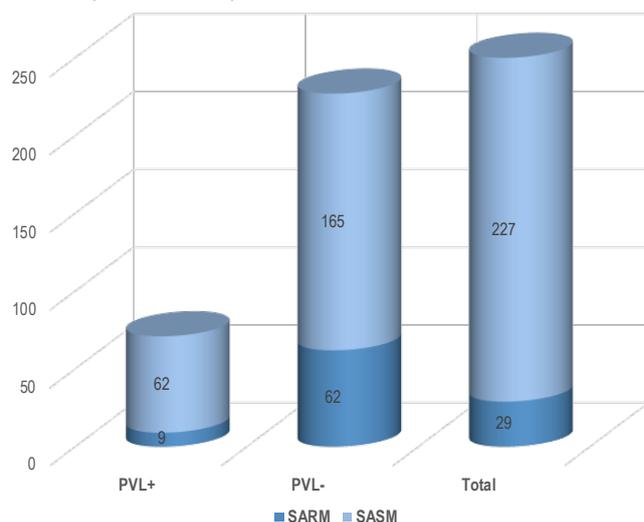


Figure 10. Proportion de SASM et de SARM au sein des souches sécrétrices ou non de la leucocidine de Panton Valentine, parmi les souches isolées dans un contexte de pneumonie en 2018.

Concernant les clones de *S. aureus* impliqués dans les pathologies PVL+, le clone de SARM majoritaire est le clone CC-152-MSSA. Ce clone, émergent en France, est le clone le plus impliqué dans la majorité des pathologies en France (bactériémies, pneumonies nécrosantes, autres) (Figure 11).

A noter en 2018, un cas de **transmission intrafamiliale** de pneumonie nécrosante entre une mère et sa fille lié à une souche sécrétrice de PVL+ (clone CC15-MSSA).

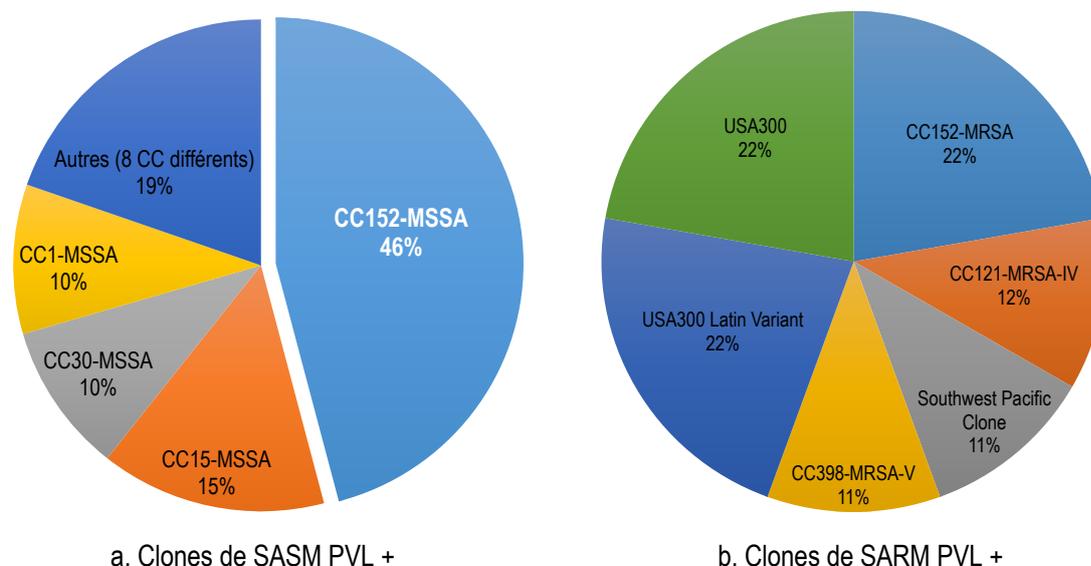


Figure 11. Caractéristiques des clones de SARM et SARM PVL + responsables de pneumonies en 2018

Concernant les clones de *S. aureus* PVL- (SARM et SARM confondus) retrouvés dans les pneumonies sévères PVL-, l'épidémiologie correspond aux clones retrouvés largement en France dans d'autres pathologies avec notamment les clones CC398 et CC45 pour les SARM et les grands clones nosocomiaux diffusant en France pour les SARM comme le clone Lyon (Figure 12).

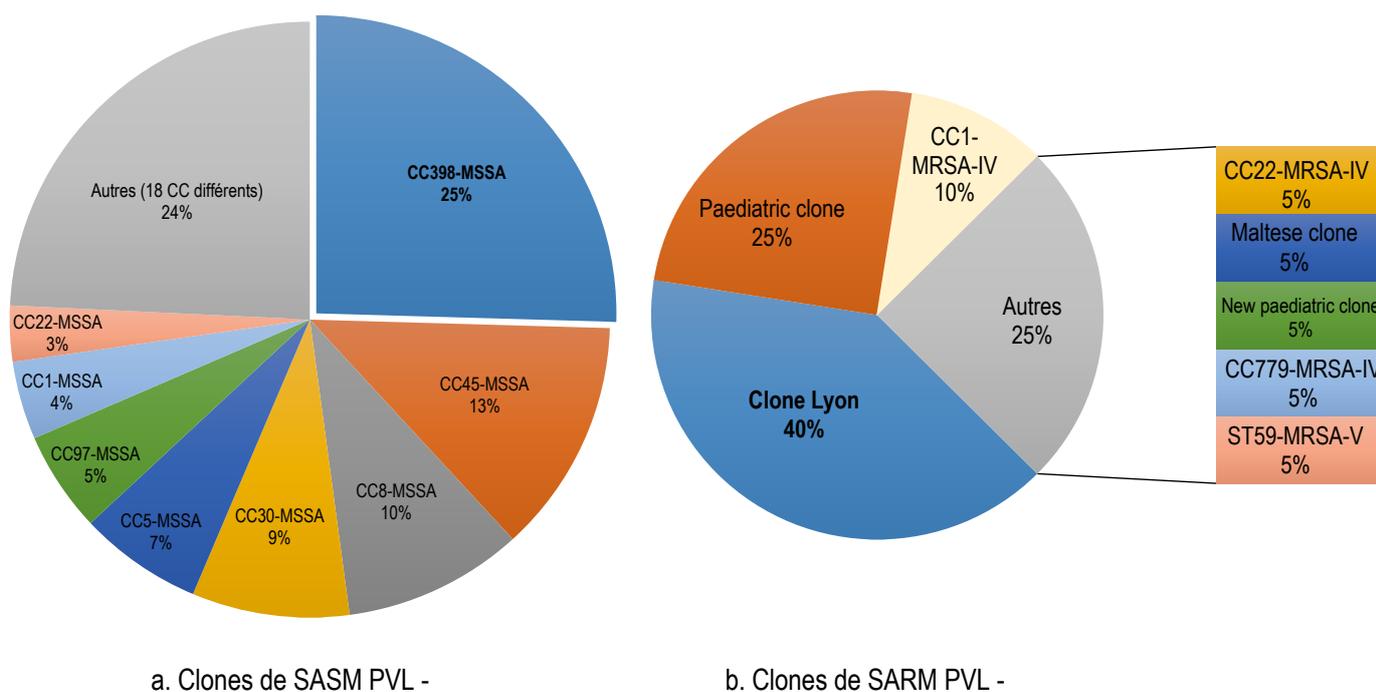


Figure 12. Caractéristiques des clones de SARM et SARM PVL - responsables de pneumonies en 2018

3.2.6 Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Dans le cadre de ses missions, le CNR participe à l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives. En 2018, le CNR a été contacté dans le cadre d'1 TIAC mais le volume d'échantillon de vomissure reçu était insuffisant pour permettre l'analyse.

3.2.7 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2011, nous avons expertisé **606 souches d'infections** ostéo-articulaires (exclus les « pieds diabétiques » sans ostéite). En 2018, nous avons reçu 183 souches de Staphylocoques, dont 135 *S. aureus*, isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire (Figure 13).

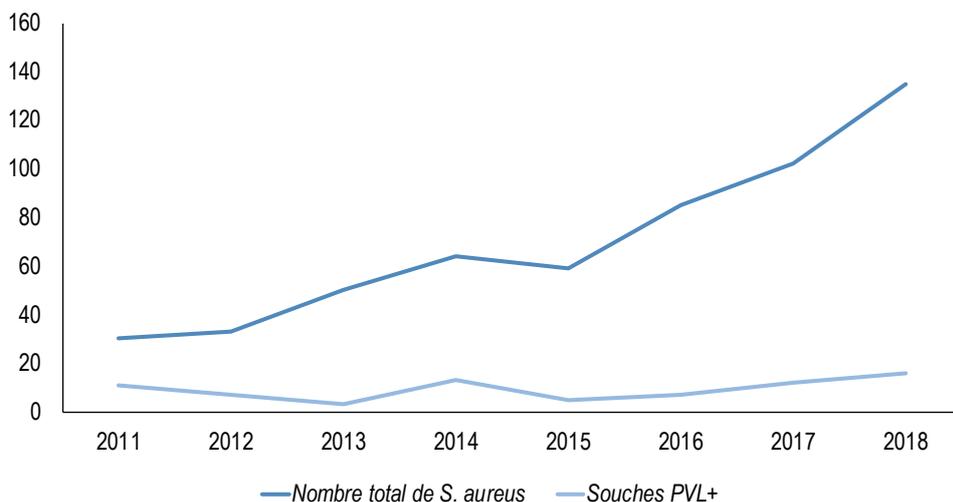


Figure 13- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour infections ostéo-articulaires entre 2011 et 2018.

Les patients étant âgés de 0,5 à 95,7 ans (médiane d'âge 63,8 ans) avec un sexe ratio ♂/♀ de 2,1. Parmi les souches de *S. aureus*, 33 étaient des SARM (Figure 14).

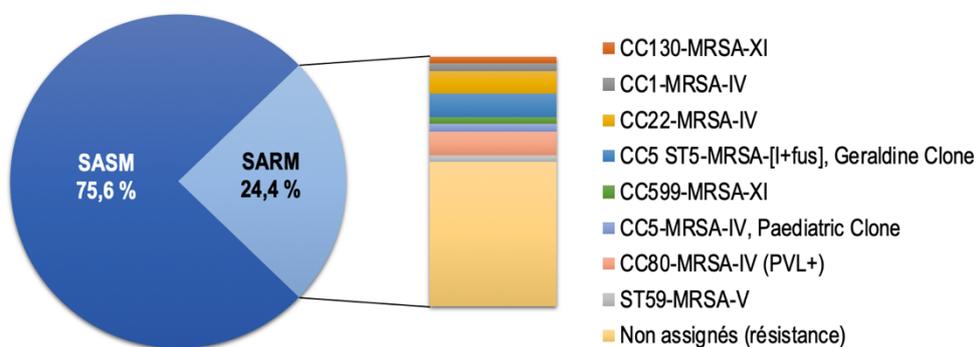


Figure 14- Caractéristiques des *S. aureus* responsables d'infections ostéo-articulaires en 2018 (n=135).

Les tableaux cliniques incluent des ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèses de genou, de hanche... Parmi ces infections diverses, la part des souches porteuses de la leucocidine de Pantón-Valentine (PVL) s'élevait à 11,9% (n = 16) qui appartiennent aux complexes clonaux suivants :

- CC15-MSSA (n = 4)
- CC121-MSSA (n = 3)
- CC80-MRSA-IV (n = 3)
- CC5-MSSA (n = 1)

Caraïbes (Figure 16). De plus, cette étude montre l'existence de 3 clades, 1 clade MSSA ancestral d'origine européenne (schématiquement en vert entre 10h et 11h sur la figure 16), et deux clades avec un grand succès : un clade MRSA PVL + (en rouge entre 11h et 2h) et un deuxième clade MSSA PVL+ (en vert entre 2h et 10h) avec une distribution géographique très large sans structuration spatiale. C'est à ce dernier clade MSSA qu'appartiennent les souches CC152-MSSA PVL+ collectées par le CNR depuis 1999. Une seule exception a été observée pour une souche isolée en 2014 en France Métropolitaine.

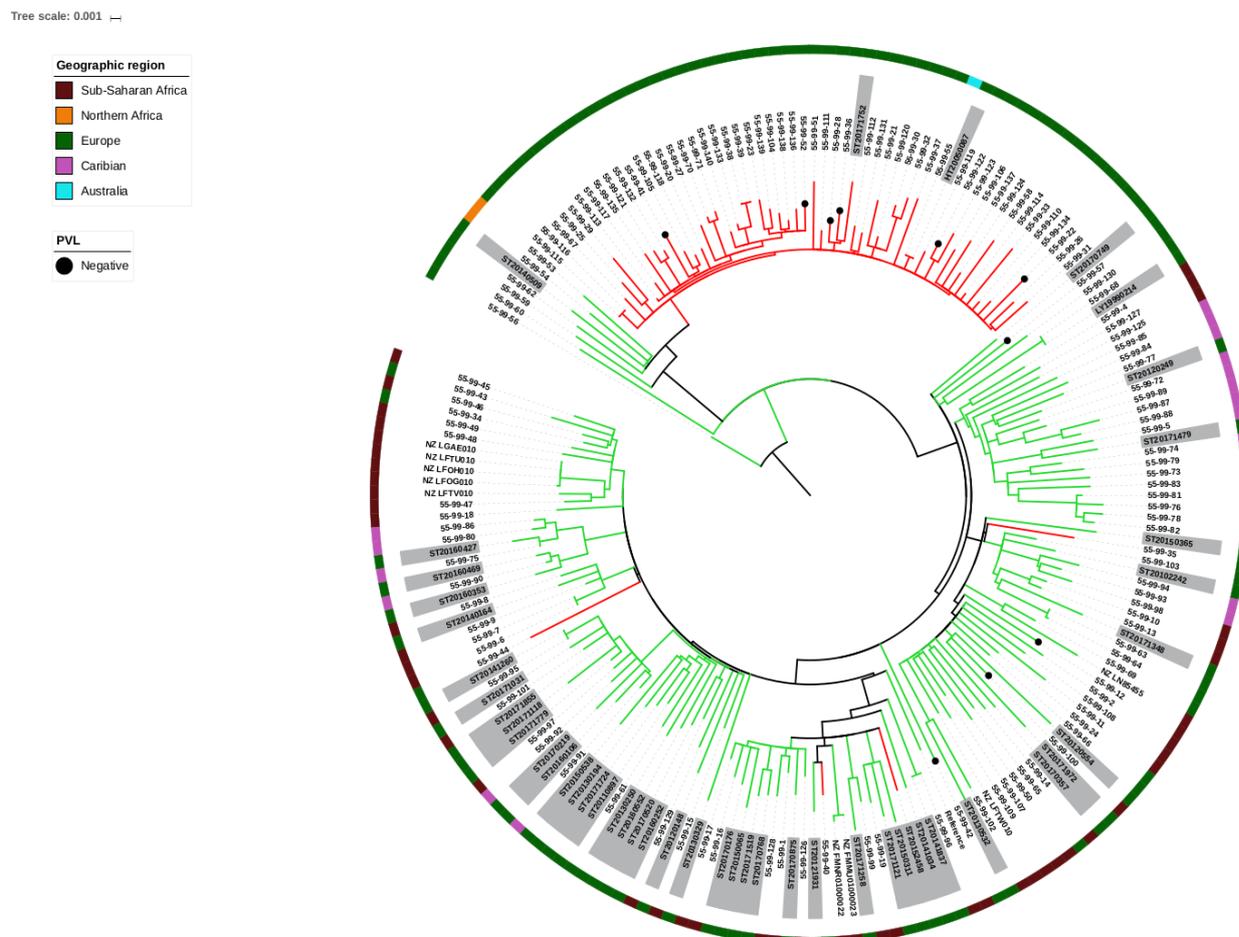


Figure 16. Phylogénie de 197 souches CC152-MSSA et CC152-MRSA PVL+, incluant les 48 souches Françaises et 149 isolats de 28 pays différents sur une période de 17 ans. Les souches du CNR sont indiquées en gris. Les branches rouges indiquent les SARM et les branches vertes indiquent les SASM.

Le CNR continue le suivi de la diffusion de ce clone et depuis 2018 ; nous observons l'apparition en France, de souches appartenant au **CC152-MRSA PVL+** dont il convient également de surveiller la diffusion dans les prochaines années.

3.2.9 Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année **2018**, **31 sérums ont été adressés au CNR** pour sérologie anti-PVL (leucocidine de Pantone-Valentine) et/ou anti-TSST-1 (toxine du choc staphylococcique), versus 46 en 2017. Cette diminution est à associer en partie à la fin du PHRC Pneumonies Nécessaires, au cours duquel des sérologies anti-PVL étaient réalisées quasi-systématiquement en parallèle des prélèvements bactériologiques, même si la culture était positive à *S. aureus* PVL-positif (alors que dans ce cas, cela ne présente pas d'intérêt diagnostique mais visait, dans le PHRC, à déterminer le rôle d'une immunité préexistante comme facteur de protection contre les infections sévères liées à la PVL). Cette diminution est également probablement liée à un manque d'informations claires sur les indications et l'intérêt de ces sérologies. Pour y palier, le CNR souhaite en 2019 mettre à jour son site Internet et mieux préciser la position de ces sérologies dans le diagnostic et le suivi des infections staphylococciques à composante toxinique.

Cinq demandes, en provenance de cinq hôpitaux différents, concernaient une **sérologie PVL**, trois dans le cadre de pneumonies d'allure nécrosante, une dans le cadre d'une furonculose sévère récidivante et une dans un contexte de choc septique avec un foyer infectieux cutané. Ces cinq sérums se sont révélés négatifs, le taux de positivité étant fixé à >4900 UA/mL (taux entre 200 et 2700 UA/mL).

Concernant les trois patients présentant un tableau pulmonaire, nous n'avons reçu qu'un sérum prélevé précocement après le début des symptômes, ce qui ne permet pas d'interpréter la sérologie puisque le délai était trop court pour qu'une séroconversion ait pu avoir lieu. Cependant, pour deux d'entre eux, la souche de *S. aureus* responsable du tableau infectieux a été isolée et était en fait PVL-négative.

Concernant le patient présentant un tableau de choc septique, nous n'avons également reçu qu'un sérum prélevé précocement après le début des symptômes, ce qui ne permet pas d'interpréter la sérologie de manière fiable. Cependant, le tableau clinique était plutôt en faveur d'un choc toxique lié à une toxine superantigénique mais ce diagnostic n'a pu être confirmé en l'absence de culture de la bactérie responsable.

Enfin, concernant la patiente présentant une furonculose récidivante, la sérologie a été réalisée cinq mois après le début des symptômes. La négativité de la sérologie (1700 UA/mL) peut s'expliquer par le fait qu'il s'agissait d'une infection superficielle. Il faut rappeler que dans ce contexte, le diagnostic repose avant tout sur l'isolement de la souche infectante de *S. aureus* et la recherche des gènes codant la PVL.

Vingt-huit sérologies TSST-1 ont été effectuées pour 21 prescripteurs différents. Elles concernaient 19 patients (dont 15 femmes) et étaient négatives dans 82% des cas (n=23). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) dans 21 cas (75%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) dans 7 cas (25%).

Les sérums en contexte de **MTSS** (reçus pour 13 patientes) étaient séronégatifs pour TSST-1 dans 18 cas sur 21 et très faiblement positifs dans deux cas (très inférieur à la valeur de la population générale, ce qui ne permet pas d'écarter une réaction croisée et donc une sérologie faussement positive), soit 95% des cas au total. Concernant les résultats faiblement positifs, a) pour une patiente, le taux d'anticorps détecté à 146 UA/mL un mois après l'épisode de choc toxique, qui avait été traité par immunoglobulines polyclonales (Tégéline®) et antibiotiques, représentait probablement les immunoglobulines résiduelles et laissait supposer que la patiente était séronégative vis-à-vis de la TSST-1 et n'avait pas séroconverti suite à l'épisode de choc toxique (ceci a été confirmé par l'analyse d'un nouveau sérum prélevé 10 mois après le choc et qui était bien négatif en anticorps anti-TSST-1) ; b) pour une autre patiente, le sérum prélevé à six semaines du choc présentait un taux d'anticorps de 140 UA/mL, ce qui est très faible par rapport à la moyenne dans la population générale (1000 UA/mL) et pourrait être lié à une réaction faussement positive à cause de l'aspect très hémolysé du sérum reçu (pour cette patiente, nous n'avons pas reçu de sérum de contrôle pour confirmation). Le seul sérum positif en contexte de MTSS concernait une patiente ayant un taux d'anticorps positif à 1060 UA/mL trois mois après l'épisode de choc. Dix patientes ayant développé un choc toxique menstruel avant ou pendant l'année 2018 ont bénéficié de prélèvements itératifs tardifs (> trois semaines après l'épisode de choc) pour recherche de séroconversion ; aucune augmentation d'anticorps n'a été observée chez neuf d'entre elles (90%), en accord avec l'hypothèse selon laquelle les patientes séronégatives ayant développé un MTSS sont séronégatives majoritairement en raison d'une incapacité à développer tout anticorps neutralisant contre la TSST-1. Cependant, cela montre que certaines patientes présentent des anticorps à long terme : une patiente sur les dix présentait un taux d'anticorps proche de celui de la population générale (1060 UA/mL) trois mois après le choc toxique. Il faut cependant noter que nous ne savons pas si ces anticorps sont protecteurs contre une récurrence de MTSS.

Les sérums en contexte de **NMTSS** étaient séronégatifs dans cinq cas sur sept (71%). Ils correspondaient à 6 patients (dont seulement un avait une documentation bactériologique à *S. aureus* ; la souche a été analysée au CNR et ne possédait pas la TSST-1). Aucun de ces patients n'a bénéficié de prélèvements itératifs : pour quatre patients, l'absence de souche de *S. aureus* isolée et l'absence de sérum tardif permettant d'objectiver une séroconversion anti-TSST-1 ne permettent donc pas de conclure sur la possibilité d'un choc toxique non menstruel. Dans ces cas, une sérologie isolée anti-TSST-1 est souvent non contributive pour le diagnostic d'une toxémie à TSST-1. Pour un patient (enfant de 9 ans qui présentait une voussure amygdalienne avec infiltration parapharyngée et rash scarlatiniforme), la

sérologie réalisée 12 jours après le début des symptômes a montré un taux élevé d'anticorps (53 800 UA/mL). Ce résultat était donc compatible avec un épisode de toxémie à TSST-1 ; cependant, l'absence de sérum antérieur ne permettait pas d'affirmer une séroconversion.

L'ensemble des demandes de sérologie TSST-1 émanait de **21 prescripteurs différents**, répartis sur tout le territoire national (principalement des CHU). Ce nombre de prescripteurs est stable par rapport à 2017 mais est assez limité. Il nous incite à mieux diffuser l'information autour de ces sérologies et notamment leurs indications et leurs apports en termes de prise en charge du patient.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

3.3.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Au total, **627 souches** ont été adressées au CNR en 2018 pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques, en provenance de 159 laboratoires et/ou prescripteurs différents. Ceci représente une **augmentation de 55 % par rapport à l'année 2017** (408 souches) (Figure 17). Cette augmentation des demandes de détermination de la sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques, constante depuis 2015, s'explique par plusieurs phénomènes :

- l'émergence de souches de staphylocoques multirésistantes offrant des options thérapeutiques réduites (notamment souches résistantes au linézolide),
- la mise sur le marché récente de nouvelles molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole, le tédizolide ou la dalbavancine pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des techniques permettant de tester la sensibilité des souches de staphylocoques,
- les modifications importantes depuis 2015 des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie qui ont été harmonisées avec celles de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CA-SFM/EUCAST), entraînant une hausse des demandes d'expertise et de conseils sur la réalisation et l'interprétation des différents tests décrits par le CA-SFM/EUCAST notamment pour la détermination de la sensibilité aux glycopeptides,
- des problèmes de performances de détection de la résistance à la méticilline avec l'automate Vitek2® (bioMérieux) en 2017-2018 qui ont conduit de nombreux laboratoires à nous envoyer des souches pour confirmer ou infirmer les résultats qu'ils avaient obtenus.

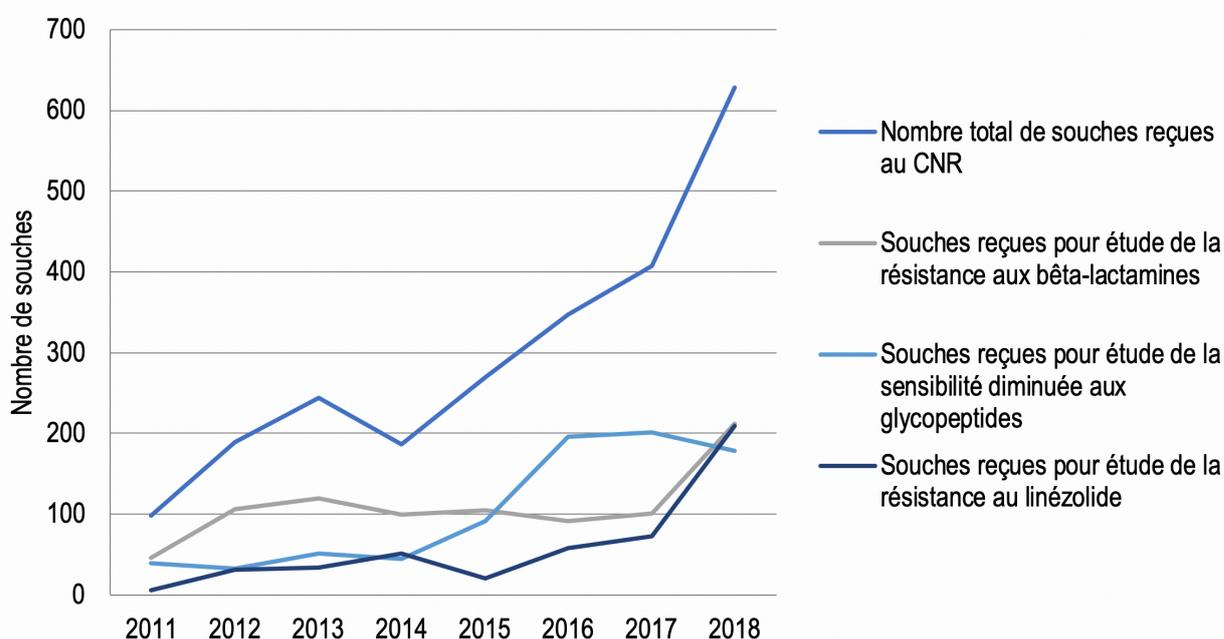


Figure 17. Souches reçues au CNR pour expertise de la **résistance aux antibiotiques** entre 2011 et 2018.

En 2018, les souches expertisées au CNR pour la résistance comprenaient 516 demandes extérieures et 111 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon. La répartition de ces souches par espèce est décrite dans le tableau 1.

Tableau 1. Répartition selon l'espèce des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques en 2018.

Espèce	Nombre de souches reçues (%)
<i>S. aureus</i>	291 (46,4)
<i>S. capitis</i>	19 (3,0)
<i>S. cohnii</i>	1 (0,2)
<i>S. epidermidis</i>	255 (40,7)
<i>S. haemolyticus</i>	22 (3,5)
<i>S. hominis</i>	9 (1,4)
<i>S. lugdunensis</i>	7 (1,1)
<i>S. pasteurii</i>	2 (0,3)
<i>S. pettenkoferi</i>	3 (0,5)
<i>S. saprophyticus</i>	13 (2,1)
<i>S. simulans</i>	1 (0,2)
<i>S. warneri</i>	4 (0,6)
Total	627

En plus de ces demandes, toutes les souches de *S. aureus* isolées chez des patients mucoviscidosiques aux Hospices Civils de Lyon sont conservées au CNR pour vérification de la sensibilité aux glycopeptides ou réalisation de l'antibiogramme lorsque les souches montrent une croissance difficile (99 souches pour l'année 2018).

3.3.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Les souches sont catégorisées phénotypiquement sensibles, intermédiaires ou résistantes pour les différents antibiotiques testés en utilisant les concentrations critiques établies dans le communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2018 (CA-SFM/EUCAST).

Pour certaines familles d'antibiotiques, des méthodes moléculaires permettent de rechercher le support génétique de la résistance et de confirmer ou pallier les défauts des méthodes phénotypiques dans le cas de résistances peu ou pas exprimées *in vitro* ou de résistance hétérogène.

Les techniques utilisées au CNR sont détaillées en Annexe 2.

3.3.3 Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances

3.3.3.1 Résistance aux bêta-lactamines

Les PCR *mecA* et *mecC* sont réalisées systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR. Le CNR est en outre spécifiquement sollicité sur la base de problèmes concernant la détection/confirmation de la résistance aux bêta-lactamines, principalement la résistance à la méticilline. En 2018, **212 souches** ont été étudiées dans ce contexte : 199 souches pour une demande de confirmation de sensibilité/résistance à la méticilline, 3 souches pour recherche de production de bêta-lactamase et 10 souches pour demande de confirmation de sensibilité/résistance à la ceftaroline ou au ceftobiprole (céphalosporines de dernière génération actives sur les souches résistantes à la méticilline).

Recherche de pénicillinase

Les **3 souches** reçues pour recherche de pénicillinase étaient deux souches de *S. aureus* et une souche de *S. saprophyticus*. Les 3 souches étaient négatives pour les gènes *mecA/C* et étaient donc sensibles à la méticilline.

Les 2 souches de *S. aureus* (isolées du même patient) ne possédaient pas de gène *bla* détecté en puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere technologies) et avaient un diamètre d'inhibition pour la pénicilline G supérieur au diamètre critique (26 et 30 mm) avec une bordure de la zone d'inhibition floue. Nous pouvons donc supposer que ces 2 souches ne produisaient pas de pénicillinase. Cependant, devant la subjectivité de l'aspect flou/net de la bordure et la difficulté à mettre en évidence les pénicillinases des staphylocoques, il convient de toujours conseiller aux cliniciens l'utilisation de pénicillines anti-staphylococciques (oxacilline) ou de bêta-lactamines associées à un inhibiteur de pénicillinase (amoxicilline + acide clavulanique).

Concernant la souche de *S. saprophyticus*, le laboratoire expéditeur avait obtenu une discordance entre le disque d'ampicilline 2 µg (recommandations CA-SFM 2018) pour lequel la souche apparaissait sensible et le disque de pénicilline G pour lequel la souche apparaissait résistante (alors que ces 2 antibiotiques devraient fournir la même réponse, voir recommandations CA-SFM 2018)). Il n'existe pas de méthode fiable de détection de la production de pénicillinase pour les espèces autres que *S. aureus*. Comme indiqué par le CASFM-EUCAST, la sensibilité à la pénicilline ne doit pas être rendue pour les staphylocoques non-*aureus*.

Résistance à la méticilline

Les 199 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient **166 souches de *S. aureus*** et **33 souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN)**.

Tableau 2. Bilan des souches reçues au CNR en 2018 pour vérification de la résistance à la méticilline et des résultats obtenus au CNR sur ces souches.

	<i>S. aureus</i>	SCN
Souche <i>mecA</i> +	59	12
Souche <i>mecC</i> +	10	0
Souche sensible à la méticilline	97	21
Total	166	33

Concernant les souches de ***S. aureus***, il s'agissait de :

- **67 souches** faisant partie d'une étude particulière menée au laboratoire de bactériologie des HCL sur les problèmes de détection de la résistance à la méticilline par l'automate Vitek2® (bioMérieux) (cf paragraphe 4.2.4. Alerte Vitek). Durant cette étude, toutes les souches de *S. aureus* présentant en automate Vitek2® une discordance entre la CMI oxacilline et le test céfoxitine ou une discordance entre les résultats du Vitek® et une autre méthode permettant de détecter la résistance à la méticilline (immunochromatophilie PLP2a, diffusion) étaient transmises au CNR pour réalisation d'une PCR *mecA/mecC*. Sur ces 67 souches, 31 étaient bien des SARM *mecA*+, une souche possédait le gène *mecC* et était donc également bien résistante à la méticilline. Les 35 autres souches ne possédaient aucun gène *mec* et étaient sensibles à la méticilline.

- **80 souches** de *S. aureus* pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence ou absence de gène *mec*. Il s'agissait en général de i) confirmation de la méticillino-résistance pour des souches exprimant la résistance à l'oxacilline de manière hétérogène ou, ii) de confirmation de la sensibilité à la méticilline pour des souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la CMI oxacilline ou le diamètre de la céfoxitine était proche des valeurs critiques, ou iii) pour des souches avec des profils de résistance moins habituels (souches phénotypiquement sensibles à la méticilline mais multirésistantes aux autres antibiotiques, ou résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones et/ou macrolides), ou iv) des souches avec des résultats discordants entre deux techniques (antibiogramme en milieu liquide vs en diffusion, antibiogramme vs méthodes moléculaires ou méthodes immunochromatographiques) ou entre le test céfoxitine et la CMI oxacilline en automate Vitek2®. Sur ces 80 souches, 25 possédaient le gène *mecA* et les 55 autres ne possédaient aucun gène *mec*.

- **16 souches** de *S. aureus* adressées au CNR pour recherche de gène *mecC*. Cette demande était motivée (i) par une alerte du système expert d'analyse des antibiogrammes qui incitait à rechercher la présence du gène *mecC* devant un antibiogramme pouvant faire suspecter ce type de souche (notamment des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline mais multisensibles aux autres classes d'antibiotiques), (ii) par des souches résistantes à la méticilline sur l'antibiogramme mais une recherche de PLP2a ou de gène *mecA* négative. Neuf de ces souches se sont révélées

porteuses du gène *mecC*. Sur les 7 autres souches, deux étaient en fait porteuses du gène *mecA*, et 5 se sont avérées être sensibles à la méticilline. Les 9 souches *mecC*-positives ont été isolées à Castres, Colmar, Dunkerque, Elbeuf, Lorient, Montpellier (n=2) et Paris (n=2). Sept de ces souches appartenaient au complexe clonal CC130 qui est le clone *mecC*+ le plus courant en Europe ; les 2 autres souches appartenaient aux complexes clonaux CC1943 et CC599.

- **deux souches** de *S. aureus* présentant une discordance dans le laboratoire expéditeur entre les résultats phénotypiques et la technique de biologie moléculaire GeneXpert MRSA. Pour une souche, elle avait été détectée phénotypiquement résistante à la méticilline mais négative pour le gène *mec* en GeneXpert : au CNR, elle s'est révélée *mecA*- et *mecC*- négative mais était finalement phénotypiquement sensible à la méticilline, ce qui est donc concordant avec les résultats moléculaires. Pour l'autre souche, elle était phénotypiquement résistante à la méticilline mais présentait un profil discordant en GeneXpert : *mecA* positif, jonction SCC négative. L'analyse par puce à ADN a révélé que cette souche possédait une cassette *SCCmec* composite comprenant une recombinaison additionnelle *ccrAB4* pouvant expliquer que les amorces du GeneXpert ne détecte pas la jonction SCC chez cette souche ; la positivité de la PCR *mecA* sur souche doit cependant la faire considérer comme un SARM.

- **une souche** de *S. aureus* isolée chez un patient présentant un échec de traitement d'endocardite infectieuse par cloxacilline puis céfazoline : cette souche ne possédait aucun gène *mec* et s'est avérée sensible à la méticilline (aucun phénotype lié à la résistance ne pouvait donc expliquer l'échec clinique).

Concernant les souches de **staphylocoques à coagulase négative** expertisées, il s'agissait de :

- **14 souches** de *S. saprophyticus* et *S. lugdunensis*. Les souches appartenant à ces deux espèces présentent fréquemment des CMI élevées ou limites pour l'oxacilline et la céfoxitine car ces espèces ont naturellement des CMI pour les bêta-lactamines plus élevées que les autres espèces de staphylocoques. Néanmoins les souches véritablement résistantes à la méticilline avec présence du gène *mecA* sont rares. Lorsque les diamètres ou les CMI céfoxitine ou oxacilline rendent un résultat douteux ou discordant pour ces espèces, il est nécessaire de confirmer la présence d'une PLP additionnelle ou d'un gène *mec*. C'est dans ce contexte que nous avons reçu ces souches : 7 souches étaient positives en PCR *mecA* (4/7 *S. saprophyticus*, 3/7 *S. lugdunensis*), et les 7 autres étaient négatives pour *mecA* et *mecC* et étaient donc sensibles à la méticilline.

- **19 souches** de staphylocoques à coagulase négative appartenant à d'autres espèces (*S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pettenkoferi*, *S. simulans*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : 5 possédaient le gène *mecA* (PCR positives) et étaient donc résistantes à la méticilline.

Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole

La ceftaroline et le ceftobiprole sont deux céphalosporines de dernière génération mises sur le marché au cours de la dernière décennie et qui présentent un spectre d'activité original incluant les souches de staphylocoques résistantes à la méticilline. Le CA-SFM a proposé des diamètres critiques avec un inoculum de 0,5 McF et un disque chargé à 5 µg pour *S. aureus*. Néanmoins en cas de diamètre détectant une potentielle résistance, celle-ci doit être vérifiée par mesure de la CMI. Des concentrations critiques ne sont proposées par le CA-SFM que pour *S. aureus* (1-2 mg/L pour la ceftaroline, 2 mg/L pour le ceftobiprole) ; pour les SCN, en l'absence de données spécifiques, nous sommes amenés à utiliser les mêmes concentrations critiques mais les résultats sont à interpréter avec précaution.

En 2018, la détermination de la CMI **ceftaroline** ou la confirmation d'une résistance détectée par le laboratoire expéditeur ont été demandées pour **7 souches** résistantes à la méticilline : **4 souches de *S. aureus*** (3 étaient sensibles à la ceftaroline, avec des CMI comprises entre 0,75 et 1 mg/L et une était résistante avec une CMI à 2 mg/L), **2 souches de *S. haemolyticus*** (résistantes avec des CMI obtenues à 1,5 et 2 mg/L) et **1 souche de *S. epidermidis*** (sensible avec une CMI à 0,38 mg/L). Concernant la souche de *S. aureus* résistante à la ceftaroline, le séquençage du gène *mecA* a mis en évidence deux mutations (T524G et C616T) qui pourraient expliquer la perte de sensibilité à cet antibiotique via des modifications de sa cible, la PLP2a.

Trois souches de *S. epidermidis* ont été envoyées pour vérification de la CMI du **ceftobiprole** : une était sensible (CMI 2 mg/L) ; les 2 autres apparaissaient résistantes avec une CMI à 3 mg/L si nous utilisons les mêmes breakpoints que pour *S. aureus*.

3.3.3.2 Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

En 2018, l'étude de la sensibilité aux glycopeptides a été effectuée pour **178 souches de staphylocoques** provenant de laboratoires extérieurs (95 *S. aureus* et 83 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié par des CMI élevées aux glycopeptides ($> 1\text{ mg/L}$) ou un test de dépistage des hGISA (*heterogeneous glycopeptide intermediate S. aureus*) positif (le plus souvent le test Teico5). Les nouvelles recommandations du CA-SFM/EUCAST ont abaissé depuis 2015 les CMI à partir desquelles cette recherche doit être effectuée, ce qui est à l'origine de l'augmentation du nombre de demandes reçues par le CNR. De plus, le CA-SFM recommande la réalisation de CMI en microdilution (et plus en bandelette de gradient de concentration). Or tous les laboratoires ne sont pas équipés pour réaliser cette technique, ce qui les conduit à faire plus souvent appel au CNR. Il faut également noter qu'à la demande du CNR, le CASFM a modifié et simplifié, dans sa version v2.0 de 2018, la détermination de la sensibilité aux glycopeptides pour les staphylocoques en supprimant les tests de dépistage des hGISA qui manquent de sensibilité et de spécificité et donnent des résultats médiocres s'ils ne peuvent être confirmés par la méthode de référence qui est l'analyse de population.

Sur les **95 souches de *S. aureus*** reçues dans ce contexte, 12 souches (12,6%) ont été confirmées comme présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type hGISA selon la méthode de référence recommandée par le CA-SFM/EUCAST qui est l'analyse de population (APOP). Une de ces 12 souches hGISA était également résistante à la daptomycine avec une CMI à 1,5 mg/L. Pour 3 souches, les tests de dépistage des hGISA (tests en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un inoculum 2McF) et l'analyse de population étaient négatifs ; cependant elles ne pouvaient être rendues sensibles aux glycopeptides car elles présentaient des CMI à 4 mg/L pour la teicoplanine et/ou la vancomycine, ce qui conduit à les catégoriser résistantes aux glycopeptides en dépit du fait qu'elles ne répondent pas aux critères retenus par le CA-SFM pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type GISA.

Quatre-vingt souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage. Parmi elles, 28 présentaient une CMI vancomycine $\geq 2\text{ mg/L}$, seuil au-dessus duquel le risque d'échec thérapeutique a été décrit comme plus élevé dans la littérature. Dans ce contexte, il convient de déconseiller l'utilisation de glycopeptides sur ces souches même si elles ne répondent pas aux critères retenus pour définir les GISA ou hGISA.

Concernant les **staphylocoques à coagulase négative, 83 souches** ont été adressées au CNR en 2018 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides. Après une augmentation du nombre de demandes constante depuis 2015 (seulement 44 en 2015, 70 en 2016, 94 en 2017), nous observons une stagnation en 2018 qui s'explique probablement par le fait que les laboratoires ont commencé à s'équiper en réactifs pour déterminer les CMI des glycopeptides par microdilution. Début 2016, le CA-SFM recommandait de réaliser la mesure de la CMI par bandelette en gradient avec un inoculum à 0,5 McF ou en microdilution, les analyses complémentaires (type APOP) n'étant pas validées pour les SCN. En cours d'année, le CA-SFM a supprimé l'utilisation des bandelettes et a recommandé uniquement les techniques de mesure de CMI en microdilution. Les laboratoires qui ne se sont pas équipés de ce type de réactifs sont donc amenés à envoyer les souches au CNR.

Sur ces 83 souches, 16 souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides (en microdilution UMIC (Biocentric®, CMI $> 4\text{ mg/L}$ pour la teicoplanine et/ou CMI $> 2\text{ mg/L}$ pour la vancomycine). Ces 16 souches appartenaient aux espèces *S. epidermidis* (n=12) et *S. haemolyticus* (n=4). Une souche n'a pas présenté de croissance en microdilution et n'a donc pas pu être catégorisée. Il faut noter que sur les 16 souches résistantes à au moins un des glycopeptides, 2 étaient également résistantes à la daptomycine et 2 au linézolide.

3.3.3.3 Détection de la résistance au linézolide

Le linézolide appartient à la famille des oxazolidinones et constitue une alternative thérapeutique à l'utilisation des glycopeptides pour le traitement des infections à SARM. Il est aussi de plus en plus souvent utilisé en première intention en réanimation chez certains patients fragiles en cas de suspicion d'infection à SARM/SARM. La résistance aux oxazolidinones est liée soit :

- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *cfrA* ou *B*** (chloramphenicol-florfenicol resistance) qui codent des méthyltransferases de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S, méthylations qui masquent la cible de cette famille de molécules sur le ribosome,
- à l'acquisition du **gène plasmidique *optrA*** qui code un ABC transporteur conférant des hauts niveaux de résistance au linézolide et dont le mécanisme précis d'action reste encore inconnu,
- à des **mutations du gène codant l'ARNr 23S** entraînant un changement de conformation du ribosome bactérien et une perte d'affinité du linézolide,
- à des **mutations des gènes codant les protéines ribosomales L3 et L4** modifiant l'accessibilité au site de fixation du linézolide sur l'ARNr 23S.

En 2018, le CNR a expertisé **210 souches de staphylocoques** pour lesquelles le laboratoire expéditeur avait identifié une CMI augmentée pour le linézolide. Cent-soixante-dix-neuf souches, dont 2 *S. aureus*, ont été confirmées résistantes au linézolide (CMI > 4 mg/L). Ceci représente une augmentation importante du nombre de souches résistantes reçues au CNR (67 en 2017, +167%) mais nous ne pouvons dire si cette augmentation est réellement liée à l'émergence de ces souches résistantes au linézolide ou si, suite aux alertes du CNR, les laboratoires ont envoyé ces souches de manière plus exhaustive.

S. aureus

Les **2 souches** de *S. aureus* résistantes au linézolide étaient résistantes à la méticilline et provenaient de 2 villes différentes : Clermont-Ferrand et Toulon. Les 2 souches provenaient de prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose. La souche isolée à Toulon (CMI >256 mg/L) présentait une mutation de l'ARNr 23S (G/2576/T, la mutation la plus fréquente) et ne possédait pas le gène *cfr*. La souche isolée à Clermont-Ferrand avait une CMI à 6 mg/L et ne présentait pas de mutations de l'ARNr 23S ni le gène *cfr* mais portait des mutations au niveau du gène codant la protéine ribosomale L3 (A48T (aaQ136H) et GG(409-410)TC (aaG137S)).

Staphylocoques à coagulase négative

Les **177 souches** de SCN résistantes au linézolide appartenait à 4 espèces : *S. epidermidis* (n=162), *S. capitis* (n=11), *S. hominis* (n=3) et *S. pasteurii* (n=1). Toutes ces souches étaient résistantes à la méticilline à l'exception de la souche de *S. pasteurii*.

Parmi les 162 souches de ***S. epidermidis*** résistantes au linézolide, seules 6 possédaient le gène plasmidique *cfr* ; dans ces 6 souches, le gène *cfr* était associé à la mutation G2576T de l'ARNr 23S. Ces souches provenaient de 6 hôpitaux différents, suggérant donc l'absence de lien épidémiologique entre elles (Châlon-sur-Saône, Bordeaux, Paris, Nantes, Amiens, Nancy).

Parmi les 156 souches de *S. epidermidis* ne possédant pas le gène *cfr*, elles possédaient toutes une ou des mutations au niveau de l'ARNr 23S à l'exception de 3 souches qui n'en présentaient pas. Ces 3 souches possédaient par contre des mutations au niveau des protéines ribosomales L3 et/ou L4. Sur les 153 souches présentant des mutations de l'ARNr 23S, 151 présentaient la mutation G2576T et deux la mutation T2504A.

Les 11 souches de ***S. capitis*** possédaient pour trois d'entre elles le gène plasmidique *cfr* (mais ces 3 souches provenaient de 3 hôpitaux différents : Chambéry, Valenciennes et Amiens). Une des souches *cfr+* ne possédait pas de mutation de l'ARNr 23S. Les 10 autres souches de *S. capitis* résistantes au linézolide présentaient des mutations de l'ARNr 23S : mutations T2319C et G2576T pour 6 d'entre elles, mutation T2319C seule pour quatre.

Les 3 souches de ***S. hominis*** portaient la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S. La souche de ***S. pasteurii*** présentait une mutation de l'ARNr 23S (C2356T). Ces 4 souches étaient *cfr*-négatives.

Ces données confirment que la mutation majeure associée à la résistance au linézolide retrouvée en France est la mutation G2576T. Nous observons également une absence d'augmentation du nombre de souches *cfr* positives pour 2018 contrairement aux années précédentes (3 détectées en 2015, 8 en 2016, 19 en 2017, 9 en 2018). Ceci semble montrer que (i) le gène *cfr* reste assez rare et ne diffuse pas actuellement dans la communauté et (ii) que l'accumulation de mutations de résistance lors de mésusage de linézolide dans certains services reste le principal mécanisme d'émergence de souches résistantes à cet antibiotique.

La prévalence de la résistance au linézolide a longtemps été faible en France mais l'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes (Figure 18). Elles sont de moins en moins rares et restent probablement sous-diagnostiquées car le linézolide n'est pas systématiquement testé, les résistances de bas niveau mal détectées et les souches pas assez systématiquement adressées au CNR. On peut cependant noter une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR en 2018. Les résistances au linézolide sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations sur l'ARNr 23S et ces souches peuvent être responsables d'épidémies intra- ou inter-hospitalières puisque plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières ont déjà été décrites (Bordeaux, Toulouse, Paris). De façon plus inquiétante, il existe des résistances plasmidiques au linézolide, telles que celle médiée par le gène *cfr*. Cette résistance plasmidique à fort potentiel de transmission et de dissémination incite donc à renforcer la surveillance du niveau de sensibilité au linézolide et plus généralement aux molécules de la famille des oxazolidinones. La prévalence réelle des souches de *S. aureus* et de SCN résistantes au linézolide en France reste à ce jour inconnue. Une étude de prévalence de la résistance aux oxazolidinones au niveau national apparaît nécessaire et fait partie des projets du CNR pour la période 2018-2019 en lien avec nos collègues du CNR des Résistances. Cette étude s'avère d'autant plus nécessaire que vient d'être commercialisée une nouvelle molécule au sein de la famille des oxazolidinones, le tédizolide, et que la forme IV du linézolide a été génériquée depuis deux ans avec une chute du prix ce qui conduit à une augmentation de la prescription.

Concernant le gène *cfr*, là encore, la prévalence exacte de ce mécanisme de résistance est inconnue en France, la sensibilité des souches de staphylocoques à coagulase négative au linézolide n'étant pas systématiquement testée, la résistance au linézolide étant probablement négligée et/ou peu rapportée et les souches concernées n'étant pas systématiquement adressées au CNR.

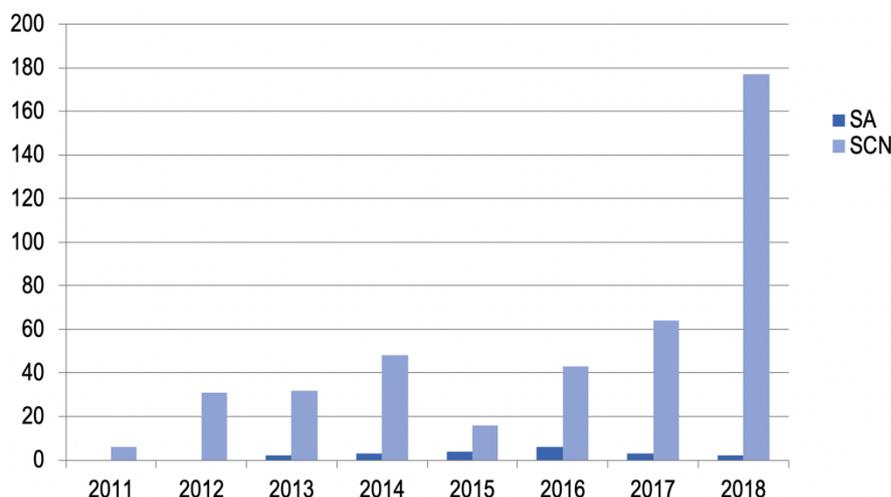


Figure 18. Nombre de souches de staphylocoques **résistantes au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2018. SA = *S. aureus*, SCN = staphylocoques à coagulase négative.

3.3.3.4 Détection de la résistance à la daptomycine

La daptomycine est un lipoglycopeptide, dont la concentration critique a été fixée à 1 mg/L par le CA-SFM/EUCAST. La daptomycine constitue une alternative pour le traitement des infections à SARM, notamment au cours des endocardites ou lorsque l'infection est associée à une prothèse ou cathéter, du fait de son efficacité à l'intérieur du biofilm. Depuis 2013, le CNR reçoit des souches de staphylocoques pour confirmation de la résistance à la daptomycine ou détermination de sa CMI.

En 2018, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **53 souches de staphylocoques** (20 *S. aureus* et 33 staphylocoques à coagulase négative), le plus souvent car ces souches avaient été trouvées résistantes à la daptomycine ou parce que le laboratoire ne disposait pas de moyens pour tester la sensibilité de la souche à cet antibiotique.

Sur les 20 *S. aureus* reçues pour cette demande, seulement 8 souches (isolées chez 5 patients) étaient bien résistantes à la daptomycine avec des CMI comprises entre 1,5 et 2 mg/L. Six de ces souches provenaient

d'hémocultures, une de prélèvement ostéo-articulaire et une de prélèvement cutané sur moignon d'amputation. Cinq de ces souches étaient des SARM.

Sur les 33 souches de SCN testées, seulement 8 étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 2 mg/L : 5 *S. capitis*, 1 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus* et 1 *S. pettenkoferi*. Six de ces souches étaient résistantes à la méticilline et cinq provenaient d'hémocultures.

Jusque début 2018, le CNR réalisait le séquençage du gène *mprf* sur les souches de *S. aureus* résistantes à la daptomycine. En effet, le gène *mprf* code une lysyl-phosphotidylglycérol synthase qui assure le transfert de la lysine chargée positivement sur le phosphotidylglycérol de la membrane cellulaire. La délétion de ce gène ou l'apparition de mutations sur ce gène réduit les charges positives de la membrane bactérienne et ainsi diminue la sensibilité de la bactérie à la daptomycine qui est une molécule anionique et doit venir s'insérer au sein de la membrane bactérienne pour être active. Néanmoins le rôle causal de ces mutations sur *mprf* dans la résistance est encore mal connu et la résistance à la daptomycine est probablement un mécanisme multifactoriel, lié à des mutations de plusieurs gènes, rendant complexe la confirmation moléculaire de la résistance. Le séquençage du gène *mprf* a donc été arrêté par le CNR courant 2018 car jugé peu contributif. Les souches résistantes à la daptomycine sont conservées dans l'attente d'un séquençage génome complet.

3.3.3.5 Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux

Le CNR est également amené à recevoir occasionnellement des souches pour vérifier la sensibilité ou détecter des mécanismes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques comme les macrolides pour lesquels le phénotype observé peut être mis en relation avec plusieurs gènes de résistance aux macrolides détectés par la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere technologies) utilisée au CNR. Le CNR dispose pour ces demandes de l'ensemble du panel de bandelettes en gradient de concentration permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococciques utilisés en thérapeutique.

- Treize souches (5 *S. aureus*, 7 *S. epidermidis* et 1 *S. hominis*) ont été reçues car elles présentaient une **croissance difficile** et l'antibiogramme n'était pas réalisable dans les conditions usuelles. Ils ont été réalisés au CNR sur gélose contenant du sang afin de faciliter la croissance de ces souches déficientes.

- Sept souches (5 *S. epidermidis*, 1 *S. aureus* et 1 *S. haemolyticus*) ont été reçues pour détermination de la sensibilité à la **dalbavancine**. Cinq souches se sont avérées sensibles et deux souches, appartenant à l'espèce *S. epidermidis*, se sont avérées résistantes avec une CMI à 0,32 et 0,75 mg/L.

- Trois souches ont été reçues pour vérification de la sensibilité aux **macrolides** : 1 souche de *S. aureus* et 2 souches de *S. epidermidis*. Deux souches étaient bien sensibles aux macrolides et une des souches de *S. epidermidis* était résistante à l'érythromycine via un phénotype MLS_B inducible.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour vérification de la résistance aux **aminosides** car elle était sensible à la méticilline. Au CNR, la souche a également été retrouvée résistante aux aminosides avec un phénotype KTG.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour vérification de la résistance à la **rifampicine** et a été confirmée résistante.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour vérification de la résistance aux **furanes** et a également été confirmée résistante.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour détermination de la CMI de la **tigécycline** et s'est révélée sensible à cet antibiotique.

3.3.4 Analyse des tendances

Globalement, nous observons :

- une stagnation du nombre de souches reçues en 2018 pour vérification de la sensibilité aux glycopeptides après une nette augmentation en 2016-2017 ; cette augmentation était en lien direct avec les changements des recommandations faites par le CA-SFM depuis 2015 ; la stabilisation et la simplification de ces recommandations en

2018 ont probablement permis aux laboratoires de s'équiper en réactifs de microdilution et de diminuer les recours au CNR, notamment pour les souches de staphylocoques à coagulase négative ;

- une très nette augmentation du nombre de souches reçues pour confirmation et étude de la résistance au linézolide. Cette hausse démontre une sensibilisation des laboratoires à la problématique de l'émergence de cette résistance. La surveillance des déterminants responsables de cette résistance, notamment de la prévalence des gènes transférables comme *cfr*, est un enjeu majeur pour les prochaines années.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Se reporter au chapitre 4. «Alerte » pour SPF

Réseau partenaire des CNR de la résistance aux antibiotiques et des staphylocoques.

En 2018, 63 laboratoires de microbiologie rattachés à des établissements hospitaliers publics ont été sollicités pour faire partie d'un réseau partenaire des CNR de la résistance aux antibiotiques et du CNR des Staphylocoques staphylocoques. Trente-trois réponses positives (52%) ont été obtenues après relance. L'objectif du réseau étant de pouvoir détecter plus précocement les résistances bactériennes émergentes et d'en estimer la prévalence, chaque laboratoire partenaire devait préciser ses capacités à déterminer la sensibilité à diverses molécules antibiotiques indicatrices. Le détail des réponses est fourni dans l'Annexe 4. L'analyse de ces données a montré que peu de laboratoires avaient la possibilité de détecter l'ensemble des résistances émergentes surveillées par les CNR. Par ailleurs, il est apparu que des molécules telles que la daptomycine, la ceftaroline, le ceftobiprole, la tigécycline, la témocilline, la colistine (en microdilution), ainsi que les associations ceftolozane/tazobactam et ceftazidime/avibactam étaient très inconstamment testées par les laboratoires, compromettant ainsi les capacités du réseau à assurer une surveillance épidémiologique efficace. Sous réserve de fournir aux laboratoires partenaires les réactifs qui leur font défaut (et de changer les habitudes locales), la mise en place d'un réseau spécifiquement dédié aux résistances émergentes s'avère donc difficile. L'envoi spontané de souches ou les enquêtes ciblées sollicitant divers laboratoires selon leurs capacités techniques reste pour l'instant d'actualité comme en témoigne par exemple la mobilisation obtenue récemment pour collecter les *S. epidermidis* multi-résistants dans les suites de l'alerte lancée par nos collègues Australiens.

- *Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC) : lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches, ...)*

Le CNR des staphylocoques a su établir des interactions fortes avec de nombreux réseaux de laboratoires qu'il s'agisse de laboratoires hospitaliers ou privés et nationaux ou internationaux (ColBHV, Probioqual, EARSS-Staph, etc.). Les objectifs sont, dans le cadre d'échanges réciproques : (i) de fournir une aide technique et un accès aux outils développés ou disponibles au CNR pour les études initiées par les différents réseaux, (ii) d'avoir accès à des panels de souches représentatives des clones circulants et/ou de formes cliniques spécifiques étudiées, (iii) de disposer et de fournir des données de prévalence, de virulence, de résistance aux membres des réseaux et plus largement aux autorités de santé, (iv) de pouvoir comparer les données issues des différents réseaux entre eux et avec ceux d'autres pays européens.

Ces travaux sont complémentaires des interactions directes que le CNR peut établir individuellement avec chaque laboratoire dans le cadre de cas cliniques spécifiques ou de cas groupés et des études initiées et gérées par le CNR lui-même.

Certaines de ces collaborations s'inscrivent dans la volonté du CNR d'établir des échanges et transfert de technologie avec des laboratoires de pays tiers. Elles permettent de confronter les expériences et approches choisies dans les différents pays. Plus encore, l'évolution de l'épidémiologie des SARM étant liée à des disséminations clonales, ces collaborations permettent de disposer d'un système de veille concernant l'épidémiologie globale et les clones circulants dans des pays tiers qui pour des raisons géographiques, de flux touristique ou migratoires pourraient constituer des réservoirs de nouveaux clones susceptibles d'être introduits et de disséminer en France. Ces

collaborations constituent selon nous des éléments importants du dispositif d'alerte et de surveillance épidémiologique dont nous devons disposer (Cf 5.2 Activités d'expertise auprès de structures européennes (ECDC, ...)).

Aucune étude spécifique n'a pu être réalisée au cours de l'année 2018 (et n'est prévue en 2019), les activités et les financements de l'ECDC étant actuellement surtout focalisés sur les entérobactéries et les acinetobacters produisant des carbapénèmases.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- SURVEILLANCE EN SANTE HUMAINE

Dans le cadre de ses collaborations internationales, le CNR des staphylocoques a participé à une étude (en fournissant des souches françaises) qui a permis de caractériser l'émergence et la diffusion au niveau mondial de 3 clones de *Staphylococcus epidermidis* multirésistants présentant notamment une résistance croisée à la rifampicine et à la vancomycine liée à une double mutation au niveau du gène *rpoB* codant une sous-unité de l'ARN polymérase-ADN dépendante.

Face à cette dissémination inattendue pour les staphylocoques à coagulase négative, le CNR a voulu connaître le niveau de diffusion de ces clones en France au travers d'une étude rétrospective dans 13 centres hospitaliers. Un recueil des 20 dernières souches de *Staphylococcus epidermidis* résistantes à la rifampicine incluant 10 souches de bactériémie vraies et 10 souches responsables d'infections ostéo-articulaires a été réalisé. Au total 233 souches ont été incluses après confirmation de l'identification et de la résistance à la rifampicine au sein du CNR. La recherche de la double mutation spécifique des clones épidémiques australien a été réalisée par PCR et séquençage sur le gène *rpoB* et a été positive chez 199 des 233 souches (85,4%). Ces résultats indiquent que parmi les *S. epidermidis* résistant à la rifampicine isolées en France dans les infections profondes (septicémie et IOA), la prévalence des clones multirésistants de diffusion mondiale décrit par Lee et al. sont très majoritaires en France ce qui confirme un niveau de diffusion très important de ces clones.

Pour chacun des 13 centres, 4 souches *S. epidermidis* portant la double mutation *rpoB* ont été sélectionnées de façon aléatoire (n=52) et caractérisées au niveau moléculaire par la technique de MLST (Multilocus Locus Sequence Typing avec PCR + séquençage de 7 gènes de ménage) afin de d'estimer la distribution des séquence type (ST) des souches de la collection et de les comparer aux 4 ST (ST2, ST2-mixte, ST5, ST23) décrits par nos collègues australiens. L'analyse des résultats montrent que le clone ST2 est majoritaire parmi ces souches (25/52) devant le clone ST23 (12/52) et le groupe ST2-Mixte parmi lequel 8 ST différents ont été identifiés dont 5 nouveaux ST ce qui confirme la diversité intrinsèque à ce groupe.

- SURVEILLANCE EN SANTE ANIMALE

Aucune étude spécifique n'a été conduite au cours de l'année 2018 sur cette thématique. Là encore les activités au niveau national et international dans le domaine de la santé animale sont actuellement focalisées sur les entérobactéries multi-résistantes notamment aux C3G, aux carbapénèmes et à la colistine.

4 Alerte

4.1 La procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année

Des liens étroits ont été tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR des Staphylocoques et Santé Publique France. L'émergence de tout phénomène anormal dans les domaines cliniques (formes cliniques atypiques), épidémiologiques (épidémies dans des collectivités (épidémie d'infections avec le clone CC30-MSSA PVL+ dans un Institut thérapeutique, éducatif et pédagogique, dans des services de néonatalogie...), cas groupés d'infections post-opératoires...) ou microbiologiques (détection de nouveaux clones, augmentation de prévalence de certains clones) a fait l'objet d'une information auprès de nos correspondants de Santé Publique France par contacts téléphoniques directs ou par mail. Dès la détection de tout phénomène anormal, un contact par mail ou téléphonique est immédiatement établi avec nos correspondants de Santé Publique France avec une mise en place d'une cellule d'aide à la décision à laquelle peuvent participer selon les situations, l'ARS, la Cire, Santé Publique France – DMI (Direction des maladies infectieuses), le CNR, le CPIas et les EOH, des praticiens locaux (infectiologues, biologistes, hygiénistes, pédiatres, dermatologues, gériatres, médecins généralistes,...).

Le CNR participe par ailleurs activement à la formation à l'épidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses, organisée chaque année par Santé Publique France pour ses intervenants en région.

Les objectifs de la collaboration entre le CNR des staphylocoques et Santé Publique France sont donc :

- (i) de surveiller et de suivre les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches de SASM et de SARM mais aussi de Staphylocoques à coagulase négative circulants en France,
- (ii) d'alerter Santé Publique France sur l'apparition de possibles cas groupés à partir des informations transmises au CNR et/ou des souches qui lui sont adressées,
- (iii) de détecter l'apparition de nouveaux clones présentant des facteurs de virulence ou des résistances aux antibiotiques particuliers,
- (iv) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones de SARM communautaires,
- (v) d'aider à la mise en place de mesures de contrôle des phénomènes épidémiques
- (vi) d'apporter son expertise dans les prises de décisions dans la gestion au niveau national des infections staphylococciques (dépistage, recommandations, prophylaxie, traitements...)
- (vii) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones animaux de SARM et leur diffusion chez l'homme.

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

4.2.1 Épidémies de *S. aureus* dans plusieurs services de néonatalogie en France

Depuis 2011, le CNR en lien avec Santé Publique France a participé à l'investigation d'infections à SASM ou SARM dans différents services de néonatalogie en France (Bordeaux, Limoges, Épinal, Lens, Arras, Mulhouse, Le Mans, Centre Hospitalier Sud Francilien, Lyon, Chambéry).

Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2017 et 2018. Il est surprenant de constater que dans le cadre d'infections liées aux soins, ce n'est pas un clone nosocomial comme le clone Lyon qui est responsable de ces infections mais un clone à la fois communautaire et nosocomial comme dans le cas du clone Géraldine retrouvé à Bordeaux, Lens, Limoges, Arras et Épinal. Au cours de ces épisodes épidémiques, si des infections ont été identifiées, c'est surtout une augmentation du portage à *S. aureus* dans ces services qui ont nécessité les bio-nettoyages avec décontamination des personnels après ou sans dépistage préalable. Deux épidémies dues à des SASM PVL+ ont eu lieu en 2018 et il est important de rappeler l'importance du dépistage de SA dans les services de néonatalogie aussi bien les SARM que les SASM. Ces épidémies avec des souches plutôt communautaires doivent

également faire réfléchir à une possible introduction des souches par les parents au sein des services et aux mesures à mettre en place dans ce contexte (Figure 19).

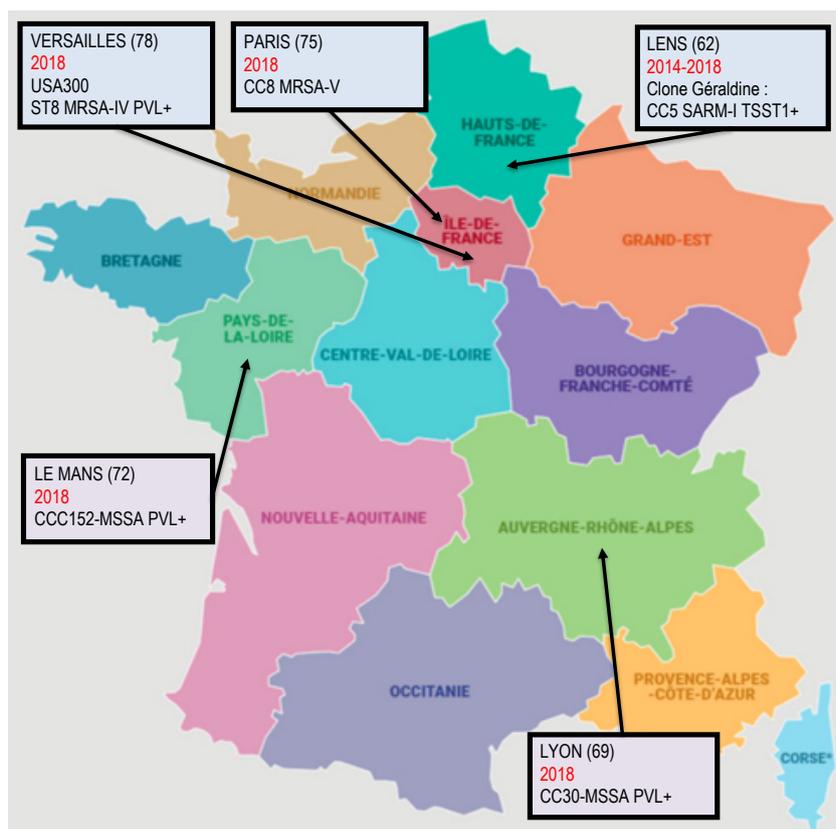


Figure 19. Épidémies d'infections à *S. aureus* dans les services de néonatalogie en France en 2018

Clone Géraldine.

Depuis 2011, le CNR a participé à la détection et l'investigation d'épidémies à SARM (clone Géraldine) dans les services de Néonatalogie de Bordeaux¹⁶, de Limoges¹⁷, d'Épinal et Arras et a poursuivi depuis 2017 l'investigation du service de néonatalogie de Lens.

En 2017, une analyse par séquençage a été réalisée pour suivre l'épidémie de Lens. En 2018, les analyses par séquençage ont été reprises pour déterminer s'il s'agissait d'une même souche ou de l'introduction successive de différentes souches appartenant au même clone.

L'analyse par puces à ADN a identifié les 5 souches comme appartenant au même fond génétique (clone Géraldine ST5-MRSA-I [*tst*-1+], profil identique) que les souches isolées précédemment dans le même service. Nous avons utilisé le NGS dans le cadre de l'investigation de deux épisodes de réémergence en 2018 du clone Géraldine ST5-MRSA-I [*tst*+] dans le service de néonatalogie du CH de Lens (n=10). Ces souches ont été comparées à : (i) des souches du clone Géraldine isolées dans le même service entre fin 2014-2016 (n=25), (ii) des souches du clone Géraldine isolées des épisodes épidémiques dans d'autres services de néonatalogie en France (n=45) (Arras (n=3), Bordeaux (n=37), Épinal (n=2), Limoges (n=3) et Lens (n=35), et (iii) des souches du clone Géraldine isolées hors cas d'épidémies et de différents départements (n=11).

Le génome de la souche N315, (ST5-MRSA d'une lignée différente), a été utilisée comme référence pour construire un arbre phylogénétique basé sur les positions polymorphiques conservées (SNP dans le core-génome).

¹⁶ Leroyer C et al. (2016). Outbreak in newborns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the sequence type 5 Geraldine clone. Am J Infect Control. Feb;44(2):e9-11.

¹⁷ Couvé-Deacon E et al. (2017). Neonatal Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Geraldine: A Bundle of Measures to Halt Transmission. Infect Control Hosp Epidemiol. Mar 23:1-3.

La comparaison génomique a montré la structure fortement clonale des souches isolées à Lens pendant le premier épisode épidémique (branches de l'arbre colorées en vert) et pendant les 2 épisodes de 2018 (branches colorées en bleu). Ainsi, le nombre maximum de SNPs entre les souches phylogénétiquement les plus éloignées du groupe Lens n'est que de 9 SNPs.

Ces résultats corroborent l'endémie de cette souche Géraldine au sein du service de Néonatalogie de Lens et non pas l'introduction d'un nouvel isolat de cette lignée (Figure 20).

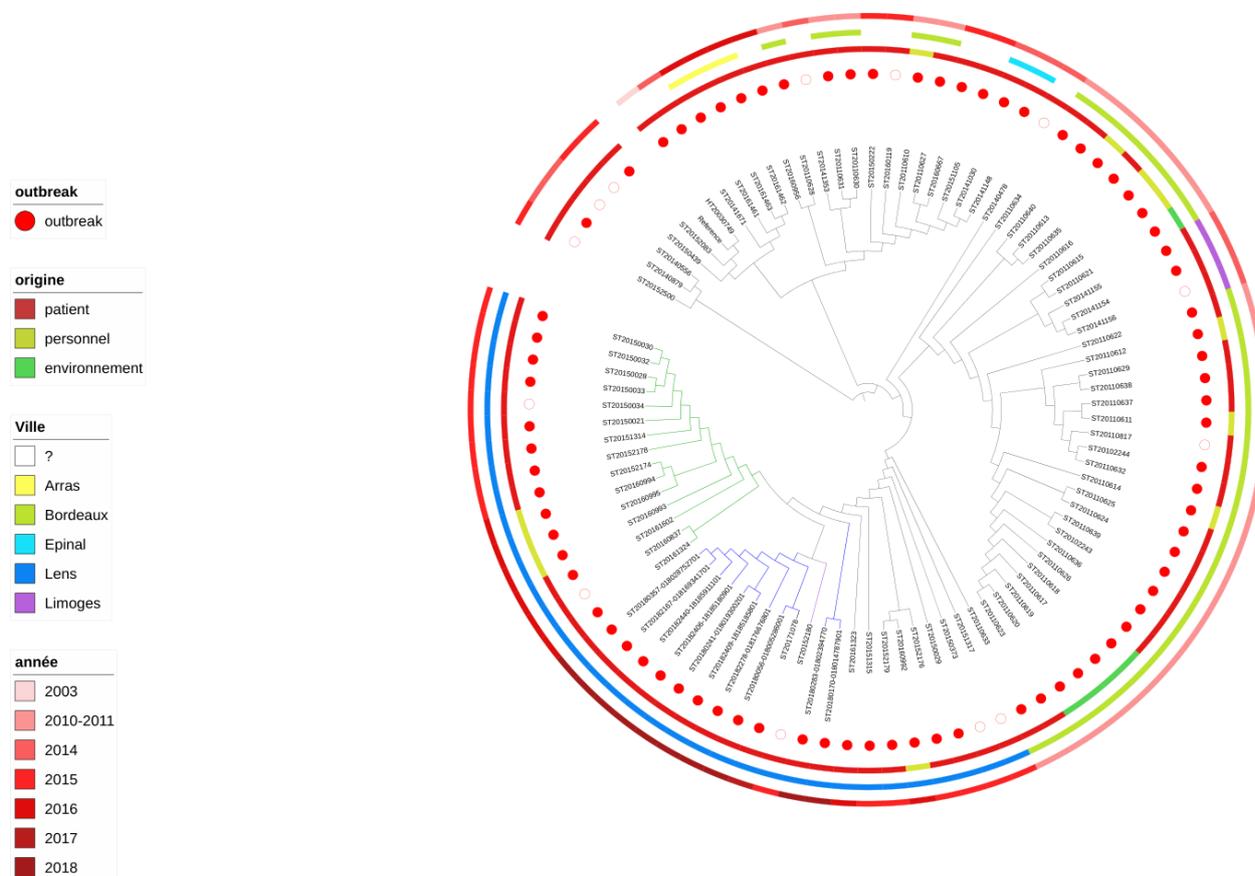


Figure 20. Phylogénie basée sur 1711 SNPs du core-génome des souches ST5-MRSA-I, clone Géraldine. L'origine des souches, le caractère épidémique ou non (outbreak), le positionnement géographique et les années d'isolement sont indiqués.

ST8 MRSA-IV USA300.

En 2018, au CH de Versailles, deux nouveau-nés ont présenté des bactériémies dues au clone USA300, le SARM communautaire ST8 MRSA-IV PVL+ ACME+, dans une période de 2 mois. Le séquençage de ses deux souches et la comparaison génomique avec d'autres souches du clone USA300 issues soit d'épisodes épidémiques (Le Puy en Velay) soit de cas isolés a permis de conclure à un fort lien de clonalité entre les deux souches isolées au service de néonatalogie du CH de Versailles (7 SNPs de différence entre les deux souches, Figure 21).



Figure 21. Phylogénie basée sur 411 SNPs du core-génome des souches ST8-MRSA-IV, clone USA300.

CC8-MRSA-V. En 2018, deux épisodes de bactériémies de nouveau-nés à l'Hôpital Cochin (Paris) ont été déclarés au CNR. Le premier épisode représentait 2 cas en avril avec un lien possible entre les patients. Le deuxième épisode représentait 6 cas entre septembre et octobre 2018 avec également un lien entre les 2 patients (jumeaux) et 2 décès associés. Le profil toxinique étant très proche et l'assignation à un même SARM (CC8 SARM-V) par puces ont menés à une analyse plus fine par NGS.

La comparaison génomique avec d'autres souches du même fond génétique de routine et d'origine néonatale a permis de confirmer que 2 populations clonales distinctes étaient associées aux deux épisodes reportés au CNR. Les liens entre les patients ont été confirmés par la proximité des souches (Figure 22).

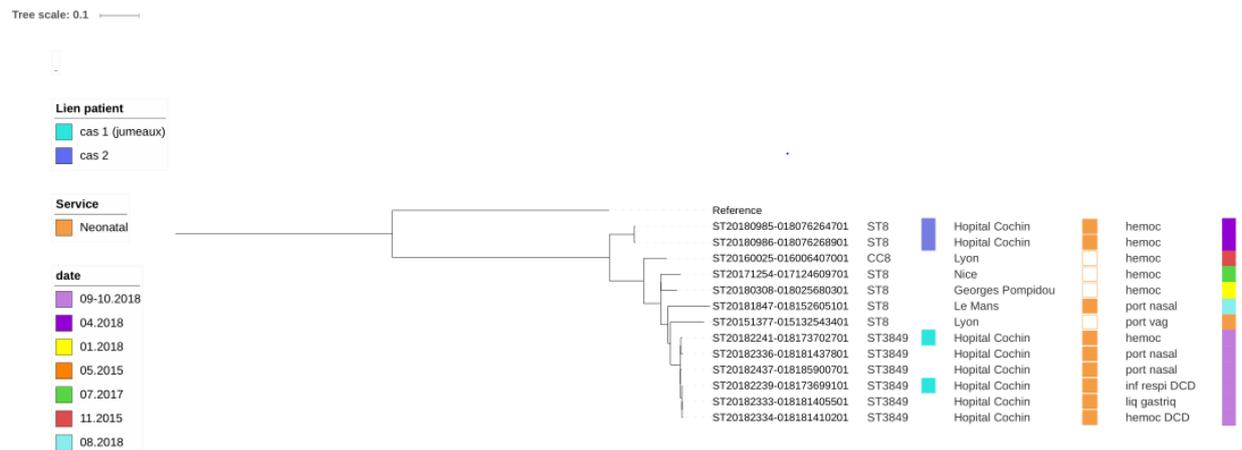


Figure 22. Phylogénie basée sur 1317 SNPs du core-génome des souches CC8-MRSA-V. Le typage par MLST in-silico, l'origine géographique, l'isolement dans un service de néonatalogie, la présence d'un lien entre patients, le type de prélèvement et les dates d'isolement (mois et année) sont indiqués.

Il a été également noté une augmentation de la prévalence du portage à SASM chez les nouveau-nés. La caractérisation par puces à ADN a permis de montrer qu'il y avait une grande diversité de clones présents dans le service.

CC152-MSSA PVL+.

A l'été 2018, dans le service de néonatalogie du Mans, le CNR a investigué une épidémie de SASM PVL+ appartenant au clone CC152-MSSA. Un signalement a été effectué suite au décès d'un nouveau-né dans un contexte de pneumopathie due à ce clone également retrouvé dans les prélèvements respiratoires de sa jumelle. Un dépistage

et une décontamination des nouveau-nés et des personnels ont été mis en place. Des dépistages hebdomadaires des nouveau-nés ont été mis en place jusqu'à la sortie du service des derniers porteurs détectés par le dépistage.

CC30-MSSA PVL+.

Au printemps 2018, dans le service de néonatalogie de l'hôpital de La Croix-Rousse, le CNR a investigué une épidémie de SARM PVL+ appartenant au clone CC30-MSSA. Trois nouveau-nés ont en effet présenté des pneumopathies d'évolution très différentes avec la même souche de *S. aureus*. Un signalement a été effectué suite au décès d'un des nouveau-nés. Une enquête a été menée montrant de plus une augmentation de la prévalence du portage à *S. aureus* (clones différents) au sein du service. Il a été décidé le renforcement des mesures d'hygiène au sein du service, une amélioration de la sensibilisation des parents aux mesures d'hygiène notamment.

4.2.2 Epidémie d'infections cutanées dans un ITEP

En 2017, un signalement, a posteriori, d'un cas groupé de staphylococcies touchant des jeunes accueillis dans un ITEP est effectué sans prélèvement effectué au moment du signalement. De nouveaux cas sont signalés en 2018 avec récurrences, dont le dernier cas survenu fin août 2018 pendant les congés scolaires d'été avant la rentrée scolaire et dont les analyses biologiques ont permis de retrouver un *S. aureus* appartenant à la lignée CC30-MSSA PVL+. Une enquête a été menée au sein de la structure (CPias, Cire, ARS) en lien avec le CNR. La complexité des parcours des enfants a empêché toute enquête épidémiologique rétrospective fiable en raison d'une alternance entre l'ITEP (avec pour chacun des temps de prise en charge individuelles et collectives, de scolarisation, de loisirs et de sports, d'ateliers divers), l'école publique (école élémentaire/ collège) et le domicile (les weekends ou quotidiennement pour les demi-pensionnaires). De plus, l'accueil et la prise en charge par l'ITEP s'étendait sur plusieurs années et au cours de cette période, les enfants ont changé de chambres selon leurs âges ou leurs affinités. Il a donc été impossible de retracer précisément les contacts proches, peau à peau, les partages de linge/ vêtements... Il a été décidé conjointement d'appliquer les recommandations de l'HAS et outre la famille et les personnes vivant sous le même toit, il a été décidé de considérer comme contacts possibles des cas (= les enfants ayant été infectés), l'ensemble des personnes ayant fréquenté l'ITEP entre 2017 et 2018 compte tenu des multiples modalités de prise en charge et accompagnement, du public accueilli (enfants et adolescents), de la configuration, des équipements, et de l'ancienneté des locaux (chambres, couloirs, espaces collectifs, sanitaires). Des dépistages ont été effectués et aucun n'est revenu positif. Seul le cas confirmé par le CNR a été décontaminé.

4.2.3 Recherche de lien de clonalité

En 2018, de nombreuses demandes de recherche de lien de clonalité concernant des souches de *S. aureus* (SARM ou SARM) mais également des souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN) ont été adressées au CNR. Il pouvait s'agir de plusieurs souches isolées chez un même patient, de souches isolées lors de cas groupés ou d'une augmentation du nombre d'infections au sein d'un même service ou hôpital.

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour évaluer le lien de clonalité existant entre ces souches de staphylocoques : (i) caractérisation du fond génétique par détermination de l'allèle *agr*, (ii) détermination de l'appartenance à un complexe clonal (CC) au moyen de puces à ADN mettant en évidence le profil des gènes d'espèces, de virulence, de résistance, (iii) détermination du pulsotype ou profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé pour les SCN.

Nous ne présenterons pas ici les résultats individuels pour chaque épisode investigué. Les résultats commentés ont été adressés aux référents locaux pour chacune des demandes, résultats complétés par des échanges téléphoniques lorsque cela était nécessaire ou que le CNR était sollicité par les intervenants locaux (Figure 23).

Il est important de rappeler que notamment pour l'espèce *S. aureus*, la circulation de grands clones de SARM mais également de SARM à l'hôpital ou dans la communauté peut rendre cette analyse des résultats obtenus délicate. S'il est souvent aisé de conclure quand les données (surtout des techniques moléculaires) permettent d'établir que les fonds génétiques des souches adressées sont différents, en revanche l'identité des fonds ou profils génétiques ne permet bien souvent pas d'établir avec certitude qu'il s'agit de la diffusion/transmission d'une même souche dans un

contexte épidémique, le caractère endémique au niveau national de certains clones créant un bruit de fond rendant impossible des conclusions définitives.

Le développement du NGS nous permet d'affiner l'interprétation de nos résultats. Pour les souches responsables des épidémies dans les services de néonatalogie décrits au chapitre 4.2.1, une approche par séquençage génomique complet a permis d'affiner les résultats obtenus par les techniques classiques utilisées par le CNR.

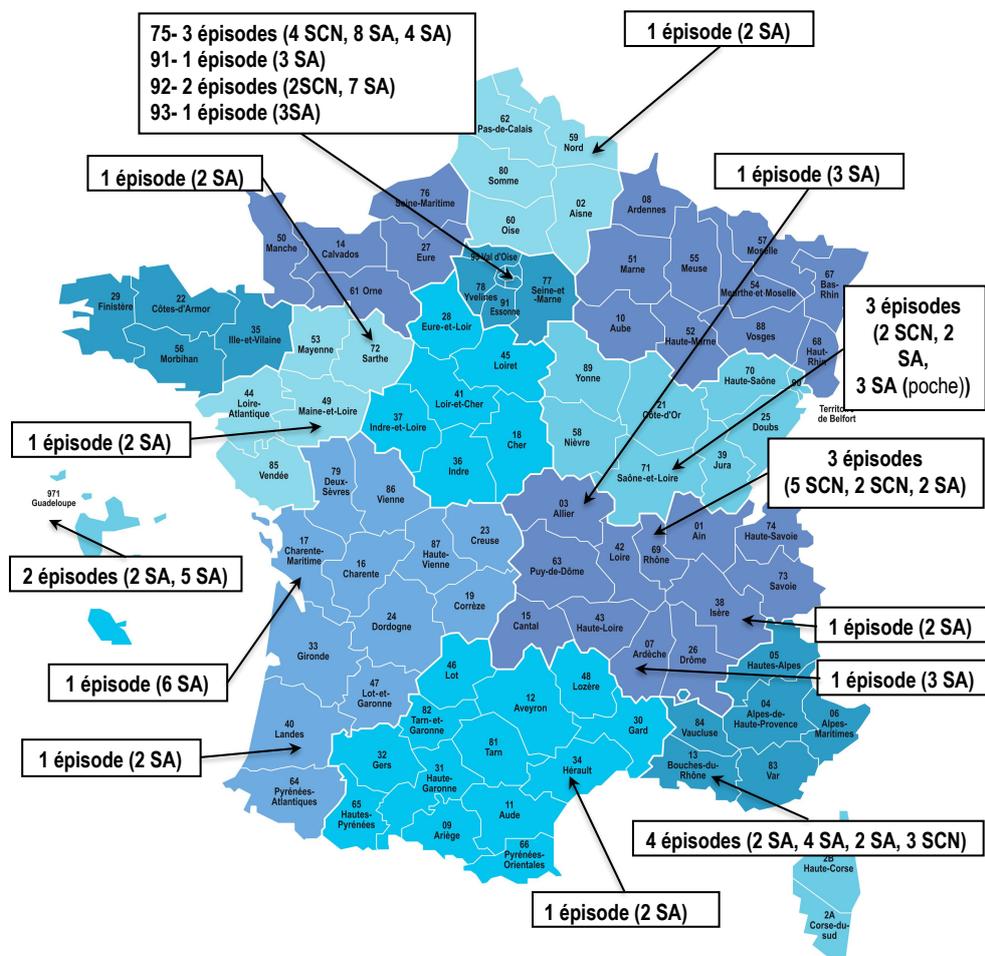


Figure 23- Recherches de lien de clonalité effectuées au CNR en 2018 (hors services de néonatalogie)

CC30-MSSA *tst-1+*. En 2018, le CNR a été sollicité pour vérifier une possible transmission de SASM dans des services de chirurgie orthopédique (CH de Vienne et CH de Moulins). Dans les deux cas rapportés au CNR, des patients présentaient des infections post-opératoires liées à la présence d'un SASM CC30 *tst+*. Le séquençage complet des 4 souches et la comparaison génomique réalisée par la suite ont confirmé la clonalité des souches isolées chez les patients opérés par le même chirurgien, dans les 2 CH, mais sans lien génétique proche entre les souches des deux CH (Figure 24).

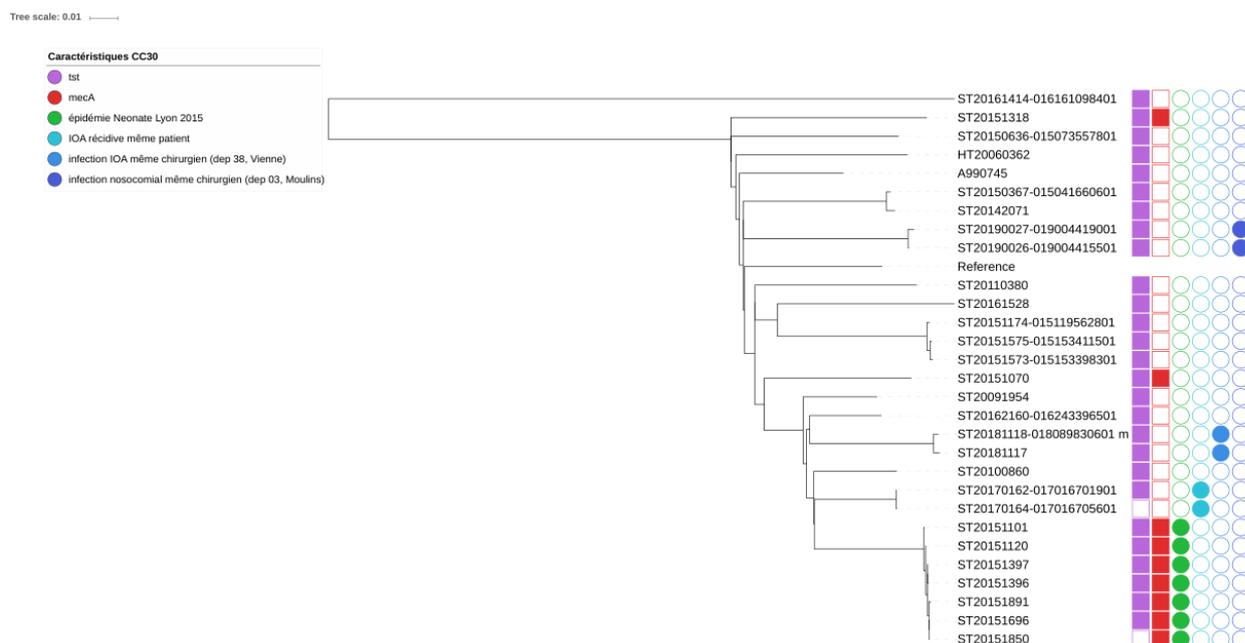


Figure 24. Phylogénie basée sur 2438 SNPs du core-génome des souches CC30-MSSA/MRSA *tst-1+*. Trois cas groupés sont identifiés : deux patients d'un même chirurgien au CH de Vienne, deux patients d'un même chirurgien au CH de Moulins et un cas d'épidémie d'un SARM CC30 dans un service de néonatalogie (pour comparaison).

CC121 MSSA PVL+. Un cas de possible transmission d'une même souche aux urgences du CH Sud Francilien a été analysé par le CNR. Deux bébés de 2 et 8 mois sont passés aux urgences du CH Sud Francilien pour des problèmes respiratoires et ont ensuite développé des infections avec une souche CC121 MSSA PVL+. Pour déterminer l'éventuel lien de clonalité entre les deux souches et une possible transmission due au passage dans le même box des urgences, un séquençage des souches (présentant le même profil en puces à ADN et la même assignation clonale) a été faite. La comparaison génomique avec d'autres souches CC121 MSSA PVL+ déjà séquencées au CNR a mis en évidence l'appartenance des deux souches à une même population clonale (5 SNPs de différence, Figure 25). L'enquête épidémiologique a exclu qu'un contact ait pu avoir lieu entre les deux enfants en dehors de l'hôpital ; la transmission nosocomiale de cette souche est l'hypothèse la plus probable.

Tree scale: 0.01

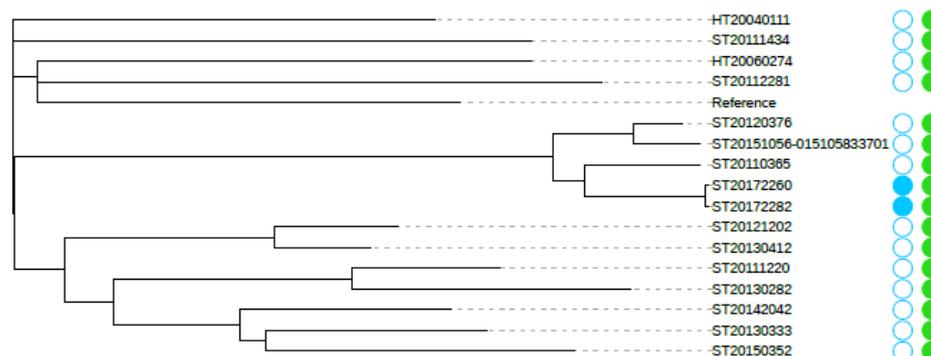
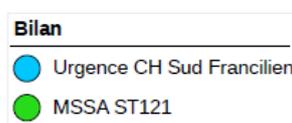


Figure 25. Phylogénie basée sur 5258 SNPs du core-génome des souches CC121 MSSA PVL+.

CC398 MSSA/MRSA. En 2018, le CNR a reçu une demande d'investigation dans le cadre d'un choc transfusionnel. A l'EFS de Besançon (CH de Chalon sur Saône) un patient a présenté une bactériémie avec un *S. aureus* appartenant au CC398-MSSA après une transfusion sanguine. Une souche isolée de la poche de sang a été comparée à une souche d'hémoculture et à une souche d'urine du patient isolées le même jour. La comparaison génomique des 3 souches et d'autres souches CC398-MSSA séquencées auparavant au CNR a permis de conclure que les souches isolées du patient appartenaient à une population différente de la souche isolée de la poche sanguine (Figure 26). Ce résultat est relativement inattendu et n'a pas trouvé d'explication épidémiologique plausible à ce jour.

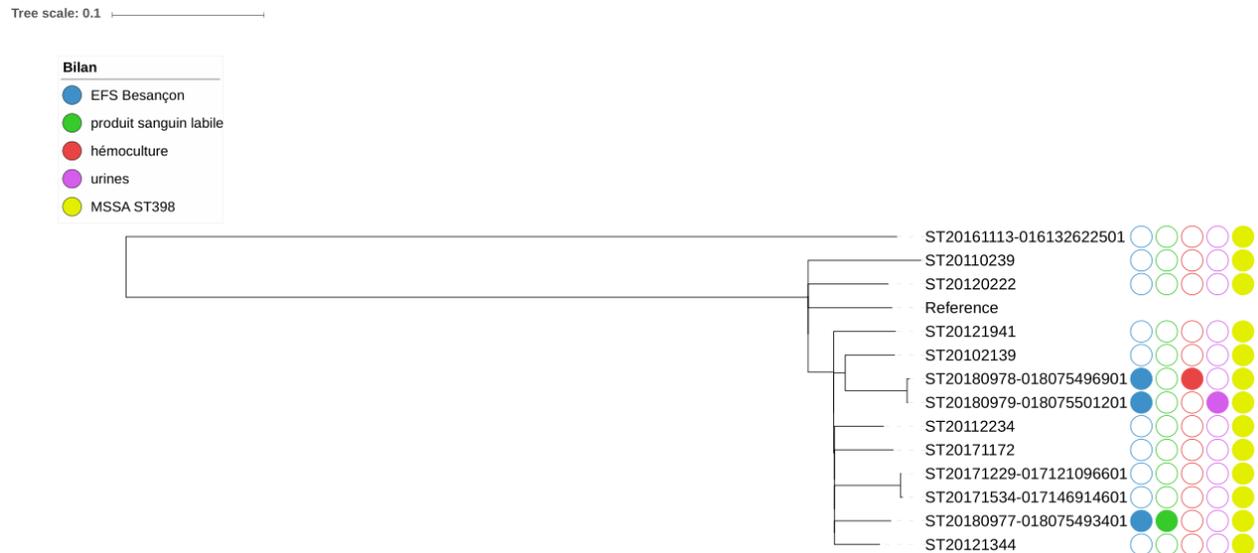


Figure 26. Phylogénie basée sur 2133 SNPs du core-génome des souches ST398 MSSA. Les trois souches CC398-MSSA dans le cas d'un choc transfusionnel isolées au CH de Chalon sur Saône (EFS de Besançon) ont été comparées à 10 autres souches du même fond génétique.

4.2.4 Alerte Vitek

Dans la continuité de l'alerte de réactovigilance transmise à Santé Publique France et à l'ANSM le 14 et 21/08/2017 respectivement, le CNR a poursuivi la surveillance du défaut de détection du phénotype SARM associé aux cartes P631 du système Vitek2® (bioMérieux) pour l'année 2018.

Pour rappel, le CNR avait conduit une étude d'impact sur 326 souches de *S. aureus* isolées d'échantillons cliniques à l'IAI, incluant 12,3 % de SARM dont 1,2% non détectés comme tels par Vitek2®.

Afin de sensibiliser les laboratoires d'analyses médicales sur ce défaut de détection du phénotype SARM, le CNR a émis des recommandations visant à établir des règles d'alerte devant conduire au recours à des techniques complémentaires/alternatives pour s'assurer du phénotype de résistance aux bêtalactamines chez *S. aureus* sur système Vitek2®.

Ces recommandations ont été diffusées en novembre 2017 lors de la réunion du Club Utilisateurs VitekMS/Vitek2® (bioMérieux) organisée annuellement à Paris. Les règles d'alerte établies par le CNR étaient établies ainsi :

- Pour tout *S. aureus* avec un phénotype de résistance à la pénicilline G et/ou ofloxacine ;
- Et/ou tout *S. aureus* avec un test « Cefoxitin Screen » négatif ET une concentration critique de l'oxacilline $\geq 1\text{mg/L}$;
- Il convient alors de recourir à des techniques alternatives (antibiogramme en diffusion, PCR *mecA/C*, recherche de PLP2a) avant de statuer sur le statut SASM / SARM.

Dans le cadre de cette surveillance à l'échelle nationale chez tous les utilisateurs du système Vitek2®, le CNR a reçu 34 souches en lien avec un défaut de détection du phénotype SARM.

En parallèle, l'alerte ANSM a été étendue au niveau européen. Ainsi, 19 souches en provenance du Portugal, Angleterre et Allemagne, ont été transmises au CNR par bioMérieux. L'objectif était de déterminer leur fond génétique afin de rechercher une éventuelle diffusion d'un nouveau clone associé à ce défaut de détection du phénotype SARM. Les résultats ont révélé une diversité des fonds génétiques et la présence de clones précédemment décrits.

En réponse à cette alerte, et sur la base des résultats obtenus par le CNR, la société bioMérieux a redéveloppé sa technique d'antibiogramme de Staphylocoques sur carte P631, Vitek2®. Le temps d'incubation associé au test « cefoxitin screen » a été fortement étendu afin de gagner en sensibilité et améliorer la détection du phénotype SARM. Cette mise à jour du système s'est conclue par une chute drastique du taux de faux négatifs (taux résiduel estimé à 0,12% des SARM). Cette nouvelle version du système Vitek2® a été progressivement déployée chez la quasi-totalité des utilisateurs sur le territoire national.

En collaboration avec bioMérieux, le CNR a complété sa première étude de 326 souches, par une 2ème phase visant à évaluer la nouvelle version du système Vitek2®. Durant 4 mois, tous les antibiogrammes de *S. aureus* réalisés au sein de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) de Lyon (Hospices Civils de Lyon), ont été systématiquement expertisés par le CNR à la recherche de discordances entre le test « cefoxitin screen » et la concentration critique d'oxacilline.

Le profil suspect était constitué des paramètres suivants :

- Test « cefoxitin screen » positif ;
- ET concentration critique d'oxacilline < 2 mg/L.

Toutes ces souches suspectes d'être des faux positifs (faux SARM) étaient testées à la recherche de PLP2a par le plateau de microbiologie de l'IAI. En cas de négativité, la souche était alors transmise au CNR pour PCR *mecA/C*.

Ainsi, le CNR a expertisé les données de 1622 souches de *S. aureus* sur une période de 4 mois (24/04/2018 – 03/09/2018). 66 souches ont été transférées au CNR pour expertise complémentaire. Le CNR a ainsi pu confirmer une classification erronée en SARM pour 23 de ces souches.

Cette 2ème phase d'étude a donc révélé une classification SARM erronée par excès pour 1,42% des *S. aureus* soumis à la nouvelle version du système Vitek2®. Ces résultats ont conduit bioMérieux à émettre une nouvelle alerte de réactovigilance auprès de l'ANSM.

Afin d'identifier l'origine du problème, le CNR et bioMérieux ont collaboré pour développer un protocole d'étude innovant :

- Analyse des courbes de croissance des puits des cartes P631 par bioMérieux ;
- Récolte et culture du contenu des puits correspondant au test « cefoxitin screen » ;
- Détection des sous-populations bactérienne par imagerie numérique (service de Recherche et Développement de bioMérieux ; site de La Balme les Grottes) ;
- Détermination de leur résistance aux bêtalactamines et fond génétique au CNR.

L'analyse de 5 cartes P631 associées à un phénotype SARM erroné, a permis d'identifier l'origine de ces classifications erronées par excès en SARM :

- D'une part, la société bioMérieux a montré que les courbes de croissance bactérienne associées aux puits « cefoxitin screen » se divisaient en deux phases. L'une typique d'une souche SASM pendant les 7 premières heures d'incubation ; l'autre typique d'une souche SARM à partir de 8/9h d'incubation ;
- D'autre part, le CNR a pu confirmer la présence de deux sous-populations bactérienne dans les puits « cefoxitin screen » :

- a) La souche SASM en cours d'analyse ;
- b) Une souche contaminante faussant le résultat du test « cefoxitin screen ». Cette souche contaminante était soit un Staphylocoques à coagulase négative (*S. epidermidis* le plus souvent), soit un SARM.

En conclusion, l'extension du temps d'incubation du test « cefoxitin screen » avec la nouvelle version du système Vitek2® a provoqué une sensibilisation excessive du système aux micro-contaminations auparavant « transparentes » pour l'utilisateur.

De nouvelles recommandations ont été émises par le CNR et diffusées au niveau national lors de la réunion du Club des Utilisateurs VitekMS/Vitek2® (bioMérieux) en novembre 2018. En cas de suspicion de « faux SARM » (cf. profil suspect ci-avant) :

- Renouveler l'antibiogramme sur Vitek2® ou par une autre méthode si la criticité du prélèvement clinique associé n'impose pas un résultat urgent ;
- En cas d'urgence ou de prélèvement critique, utiliser une technique complémentaire rapide (recherche de PLP2a, PCR *mecA/C*) avant de statuer sur le profil SASM / SARM.

4.3 Analyser des tendances et le fonctionnement du système lors de l'alerte

Le système d'alerte décrit au paragraphe 4.1. est fonctionnel depuis de nombreuses années et permet une grande réactivité du CNR et des différents partenaires en cas d'alerte.

Cette année, nous avons eu à investiguer des épidémies aussi bien hospitalières que communautaires avec toujours des épidémies dans les services de néonatalogie. Compte tenu de l'absence d'un clone dominant à l'origine de ces épidémies au niveau national, Il est légitime de proposer que le phénomène observé en néonatalogie soit, au moins en partie, une conséquence des difficultés rencontrés dans les hôpitaux à pourvoir les services spécialisés et à haut risque infectieux comme la néonatalogie par des agents formés et expérimentés en nombre suffisant.

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé, Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

Dans le cadre des échanges et transfert de technologie avec des laboratoires de différents pays, le CNR reçoit régulièrement des biologistes ou étudiants de pays étrangers (en moyenne 1 par an) afin de transmettre des compétences mais ces collaborations permettent aussi de disposer d'un système de veille concernant l'épidémiologie globale et les clones circulants dans des pays tiers qui pour des raisons géographiques, de flux touristiques ou migratoires pourraient constituer des réservoirs de nouveaux clones susceptibles d'être introduits et de disséminer en France.

Dans le cadre d'un accord cadre du ministère des affaires étrangères entre la France et l'Afghanistan et sous l'égide des facultés de pharmacie de Kaboul et de Lyon, le CNR a accepté d'accueillir au cours des trois prochaines années pour une thèse de doctorat à temps partagé (6 mois en France /6 mois en Afghanistan chaque année), le Dr Haji Mohammad NAIMI. Le projet de thèse porte à la fois sur i) sur la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de SASM et de SARM circulants en Afghanistan au sein des hôpitaux (souches nosocomiales), mais aussi dans la communauté (souches de ville), et chez les animaux, ii) sur l'étude des mécanisme de transfert horizontaux SCN-SA de la résistance au linézolide. La rédaction de la publication présentant l'ensemble des résultats est en cours et la soumission devrait se faire d'ici fin juin.

Par ailleurs, le CNR dans le cadre strict de son activité mais aussi de ses liens avec l'unité de recherche (CIRI, INSERM U1111), comme chaque année a accueilli des stagiaires IUT, étudiants en Masters 1, en Master 2, en thèse d'exercice, en thèse de doctorat et Post-doctorants.

Organisation de FMC spécifiques

Les membres du CNR organisent annuellement plusieurs FMC destinées aux biologistes et techniciens de laboratoire :

- . Bioformation "Résistance aux antibiotiques" – module de base (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- . Bioformation "Résistance aux antibiotiques" – module de perfectionnement (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)

. Atelier FMC bioMérieux « Infections ostéo-articulaires »

5.1.2 Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

En 2018, le CNR n'a pas élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

Anne Tristan a participé en 2018 au groupe de travail pour l'élaboration des **recommandations HAS** de bonne pratique sur le thème : « Prise en charge des infections cutanées bactériennes courantes » adoptées par le Collège de la HAS le 27 février 2019.

5.1.3 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :

La rétroinformation et la diffusion aux professionnels vers l'ensemble des partenaires sont faites par différents vecteurs :

Site Internet

Le CNR dispose d'un site internet <http://cnr.univ-lyon1.fr> où figurent l'ensemble des éléments concernant le fonctionnement du CNR (missions générales et spécifiques, coordonnées des membres du CNR, fiches de renseignements), les modalités d'envoi des souches et les fiches devant accompagner tout envoi au CNR, les analyses réalisées par le CNR, les documents concernant les enquêtes en cours (PHRC...), une synthèse concernant les différentes formes d'infections staphylococciques et leurs caractéristiques, les recommandations concernant la prise en charge des infections staphylococciques, les collaborations passées et en cours, les bilans annuels ou quadriennaux, ainsi que les congrès ou formations organisés par le CNR. Les informations pratiques et actualités sont mises à jour régulièrement sur le site. En raison du déménagement du CNR et du changement de serveur du site internet, une refonte en profondeur du site du CNR est prévue pour fin 2019.

Interventions en séminaires FMC et Congrès

Les membres du CNR répondent chaque année à un nombre important de sollicitations dans le cadre de séminaires de formation continue à travers toute la France ou de congrès nationaux ou internationaux afin de présenter (i) la diversité des situations cliniques associées aux infections staphylococciques, (ii) les données cliniques et épidémiologiques collectées par le CNR, (iii) les outils de diagnostic ou de typage disponibles. (Voir liste des publications et communications).

Publications didactiques en français

Afin d'assurer une diffusion large des connaissances et des données colligées par le CNR des staphylocoques auprès de la communauté médicale francophone, le CNR s'est attaché à ne pas limiter ses publications aux seules revues scientifiques internationales indexées mais à publier parallèlement des articles didactiques de synthèse concernant les caractéristiques cliniques, épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques des infections staphylococciques dans des revues à large diffusion auprès des médecins généralistes ou spécialistes et des biologistes hospitaliers et privés (Cf liste des publications et communications).

5.1.4 Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...

Les différentes demandes adressées au CNR sont gérées à travers un colloque hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce colloque permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel et de faire une revue des demandes parvenues au CNR et des réponses adressées aux correspondants. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais en interne et /ou en lien avec les demandeurs et/ou leur(s) tutelle(s) (CPias, ARS, CIRE, Santé Publique France). Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique par courrier (environ 2500 courriers en 2018). En fonction du contexte et de la nature des résultats obtenus,

des contacts téléphoniques sont établis avec les cliniciens et/ou microbiologistes ayant adressé la demande. L'analyse des cas groupés fait l'objet d'un rapport présentant les résultats obtenus et les conseils du CNR afin d'assurer au mieux la gestion de ces épisodes.

Par ailleurs le CNR est quotidiennement sollicité par des microbiologistes extérieurs (par téléphone ou par mail) pour des conseils dans (i) l'interprétation des résultats (notamment d'antibiogramme et recommandations CA-SFM/EUCAST), (ii) la démarche diagnostique, (iii) la prise en charge des patients.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Santé Publique France

Des liens étroits ont été tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR des Staphylocoques et Santé Publique France, notamment l'équipe de Bruno Coignard en charge plus spécifiquement des infections staphylococciques. L'émergence de tout phénomène anormal dans les domaines cliniques (formes cliniques atypiques), épidémiologiques (cas groupés) ou microbiologiques (détection de nouveaux clones, augmentation de prévalence de certains clones) a fait l'objet d'une information auprès de nos correspondants de Santé Publique France par contacts téléphoniques directs ou par mail.

ANSM

Cf paragraphe 4.2.5

Instances Judiciaires

Le CNR est intervenu auprès des instances judiciaires à plusieurs reprises afin d'apporter son expertise pour l'analyse de données et/ou dans la réalisation de travaux dans le cadre de certaines enquêtes à la demande du pôle de santé publique du Tribunal de Grande Instance de Paris ou à celle du tribunal d'Avignon.

ECDC

Frédéric Laurent, en tant que co-directeur du CNR français des Staphylocoques est membre de l'Expert Committee for development of molecular surveillance strategy for MDR/XDR pathogens in the European Union/European Economic Area, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

ECDC – EARSS *Staphylococcus*

Le CNR (représenté par Frédéric Laurent) participe au comité de pilotage du Laboratoire Européen de Référence des Staphylocoques missionné par l'ECDC dont le rôle est de définir, orienter et réaliser les actions de surveillance épidémiologique portant sur *S. aureus* au niveau européen. Il est aussi présent au sein du comité scientifique du programme EARSS-Net *Staphylococcus* qui coordonne les études de surveillance de la résistance et des clones circulants en Europe.

IMMI

L'Institut de Microbiologie et Maladies Infectieuses (IMMI), l'un des 10 instituts thématiques de l'Alliance Aviesan, a initié un projet "REACTing" dont l'objectif est de préparer la recherche à une émergence infectieuse afin de mieux répondre à cette émergence. Ce projet est coordonné par le Pr Yazdan Yazdanpanah et le Dr Bernadette Murgue. Le CNR des staphylocoques est représenté au sein du comité de pilotage de REACTing par un de ses directeurs adjoints, Frédéric Laurent.

ESCMID - ESGS

Le CNR Français est à l'origine de la création en 2013 au sein de l'ESCMID de l'European Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS). Ce groupe comporte actuellement 102 membres issues de 23 pays. Son comité exécutif est formé de 5 personnes dont F. Vandenesch est le vice-chair.

Parmi les multiples missions de ce groupe, deux ont une importance majeure dans le cadre des missions du CNR :

- Organiser un contrôle de qualité externe pour les laboratoires de référence européens. Ce CQE a été organisé par notre CNR en 2017 et en 2018 pour **14 laboratoires** participants de **10 pays d'Europe**
- Organiser une surveillance de la sensibilité diminuée et de la résistance aux glycopeptides et lipoglycopeptides en Europe dans les bactériémies afin d'établir des données d'incidence en lien avec les consommations antibiotiques par centres. Cette étude devrait démarrer en 2019 à l'initiative du CNR français.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

Publications de vulgarisation scientifique et médicale

- Sciences et Avenir. « Tampon bio et cup ne diminuent pas le risque de choc toxique ». 23.04.2018
- Pourquoi Docteur. « Non les tampons bio et les coupes menstruelles ne protègent pas du syndrome du choc toxique » 22.04.2018

Media Grand public

- Journal « Le progrès ». Phagothérapie aux HCL. 14.11.2018
- Journal « VSD ». L'eau des égouts, une arme contre les bactéries. 05.04.2018

Télévision française et internationale

- https://www.lepoint.fr/video/antibiotiques-les-phages-une-alternative-qui-se-concretise-21-03-2019-2302983_738.php
- <https://www.elpais.com.uy/vida-actual/fagos-posible-alternativa-antibioticos.html>
- https://br.noticias.yahoo.com/esperanca-nos-esgotos-173522187.html?guccounter=1&guce_referrer=aHR0cHM6Ly93d3cuZ29vZ2xlLmNvbS8&guce_referrer_sig=AQAAA-G-3doDWCJLzC0uGUXD-SMqSU9BSNt2XsXsKm893bvPFpCut4ZW8ytozdULtzwpwdNiBU8taaZ1MJJVRsZ9L3AygCno27CNf9-OmGamFR4JdfGHhucQZwJbzX1fKDS09xcUN7Q5mur4OhFfk3dfUZJjZmjCFnTOVdKceMzGe9n1x
- <https://www.24heures.ch/savoirs/phages-traitement-derniere-chance/story/10854670>
- <https://fr.news.yahoo.com/phages-traitement-derni%C3%A8re-chance-monsieur-p-082235927.html>
- <https://actu.orange.fr/france/les-phages-traitement-de-la-derniere-chance-pour-monsieur-p-CNT000001dTVcW/photos/un-chirurgien-injecte-des-phages-a-un-patient-le-8-mars-2019-a-l-hopital-de-bron-dans-la-banlieue-de-lyon-24128efdea804097fca3401b5f07cffb.html>
- <https://www.france.tv/france-5/allo-docteurs/523663-infections-osseuses-quelle-prise-en-charge.html>
- <http://tlm.tv/replay/actus-societe/votre-sante>
- <https://pages.rts.ch/emissions/36-9/9500088-phagothérapie-le-traitement-de-la-derniere-chance.html>
- <https://istoe.com.br/os-fagos-uma-alternativa-aos-antibioticos/>
- <https://www.elheraldo.co/salud/los-fagos-una-alternativa-los-antibioticos-que-empieza-concretarse-610072>

Sites internet d'information

- 20 min. Quelles précautions prendre pour éviter le choc toxique lié aux règles. 23.01.2018.
- 20 min. Choc toxique : les tampons bio et les coupes menstruelles ne les empêchent pas. 23.04.2018.
- <https://actu.orange.fr/france/antibiotiques-les-virus-phages-une-alternative-qui-se-concretise-CNT000001dTVd5/photos/des-solutions-de-phages-preparees-a-l-hopital-de-la-croix-rousse-le-8-mars-2019-2aa3a5769e52a3dcc239cefac96ebc87.html>
- https://www.rtf.be/info/societe/detail_les-virus-phages-une-alternative-aux-antibiotiques-qui-se-concretise?id=10175476
- <https://www.la-croix.com/Sciences-et-ethique/Antibiotiques-virus-phages-alternative-concretise-2019-03-20-1301010077>

Média internationaux

- The Independent. Menstrual cups may pose greater risk of toxic shock than tampons. 20.04.2018.
- Dailymail. Even organic tampon and menstrual cups can cause toxic shock. 21.04.2018.
- HealthDay. Even organic tampon and menstrual cups can cause toxic shock. 20.04.2018.
- Today. Toxic shock syndrome risks : Are tampons or menstrual cups safer ? 20.04.2018.
- ABS CBN News. Study warns against organic tampon, menstrual cups. 20.04.2018.
- ConsumerReports. Menstrual cups linked to toxic shock syndrome. 20.04.2018.
- Medical Daly. Toxic shock syndrome : organic tampons no safer than regular. 20.04.2018.
- NZHerald. Menstrual cups found to still cause toxic shock. 23.04.2018.
- TAIPEI TIMES. Organic tampons, cup no safer against toxic shock. 29.04.2018.
- Africa 's Medical Media Digest. Greater risk of toxic shock syndrome from menstrual cups. 25.04.2018.

6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM « **Pathogénie des Staphylocoques** » dirigée par F. Vandenesch. Cette équipe qui a été évaluée très favorablement par l'HCERES et l'INSERM lors de la vague A et a été recréée au 1^{er} janvier 2016, est intégrée au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, Dir F.L. Cosset, Dir Adjoint F. Vandenesch), un centre de recherche labellisé par l'INSERM, le CNRS, l'Université de Lyon et l'École Normale Supérieure de Lyon qui réunit 22 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (<http://ciri.inserm.fr/en/>). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un **axe d'épidémiologie-clinique**, un **axe physiopathologique** et un **axe fondamental** centré sur les mécanismes des régulation de la virulence et les petits ARN. L'axe clinique porte sur l'épidémiologie (y compris dans ses approches génomiques), la résistance et la clinique des infections staphylococciques ; il constitue l'axe le plus directement en lien avec l'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques.

En 2018, les principaux résultats de cette recherche en lien avec le CNR des staphylocoques sont illustrés par les publications et communications présentées ci-dessous et dont la liste complète est détaillée au paragraphe 6.2.

La PVL est un facteur de sévérité des pneumonies communautaires à *S.aureus* chez les sujets de plus de 3 ans. Chez les enfants de moins de 3 ans, les souches productrices de PVL sont responsables de la staphylococcie pleuro-pulmonaire.

Yves Gillet, Coralie Bouchiat, Anne Tristan, Mitra Saadatian-Elahi, Jean-Philippe Rasigade, Michele Bes, Oana Dumitrescu, Tuxuan Nhan, Marie Leloir, Claude-Alexandre Gustave, Céline Dupieux, Frédéric Laurent, Philippe Vanhems, Gérard Lina, Jerome Etienne, Laurent Argaud, Francois Vandenesch.

PVL Impacts Mortality Above 3-year in Severe Staphylococcal Community-Acquired Pneumonia. Présenté en communication orale à la RICAI 2018 ; article en préparation.

Abstract. Background. *S.aureus* Panton Valentine Leukocidin (PVL) has been associated with severe community acquired pneumonia (CAP). The question arises whether PVL is an independent factor of severity in *S.aureus* CAP. To address this issue, all French hospitals were asked to prospectively include their cases of staphylococcal CAP requiring intensive care (ICU) between January 2011 and December 2016. Method. Patients with CAP who fulfilled the following criteria were included: a) clinical signs of lung infection, b) X-ray signs of pneumonia, c) at least one microbiological assessment of *S.aureus* involvement (positive blood/pleural fluid culture or positive respiratory sample), d) admission to ICU. At the time of data collection, clinicians were not aware of PVL status. Strains were referred to the Centre National de Référence des Staphylocoques for characterization. Results. 163 patients, aged from one month to 87 years, were included, 52.1% were PVL-positive. PVL distribution according to age showed an overwhelming prevalence in young children (92.6% below 18 yrs). For patient above one year, mortality was higher in

PVL+ (46.9% vs 26.9% p=0.014). Other factors associated with PVL were the absence of underlying illness, a high SOFA score, the need for ECMO and high lactate and PCT levels. Mortality was higher in presence of hemoptysis, cutaneous rash and high blood-lactate but was not influenced by appropriateness of antibiotic treatment. Conclusion. This is the first and largest prospective cohort of staphylococcal pneumonia comparing PVL-positive and -negative cases. The high prevalence of PVL in severe CAP contrast with <5% carriage in the general population, indicating by itself a link between PVL and severity. For patient above one year, this is confirmed by the worse outcome of PVL cases, despite initial favorable conditions (youngest age and absence of underlying disease). Some factors associated with death (hemoptysis) are associated with PVL whereas some other (rash and methicillin resistance) appeared to be less specific. In addition, we uncover for the first time an association of PVL with the specific presentation of staphylococcal CAP in <1-year children, characterized by less hemoptysis and leucopenia, more pleural effusion and a lower mortality, matching with the historical description of staphylococcal pleuro-pneumonia in children.

Diffusion planétaire de lignées de *S. epidermidis* multi-résistants.

Lee JYH, Monk IR, Gonçalves da Silva A, Seemann T, Chua KYL, Kearns A, Hill R, Woodford N, Bartels MD, Strommenger B, Laurent F, Dodémont M, Deplano A, Patel R, Larsen AR, Korman TM, Stinear TP, Howden BP.

Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*.

Nat Microbiol. 2018 Oct;3(10):1175-1185.

Abstract. *Staphylococcus epidermidis* is a conspicuous member of the human microbiome, widely present on healthy skin. Here we show that *S. epidermidis* has also evolved to become a formidable nosocomial pathogen. Using genomics, we reveal that three multidrug-resistant, hospital-adapted lineages of *S. epidermidis* (two ST2 and one ST23) have emerged in recent decades and spread globally. These lineages are resistant to rifampicin through acquisition of specific rpoB mutations that have become fixed in the populations. Analysis of isolates from 96 institutions in 24 countries identified dual D471E and I527M RpoB substitutions to be the most common cause of rifampicin resistance in *S. epidermidis*, accounting for 86.6% of mutations. Furthermore, we reveal that the D471E and I527M combination occurs almost exclusively in isolates from the ST2 and ST23 lineages. By breaching lineage-specific DNA methylation restriction modification barriers and then performing site-specific mutagenesis, we show that these rpoB mutations not only confer rifampicin resistance, but also reduce susceptibility to the last-line glycopeptide antibiotics, vancomycin and teicoplanin. Our study has uncovered the previously unrecognized international spread of a near pan-drug-resistant opportunistic pathogen, identifiable by a rifampicin-resistant phenotype. It is possible that hospital practices, such as antibiotic monotherapy utilizing rifampicin-impregnated medical devices, have driven the evolution of this organism, once trivialized as a contaminant, towards potentially incurable infections.

Dynamique des échanges des *S. aureus* entre l'homme et les animaux d'élevage en milieu rural

Akkou M, Bouchiat C, Antri K, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Martins-Simoes P, Rasigade JP, Etienne J, Vandenesch F, Ramdani-Bougoussa N, Laurent F.

New host shift from human to cows within *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis and nasal carriage of animal's caretakers.

Vet Microbiol. 2018 Sep;223:173-180.

Abstract. *Staphylococcus aureus* is a commensal and pathogen of both humans and bovines. While the epidemiology of both groups has been extensively studied individually, little is known about the potential zoonotic transfer from animal strains to human being and vice versa. To determine the *S. aureus* prevalence of bovine mastitis in Algeria and the zoonotic transfer of strains to human beings, mastitis milk samples were collected, and professionals in a close contact with bovines were nasal swabbed. *S. aureus* isolates were all characterized by methicillin resistance and spa-typing. DNA microarrays analysis was performed on a subset of strains in order to detect other virulence factors, including toxins, and to assign the isolates to their MLST clonal complexes. Overall, 116/222 (52.3%) cows suffered from mastitis, whose 38.8% (45/116) infected with *S. aureus*. Human nasal carriage was of 38% (49/129), with only 4 MRSA carriers (3.1%). A higher diversity of spa-types was observed in human (35/50) than in bovine (18/67) isolates, with a predominance of clonal complexes CC97 and CC22 in bovines. The typical animal clone CC97 was occasionally

detected in human beings. Conversely, the CC22 *S. aureus* clone largely switched from humans to bovines. Our study highlights the potential dynamics of animal and human *S. aureus* strains in the farm environment in Algeria, which may represent a health threat in both populations.

Un contrôle de qualité externe organisé par le CNR Français pour les CNR européens révèle globalement de bonnes concordances mais aussi les limites du NGS

Deplano A, Dodémont M, Denis O, Westh H, Gumpert H, Larsen AR, Larsen J, Kearns A, Pichon B, Layer F, Schulte B, Wolz C, Spiliopoulou I, Brennan G, Empel J, Hryniewicz W, de Lencastre H, Faria NA, Codita I, Sabat AJ, Friedrich AW, Deurenberg RH, [Tristan A](#), [Laurent F](#), [Vandenesch F](#).

European external quality assessments for identification, molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus*.

J Antimicrob Chemother. 2018 Oct 1;73(10):2662-2666.

Abstract. Objectives. We present the results of two European external quality assessments (EQAs) conducted in 2014 and 2016 under the auspices of the Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections of ESCMID. The objective was to assess the performance of participating centres in characterizing *Staphylococcus aureus* using their standard in-house phenotypic and genotypic protocols.

Methods. A total of 11 well-characterized blindly coded *S. aureus* (n = 9), *Staphylococcus argenteus* (n = 1) and *Staphylococcus capitis* (n = 1) strains were distributed to participants for analysis. Species identification, MIC determination, antimicrobial susceptibility testing, antimicrobial resistance and toxin gene detection and molecular typing including *spa* typing, *SCCmec* typing and MLST were performed.

Results. Thirteen laboratories from 12 European countries participated in one EQA or both EQAs. Despite considerable diversity in the methods employed, good concordance (90%-100%) with expected results was obtained. Discrepancies were observed for: (i) identification of the *S. argenteus* strain; (ii) phenotypic detection of low-level resistance to oxacillin in the *mecC*-positive strain; (iii) phenotypic detection of the inducible MLSB strain; and (iv) WGS-based detection of some resistance and toxin genes.

Conclusions. Overall, good concordance (90%-100%) with expected results was observed. In some instances, the accurate detection of resistance and toxin genes from WGS data proved problematic, highlighting the need for validated and internationally agreed-on bioinformatics pipelines before such techniques are implemented routinely by microbiology laboratories. We strongly recommend all national reference laboratories and laboratories acting as referral centres to participate in such EQA initiatives.

La clindamycine conserve son activité anti-toxinique chez les souches présentant une résistance MLSb inducible.

Hodille E, Badiou C, [Bouveyron C](#), [Bes M](#), [Tristan A](#), [Vandenesch F](#), [Lina G](#), [Dumitrescu O](#).

Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2018 Oct 20;17(1):38.

Abstract. Clindamycin is a protein synthesis inhibitory agent that has the ability to suppress the expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. Recent guidelines recommend the use of clindamycin for the treatment of toxin-mediated infections. Clindamycin modulates virulence expression at sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) in clindamycin-susceptible *S. aureus* strains but previous report shown that this effect was suppressed for constitutive clindamycin resistant strains. However, no data are currently available on the impact of clindamycin at sub-MICs on the virulence of inducible clindamycin-resistant *S. aureus* strains. Here, we show that sub-MICs of clindamycin decrease Panton-Valentine leucocidin, toxic-shock-staphylococcal toxin (TSST-1) and alpha-haemolysin (Hla) expression in six inducible clindamycin-resistant isolates cultivated in vitro in CCY medium. These results suggest that the clindamycin anti-toxin effect is retained for inducible clindamycin-resistant *S. aureus* isolates; therefore, its usage should be considered within the treatment regimen of toxin related infections for inducible clindamycin-resistant *S. aureus*.

Les coupes menstruelles en silicone, peuvent favoriser la production de toxine du choc toxique staphylococcique

Nonfoux L, Chiaruzzi M, Badiou C, Baude J, Tristan A, Thioulouse J, Muller D, Prigent Combaret C, Lina G.

Impact of currently marketed tampons and menstrual cups on *Staphylococcus aureus* growth and TSST-1 production *in vitro*.

Appl Environ Microbiol. 2018 May 31;84(12).

Abstract. Fifteen currently marketed intravaginal protection products (11 types of tampon and four menstrual cups) were tested by the modified tampon sac method to determine their effect on *Staphylococcus aureus* growth and toxic shock toxin 1 (TSST-1) production. Most tampons reduced *S. aureus* growth and TSST-1 production, with differences based on brand and composition, and *S. aureus* growth was higher in de-structured than in unaltered tampons. We observed higher *S. aureus* growth and toxin production in menstrual cups than in tampons, potentially due to the additional air introduced to the bag by cups, with differences based on cup composition and size. **IMPORTANCE** Menstrual toxic shock syndrome is a rare but severe disease. It occurs in healthy women vaginally colonized by *Staphylococcus aureus* producing toxic shock syndrome toxin 1 using intravaginal protection such as tampons or menstrual cups. Intravaginal protection induces TSS production by collecting catamenial products which act as a growth medium for *S. aureus*. Previous studies have evaluated the impact of tampon composition on *S. aureus* producing toxic shock syndrome toxin 1, but they are not recent and did not include menstrual cups. This study demonstrates that highly reproducible results for *S. aureus* growth and TSST-1 production can be obtained using a simple protocol that reproduces the physiological conditions of tampon and cup usage as closely as possible, providing recommendations for tampon or cup use to both manufacturers and consumers. Notably, our results do not show that menstrual cups are safer than tampons and suggest that they require similar precautions.

Le séquençage génome entier comme outil de typage, d'investigation de cas groupés et d'épidémies au CNR des Staphylocoques.

Durand G, Javerliat F, Bes M, Veyrieras JB, Guigon G, Mugnier N, Schicklin S, Kaneko G, Santiago-Allexant E, Bouchiat C, Martins-Simões P, Laurent F, Van Belkum A, Vandenesch F, Tristan A.

Routine Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of *Staphylococcus aureus* in a National Reference Center.

Front Microbiol. 2018 Mar 20;9:511.

Abstract. The French National Reference Center for Staphylococci currently uses DNA arrays and *spa* typing for the initial epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* strains. We here describe the use of whole-genome sequencing (WGS) to investigate retrospectively four distinct and virulent *S. aureus* lineages [clonal complexes (CCs): CC1, CC5, CC8, CC30] involved in hospital and community outbreaks or sporadic infections in France. We used a WGS bioinformatics pipeline based on de novo assembly (reference-free approach), single nucleotide polymorphism analysis, and on the inclusion of epidemiological markers. We examined the phylogeographic diversity of the French dominant hospital-acquired CC8-MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) Lyon clone through WGS analysis which did not demonstrate evidence of large-scale geographic clustering. We analyzed sporadic cases along with two outbreaks of a CC1-MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) clone containing the Pantone-Valentine leukocidin (PVL) and results showed that two sporadic cases were closely related. We investigated an outbreak of PVL-positive CC30-MSSA in a school environment and were able to reconstruct the transmission history between eight families. We explored different outbreaks among newborns due to the CC5-MRSA Geraldine clone and we found evidence of an unsuspected link between two otherwise distinct outbreaks. Here, WGS provides the resolving power to disprove transmission events indicated by conventional methods (same sequence type, *spa* type, toxin profile, and antibiotic resistance profile) and, most importantly, WGS can reveal unsuspected transmission events. Therefore, WGS allows to better describe and understand outbreaks and (inter-)national dissemination of *S. aureus* lineages. Our findings underscore the importance of adding WGS for (inter-)national surveillance of infections caused by virulent clones of *S. aureus* but also substantiate the fact that technological optimization at the bioinformatics level is still urgently needed for routine use. However, the greatest limitation of WGS analysis is the completeness and the correctness of the reference database being used and

the conversion of floods of data into actionable results. The WGS bioinformatics pipeline (EpiSeq™) we used here can easily generate a uniform database and associated metadata for epidemiological applications.

La pollution environnementale par les antibiotiques est probablement à l'origine de l'émergence des SARM communautaires ST80 et USA300.

Gustave CA, Tristan A, Martins-Simões P, Stegger M, Benito Y, Andersen PS, Bes M, Le Hir T, Diep BA, Uhlemann AC, Glaser P, Laurent F, Wirth T, Vandenesch F.

Demographic fluctuation of community-acquired antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* lineages: potential role of flimsy antibiotic exposure.

ISME J. 2018 Aug;12(8):1879-1894.

Abstract. Community-acquired (CA)- as opposed to hospital acquired- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineages arose worldwide during the 1990s. To determine which factors, including selective antibiotic pressure, govern the expansion of two major lineages of CA-MRSA, namely "USA300" in Northern America and "European ST80" in North Africa, Europe and Middle-East, we explored virulence factor expression, and fitness levels with or without antibiotics. The sampled strains were collected in a temporal window representing various steps of the epidemics, reflecting predicted changes in effective population size as inferred from whole-genome analysis. In addition to slight variations in virulence factor expression and biofilm production that might influence the ecological niches of these lineages, competitive fitness experiments revealed that the biological cost of resistance to methicillin, fusidic acid and fluoroquinolones is totally reversed in the presence of trace amount of antibiotics. Our results suggest that low-level antibiotics exposure in human and animal environments contributed to the expansion of both European ST80 and USA300 lineages in community settings. This surge was likely driven by antibiotic (ab)use promoting the accumulation of antibiotics as environmental pollutants. The current results provide a novel link between effective population size increase of a pathogen and a selective advantage conferred by antibiotic resistance.

Un milieu chromogénique commercial peut être repositionné pour la détection du *Staphylococcus capitis* multi-résistant présent en néonatalogie.

Butin M, Dumont Y, Rasigade JP, Martins Simoes P, Hoden L, Picaud JC, Laurent F.

Chromogenic detection procedure for the multidrug-resistant, neonatal sepsis-associated clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2018 Feb;90(2):81-82.

Abstract. The multiresistant *Staphylococcus capitis* clone NRCS-A is a major pathogen in neonates worldwide. We show that NRCS-A grows as mauve colonies with a cream-color halo after a 5-day incubation on MRSA Brilliance 2 agar (Oxoid®). This innovative protocol will ease the screening of clinical and environmental niches of this clone.

Une branche du SARM européen (ST80) ne possède pas les gènes codant la Leucocidine de Panton-Valentine.

Edslev SM, Westh H, Andersen PS, Skov R, Kobayashi N, Bartels MD, Vandenesch F, Petersen A, Worning P, Larsen AR, Stegger M.

Identification of a PVL-negative SCCmec-IVa sublineage of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA.

Clin Microbiol Infect. 2018 Mar;24(3):273-278.

Abstract. Objectives: Community-acquired (CA) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates belonging to clonal complex 80 (CC80) are recognized as the European CA-MRSA. The prevailing European CA-MRSA clone carries a type IVc staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and expresses Panton-Valentine leukocidin (PVL). Recently, a significant increase of PVL-negative CC80 MRSA has been observed in Denmark. The aim of this study was to examine their genetics and epidemiology, and to compare them to the European CA-MRSA clone in order to understand the emergence of PVL-negative CC80 MRSA.

Methods: Phylogenetic analysis of the CC80 *S. aureus* lineage was conducted from whole-genome sequences of 217 isolates (23 methicillin-susceptible *S. aureus* and 194 MRSA) from 22 countries. All isolates were further genetically

characterized in regard to resistance determinants and PVL carriage, and epidemiologic data were obtained for selected isolates.

Results: Phylogenetic analysis revealed the existence of three distinct clades of the CC80 lineage: (a) an methicillin-susceptible *S. aureus* clade encompassing Sub-Saharan African isolates (n = 13); (b) a derived clade encompassing the European CA-MRSA SCCmec-IVc clone (n = 185); and (c) a novel and genetically distinct clade encompassing MRSA SCCmec-IVa isolates (n = 19). All isolates in the novel clade were PVL negative, but carried remnant parts (8-12 kb) of the PVL-encoding prophage Φ Sa2 and were susceptible to fusidic acid and kanamycin/amikacin. Geospatial mapping could link these isolates to regions in the Middle East, Asia and South Pacific.

Conclusions: This study reports the emergence of a novel CC80 CA-MRSA sublineage, showing that the CC80 lineage is more diverse than previously assumed.

Description de la première épidémie de staphylocoques résistants aux oxazolidinones due à la diffusion concomitante de deux sous-populations du « clone australien ST2 multi-résistant de diffusion mondiale » et au transfert de son plasmide *cfr+* à différents clones de *S. aureus*.

André C, Martins-Simões P, Cortês Farrel M, Cremet L, Bemer P, Corvec S, Caillon J, Vandenesch F, Dupieux-Chabert C, Laurent F.

Article en preparation

Abstract. The emergence of plasmidic linezolid resistances is a global concern because of the risk of intra- and inter-species horizontal transfer of the resistance genes. The aim of the present study was to characterize at the molecular level a series of staphylococci isolated in the same French hospital and harboring the *cfr* gene.

Materials/methods. Seven isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) and 3 isolates of *S. aureus* (SA; MRSA, n=1 and MSSA, n=2) resistant to linezolid were isolated from 10 different patients in the Nantes University Hospital between 2015 and 2017. Linezolid resistance was confirmed using MIC determination (Etest®), PCR screening for *cfr*/*optrA*/*poxTA* genes and PCR-sequencing of the genes encoding the 23S rRNA and the ribosomal proteins. The 10 strains were sequenced (Illumina) and the sequences analyzed to i) perform an in silico MLST typing, ii) characterize the *cfr*-positive plasmids, iii) construct a core-genome SNP based phylogenetic tree including all ST2 *S. epidermidis* (SE) genomes publically available to assess the potential clonality of MRSE collected in Nantes.

Results. The 10 strains were phenotypically resistant to linezolid. The WGS analysis showed that all 7 MRSE isolates belonged to the same lineage (ST2) whereas SA strains belonged to 3 different lineages (ST8, ST72 and ST2416).

SNP based phylogeny of ST2 lineage revealed that 9/10 MRSE isolates were clonal. Of note, these 9 MRSE isolates clustered with the MDR worldwide-disseminated “Australian” ST2 MRSE clone and harboured the two specific *ropB* mutations conferring rifampin resistance described in this clone (Lee , 2018 Nature Microbiology)

Finally, all SA and MRSE strains harboured the same *cfr+*-plasmid (pSA737) evidenced of an horizontal transfer of this plasmid between different SA/SE genetic backgrounds.

Conclusions. We report the first outbreak of oxazolidinone resistance in staphylococci due to both i) the dissemination of one of the MDR worldwide-disseminated “Australian” MRSE recently described which acquired a supplemental resistance due to a *cfr+* plasmid, ii) the horizontal genetic transfer of this same plasmid to several SA/SE lineages.

Etude phylogénétique de la diffusion mondiale du clone multirésistant *S. capitis* NRCS-A et de sa spécialisation en termes de niche écologique

Wirth T, Bergot M, Rasigade J-P, Pichon B, Barbier M, Martins-Simoes P, Tissieres P, Supply P, Kearns A, Butin M, Laurent F

Abstract. Multidrug resistant *Staphylococcus capitis* are playing an increasing role in neonatal intensive care units (NICUs) where these bacteria are responsible for neonatal sepsis. Yet, all *Staphylococcus capitis* lineages are not equal, some of them are sporadically involved in infections in adult patients whereas others like the multidrug resistant worldwide endemic NRCS-A clone go through unprecedented waves of propagation in NICUs. Here, we leveraged a unique, genetically diverse worldwide strain collection of *Staphylococcus capitis* from adults, children and neonates, including representatives of the endemic NRCS-A clone, in order to determine the reasons behind its success. Genome sequencing and phylogenetic analyses of 250 isolates, covering the global distribution of the species, highlighted a

deep split between the main lineages and an important role of homologous recombination in the adaptive diversification of this species. Bayesian demogenetic analyses confirmed the success of the NRCS-A clone that emerged in the late 1960's, coinciding with both the rise of NICUs and the use of vancomycin. Interestingly, the demographic surge and the geographic spread were accompanied by a number of adaptive mutations that sharply differentiate the neonate NRCS-A clone from its less specialized direct progenitor. Furthermore gene acquisitions related to resistance to antibiotics (SCCmec cassette) or antimicrobial peptides (nisin) were detected, as well as transfers related to synthesis of alternative cell-wall associated teichoic-acids, suggesting a potential fitness increase in the ability of this clone to colonize the host tissues. Last but not least, NRCS-A isolates showed high frequency of resistance to antibiotics, especially glycopeptides, and acquisition of vancomycin resistance under selective pressure has been identified as a major driver of epidemic success in newborn-adapted *S. capitis* clades. These swift changes are the scars of the selective pressures imposed by the host and the neonatal settings, and contribute to our understanding of the adaptive landscape of a successful highly specialized sublineage.

Etude phylogénétique de l'évolution de la structure des population de *Staphylococcus pseudintermedius* responsable d'infections animales en France.

Front Microbiol. 2018 Dec 13;9:3055. doi: 10.3389/fmicb.2018.03055. eCollection 2018.

Bergot M, Martins-Simoes P, Kilian H, Châtre P, Worthing KA, Norris JM, Madec JY, Laurent F, Haenni M.

Abstract

Staphylococcus pseudintermedius is a colonizer as well as an important pathogen of dogs where it is responsible for skin, ear and post-operative infections. The emergence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) in the early 2000s, which were additionally resistant to most veterinary-licensed antibiotics, drew specific attention to these pathogens due to the limitations created in veterinary therapeutic options. Multiple studies showed that the sequence type (ST)71 was the most frequently identified clone in Europe. A few years ago, several publications have suggested a decline of the ST71 clone and the emergence of the ST258 lineage in Northern Europe. In this study, we show that ST71 is also decreasing over time in France and that the non-ST71 population is highly heterogeneous. Globally, the non-ST71 clones are more susceptible to antibiotics, which might be good news for veterinarians. Two other lineages, ST258 and ST496, seem to be successful in France. These isolates, as well as representatives of the ST71 clone, underwent whole-genome sequence. This study shows that the ST71 and ST496 clusters are highly homogenous while the ST258 cluster is more diverse. Each ST possesses a specific pattern of resistance and virulence genes. The reasons for the apparent and simultaneous success of the ST258 and ST496 clones remain unclear. But the emergence of the ST496 clone will require monitoring given its multi-resistant genotype and threat to canine health.

Efficacité d'un cocktail de phages seul ou en association avec des antibiotiques contre les staphylocoques intra-ostéoblastiques et intrabiofilm

Kolenda C, Josse J, Medina M, Fevre C, Lustig S, [Ferry T](#), [Laurent F](#)

Article en cours de rédaction

Abstract. *Staphylococcus aureus* is the first causative agent of bone and joints infections (BJI). It is responsible of difficult-to-treat infections because of its ability to form biofilms, and to be internalized and persist inside osteoblastic cells. Recently, phage therapy has emerged as a promising therapy to improve the management of chronic BJI. In the present study, we evaluated the efficacy of an assembly of three bacteriophages previously used in a clinical case report (Ferry, 2018) against *S. aureus* in in vitro models of biofilm and intracellular osteoblast infection.

Methods: Using HG001 *S. aureus*, the bactericidal activities of the assembly of the three bacteriophages (Pherecydes Pharma) used alone or in association with vancomycin or rifampicin were compared by quantifying the number of viable bacteria in mature biofilms and infected osteoblasts after 24h of exposure.

Results: The activity of bacteriophages against biofilm-embedded *S. aureus* was dose-dependent and not significantly different from rifampicin. Additive effects were observed for bacteriophages+vancomycin (almost all concentrations) and between rifampicin+bacteriophages (lowest concentrations). The intracellular inoculum after vancomycin or bacteriophages treatment was significantly higher than in cells treated with lysostaphin, used as control condition of rapid killing of bacteria released in the extracellular media after death of infected cells, suggesting that their bactericidal

activity in extracellular media, when used alone, was too slow to prevent re-infection of osteoblasts by these released bacteria. Conversely, the intracellular inoculum recovered from cells treated by vancomycin+bacteriophages was significantly lower than that recovered from cells treated by vancomycin or bacteriophages alone, suggesting that this combination allowed a better control of released bacteria in the extracellular media and prevented the subsequent re-infection of osteoblasts. Interestingly, both bacteriophages titrations in cellular lysates and electronic microscopy observations of infected osteoblasts treated with bacteriophages highlighted the presence of numerous intracellular bacteriophages suggesting that bacteriophages were able to get inside cells but were inactive in the intracellular compartment.

Conclusion: Our preliminary results showed that the bacteriophages tested are highly active against biofilm-embedded *S. aureus* and may represent a promising adjuvant therapy to treat BJI, i.e when vancomycin is used.

Compréhension des facteurs de virulence chez *Staphylococcus pseudintermedius*: rôle majeur des toxines formant des pores

Maali Y, Badiou C, Martins Simoes P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, Lina G, Diot A, Trouillet-Assant S, Laurent F.
Article en cours de rédaction.

Abstract. *Staphylococcus pseudintermedius* is responsible for very severe and necrotizing infections in human and dogs. Contrary to *S. aureus*, the pathophysiological mechanisms involved in this severity are not yet described. Our study aimed at identifying the virulence factors of *S. pseudintermedius* involved in necrotizing infections. **Materials/methods:** *S. pseudintermedius* bacterial supernatants cytotoxicity on non-professional phagocytic cells (NPPc) MG63 was measured by assaying the LDH release in the cell culture medium after 4h of contact. To identify the toxins responsible of cell death, we evaluated the cytotoxicity of purified Luk-I and phenols-soluble modulins (PSMs) by propidium iodide labeling on MG-63. Moreover, due to the high level of homology between Luk-I and *S. aureus* PVL, we performed these assay on U937 cells and its mutant transfected with the C5a receptor which is the PVL receptor. Concerning PSMs, their presences were quantified in *S. pseudintermedius* supernatants by HPLC-MS. **Results:** MG63 cells incubated with *S. pseudintermedius* supernatant released high level of LDH, demonstrating that this cytotoxicity is mainly mediated by secreted factors. In silico analysis revealed the presence of two type of PSMs (Hld and PSM ϵ) and Luk-I toxin. The recombinant Luk-I toxin showed no cytotoxic activity on NPPc. The ectopic expression of the C5a receptor in U937 cells conferred to Luk-I a cytotoxic action. This mirrors the C5a-dependant activity of *S. aureus* PVL and explains the lack of Luk-I effect on MG63. Contrary to Luk-I, the PSMs showed a very strong cytotoxic activity on NPPc. HPLC-MS analysis of bacterial supernatants confirmed the secretion of Hld and PSM ϵ at cytotoxic concentrations by *S. pseudintermedius*. The addition of human serum, which is known to inhibit PSM action, on these supernatants induced a complete abolition of cytotoxicity which suggests that PSMs are the key players in the cytotoxic phenotype of NPPc.

Conclusions: These results suggest that the severity of *S. pseudintermedius* infections could be explained by a combined action of (i) Luk-I which specifically targets immune cells expressing the C5a receptor, like PVL *S. aureus*, and (ii) PSMs disrupting all cell membrane. Our results strengthen the key role of PSMs in staphylococcal virulence.

Biomatériaux orthopédiques et biofilm chez les Staphylocoques à coagulase négative

Maali Y, Monteix A, Clerc PA, Tasse J, Valour F, Batailler C, [Ferry T](#), Josse J, Trouillet-Assant S, [Laurent F](#).

Article en cours de rédaction

Abstract. La formation d'un biofilm sur les matériaux prothétiques et d'ostéosynthèse constitue un mécanisme physiopathologique majeur dans les infections ostéo-articulaires (IOA). Les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont les pathogènes les plus incriminés dans ces infections. Au travers de cette étude, nous avons évalué l'impact de différents biomatériaux utilisés en orthopédie sur les capacités de formation du biofilm pour plusieurs espèces de SCN.

Matériels (ou Patients) et méthodes. Six espèces de SCN ont été étudiées à l'aide d'une collection de souches cliniques responsables d'IOA mono-microbiennes (CRIOAC Lyon) : *S. capitis* (n=5), *S. caprae* (n=5), *S. epidermidis* (n=5), *S. haemolyticus* (n=5), *S. lugdunensis* (n=5), *S. warneri* (n=5). Les biomatériaux orthopédiques étudiés ont été l'acier

inoxydable (AISI 316L), le titane (TA6V) et le polyéthylène de très haut poids moléculaire (UHMWPE). Le polystyrène (PS) qui constitue classiquement les plaques 96 puits utilisés pour les tests de biofilm a aussi été testé. Produits sur mesure sous la forme de plot cylindrique (Groupe Lepine ®), les matériaux étaient préalablement stérilisés par rayonnement Gamma. Le biofilm formé sur la surface des biomatériaux, avec ou sans coating en sérum humain, a été mesuré après 24h à 37°C par dénombrement sur boîtes (UFC/mm²).

Résultats. Une hétérogénéité de comportement a été observée entre les différentes espèces de SCN (Kruskal-Wallis: $p < 0.0001$). Les espèces *S. capitis*, *S. epidermidis* et *S. lugdunensis* ont montré une capacité de formation de biofilm significativement supérieure aux espèces *S. haemolyticus* et *S. warneri* (Test de Dunn's: $p < 0.05$). Par ailleurs, les données montrent des capacités de formation de biofilm identique pour les trois biomatériaux orthopédiques (Kruskal-Wallis: $p = 0.61$). En revanche, on note une capacité réduite de formation du biofilm sur PS pouvant s'expliquer par des propriétés de surface plus lisse (Test de Dunn's: $p < 0.05$). Enfin, quel que soit l'espèce ou le biomatériau étudié, les résultats montrent que le coating en sérum humain ne contribue pas à augmenter significativement la formation du biofilm.

Conclusion. La nature des biomatériaux utilisés en orthopédie ne semble pas impacter la formation du biofilm chez les SCN. En revanche, l'espèce joue un rôle majeur sur l'établissement du biofilm sur ces biomatériaux dans le cadre des IOA.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

(i) Publications nationales, (ii) Publications internationales

Bergot M, Martins-Simoes P, Kilian H, Châtre P, Worthing KA, Norris JM, Madec JY, Laurent F, Haenni M.

Evolution of the Population Structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France.

Front Microbiol. 2018 Dec 13;9:3055.

Javouhey E, Bolze PA, Jamen C, Lina G, Badiou C, Poyart C, Portefaix A, Tristan A, Laurent F, Bes M, Vandenesch F, Gilletand Y, Dauwalder O.

Similarities and Differences Between Staphylococcal and Streptococcal Toxic Shock Syndromes in Children: Results From a 30-Case Cohort.

Front Pediatr. 2018 Nov 28;6:360.

Ferry T, Leboucher G, Fevre C, Herry Y, Conrad A, Josse J, Batailler C, Chidiac C, Medina M, Lustig S, Laurent F; Lyon BJI Study Group .

Salvage Debridement, Antibiotics and Implant Retention ("DAIR") With Local Injection of a Selected Cocktail of Bacteriophages: Is It an Option for an Elderly Patient With Relapsing *Staphylococcus aureus* Prosthetic-Joint Infection?

Open Forum Infect Dis. 2018 Oct 24;5(11):ofy269.

Hubiche T, Chiaverini C, Goujon E, Bourrat E, Bes M, Del Giudice P, Boralevi F; 'Groupe de Recherche de la Société Française de Dermatologie Pédiatrique'.

Multiple neonatal staphylococcal cold abscesses in large skin folds: a benign neonatal skin infection.

J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019 Mar;33(3):e125-e128.

Ferry T, Batailler C, Conrad A, Triffault-Fillit C, Laurent F, Valour F, Chidiac C; Lyon BJI Study Group .

Correction of Linezolid-Induced Myelotoxicity After Switch to Tedizolid in a Patient Requiring Suppressive Antimicrobial Therapy for Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Prosthetic-Joint Infection.

Open Forum Infect Dis. 2018 Sep 25;5(10):ofy246. doi: 10.1093/ofid/ofy246. eCollection 2018 Oct. No abstract available.

Jeannoël M, Lina G, Rasigade JP, Lina B, Morfin F, Casalegno JS.

Microorganisms associated with respiratory syncytial virus pneumonia in the adult population.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Jan;38(1):157-160.

Hodille E, Badiou C, Bouveyron C, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O.
Clindamycin suppresses virulence expression in inducible clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.
Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2018 Oct 20;17(1):38.

Bonnet I, Millon B, Meugnier H, Vandenesch F, Maurin M, Pavese P, Boisset S.
High prevalence of spa type t571 among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients in a French University Hospital.
PLoS One. 2018 Oct 9;13(10):e0204977.

Gillet Y, Henry T, Vandenesch F.
Fulminant Staphylococcal Infections.
Microbiol Spectr. 2018 Oct;6(5).

Rigaill J, Grattard F, Grange S, Forest F, Haddad E, Carricajo A, Tristan A, Laurent F, Botelho-Nevers E, Verhoeven PO.
Community-Acquired *Staphylococcus argenteus* Sequence Type 2250 Bone and Joint Infection, France, 2017.
Emerg Infect Dis. 2018 Oct;24(10):1958-1961.

Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, Van Kessel KPM, Bardoel BW, Kruse E, Bourdonnay E, Boettcher M, McManus MT, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, Van Strijp JAG, Lebbink RJ, Haas PA, Henry T, Spaan AN.
Publisher Correction: Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Pantone-Valentine leukocidin.
Nat Microbiol. 2018 Oct;3(10):1187.

Lee JYH, Monk IR, Gonçalves da Silva A, Seemann T, Chua KYL, Kearns A, Hill R, Woodford N, Bartels MD, Strommenger B, Laurent F, Dodémont M, Deplano A, Patel R, Larsen AR, Korman TM, Stinear TP, Howden BP.
Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*.
Nat Microbiol. 2018 Oct;3(10):1175-1185.

Akkou M, Bouchiat C, Antri K, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Martins-Simoes P, Rasigade JP, Etienne J, Vandenesch F, Ramdani-Bouguessa N, Laurent F.
New host shift from human to cows within *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis and nasal carriage of animal's caretakers.
Vet Microbiol. 2018 Sep;223:173-180.

Burdet C, Loubet P, Le Moing V, Vindrios W, Esposito-Farèse M, Linard M, Ferry T, Massias L, Tattevin P, Wolff M, Vandenesch F, Grall N, Quintin C, Mentré F, Duval X, Lescure FX; CloCeBa study group.
Efficacy of cloxacillin versus cefazolin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia (CloCeBa): study protocol for a randomised, controlled, non-inferiority trial.
BMJ Open. 2018 Sep 1;8(8):e023151.

Tasse J, Trouillet-Assant S, Josse J, Martins-Simões P, Valour F, Langlois-Jacques C, Badel-Berchoux S, Provot C, Bernardi T, Ferry T, Laurent F.
Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections.
PLoS One. 2018 Aug 30;13(8):e0200064.

Deplano A, Dodémont M, Denis O, Westh H, Gumpert H, Larsen AR, Larsen J, Kearns A, Pichon B, Layer F, Schulte B, Wolz C, Spiliopoulou I, Brennan G, Empel J, Hryniewicz W, de Lencastre H, Faria NA, Codita I, Sabat AJ, Friedrich AW, Deurenberg RH, Tristan A, Laurent F, Vandenesch F.
European external quality assessments for identification, molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus*.
J Antimicrob Chemother. 2018 Oct 1;73(10):2662-2666.

Monecke S, Slickers P, Gawlik D, Müller E, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, Akpaka PE, Bandt D, Bes M, Boswihi SS, Coleman DC, Coombs GW, Dorneanu OS, Gostev VV, Ip M, Jamil B, Jatzwauk L, Narvaez M, Roberts R, Senok A, Shore AC, Sidorenko SV, Skakni L, Somily AM, Syed MA, Thürmer A, Udo EE, Vremeră T, Zurita J, Ehricht R. Molecular Typing of ST239-MRSA-III From Diverse Geographic Locations and the Evolution of the SCCmec III Element During Its Intercontinental Spread. *Front Microbiol.* 2018 Jul 6;9:1436.

Siméon S, Le Moing V, Tubiana S, Duval X, Fournier D, Lavigne JP, Erpelding ML, Gustave CA, Desage S, Chirouze C, Vandenesch F, Tattevin P; VIRSTA/AEPEI Study Group. Time to blood culture positivity: An independent predictor of infective endocarditis and mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Jul 21.

Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, Lina G, Diot A, Laurent F, Trouillet-Assant S. Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jun 28;8:221.

Jeannoel M, Casalegno JS, Ottmann M, Badiou C, Dumitrescu O, Lina B, Lina G. Synergistic Effects of Influenza and *Staphylococcus aureus* Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines. *Toxins (Basel).* 2018 Jul 11;10(7). pii: E286. doi: 10.3390/toxins10070286.

Jacquemond I, Muggeo A, Lamblin G, Tristan A, Gillet Y, Bolze PA, Bes M, Gustave CA, Rasigade JP, Golfier F, Ferry T, Dubost A, Abrouk D, Barreto S, Prigent-Combaret C, Thioulouse J, Lina G, Muller D. Complex ecological interactions of *Staphylococcus aureus* in tampons during menstruation. *Sci Rep.* 2018 Jul 2;8(1):9942.

Antri K, Akkou M, Bouchiat C, Bes M, Martins-Simoes P, Dauwalder O, Tristan A, Meugnier H, Rasigade JP, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F, Ramdani-Bouguessa N. High levels of *Staphylococcus aureus* and MRSA carriage in healthy population of Algiers revealed by additional enrichment and multisite screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Aug;37(8):1521-1529. doi: 10.1007/s10096-018-3279-6. Epub 2018 Jun 12.

Rasigade JP, Leclère A, Alla F, Tessier A, Bes M, Lechiche C, Vernet-Garnier V, Laouénan C, Vandenesch F, Leport C; AEPEI Study Group. *Staphylococcus aureus* CC30 Lineage and Absence of sed,j,r-Harboring Plasmid Predict Embolism in Infective Endocarditis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jun 8;8:187.

Triffault-Fillit C, Ferry T, Laurent F, Pradat P, Dupieux C, Conrad A, Becker A, Lustig S, Fessy MH, Chidiac C, Valour F; Lyon BJI Study Group. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Mar;25(3):353-358.

Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, Van Kessel KPM, Bardoel BW, Kruse E, Bourdonnay E, Boettcher M, McManus MT, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, Van Strijp JAG, Lebbink RJ, Haas PA, Henry T, Spaan AN. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin. *Nat Microbiol.* 2018 Jun;3(6):708-717.

Nonfoux L, Chiaruzzi M, Badiou C, Baude J, Tristan A, Thioulouse J, Muller D, Prigent-Combaret C, Lina G. Impact of Currently Marketed Tampons and Menstrual Cups on *Staphylococcus aureus* Growth and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Production In Vitro. *Appl Environ Microbiol.* 2018 May 31;84(12).

Moreau K, Clemenceau A, Le Moing V, Messika-Zeitoun D, Andersen PS, Bruun NE, Skov RL, Couzon F, Bouchiat C, Erpelding ML, van Belkum A, Bossé Y, Duval X, Vandenesch F; French VIRSTA-AEPEI; COFRASA Study Groups; Danish DANSAB Study Group.
Human Genetic Susceptibility to Native Valve *Staphylococcus aureus* Endocarditis in Patients With *S. aureus* Bacteremia: Genome-Wide Association Study.
Front Microbiol. 2018 Apr 4;9:640.

Andrianasolo J, Ferry T, Boucher F, Chateau J, Shipkov H, Daoud F, Braun E, Triffault-Fillit C, Perpoint T, Laurent F, Mojallal AA, Chidiac C, Valour F; Lyon BJI study group.
Pressure ulcer-related pelvic osteomyelitis: evaluation of a two-stage surgical strategy (debridement, negative pressure therapy and flap coverage) with prolonged antimicrobial therapy.
BMC Infect Dis. 2018 Apr 10;18(1):166.

Durand G, Javerliat F, Bes M, Veyrieras JB, Guigon G, Mugnier N, Schicklin S, Kaneko G, Santiago-Allexant E, Bouchiat C, Martins-Simões P, Laurent F, Van Belkum A, Vandenesch F, Tristan A.
Routine Whole-Genome Sequencing for Outbreak Investigations of *Staphylococcus aureus* in a National Reference Center.
Front Microbiol. 2018 Mar 20;9:511.

Gustave CA, Tristan A, Martins-Simões P, Stegger M, Benito Y, Andersen PS, Bes M, Le Hir T, Diep BA, Uhlemann AC, Glaser P, Laurent F, Wirth T, Vandenesch F.
Demographic fluctuation of community-acquired antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* lineages: potential role of flimsy antibiotic exposure.
ISME J. 2018 Aug;12(8):1879-1894.

Butin M, Dumont Y, Rasigade JP, Martins Simoes P, Hoden L, Picaud JC, Laurent F.
Chromogenic detection procedure for the multidrug-resistant, neonatal sepsis-associated clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A.
Diagn Microbiol Infect Dis. 2018 Feb;90(2):81-82.

Wach J, Dinh A, Dutronc H, Sipahi OR, Candevir A, Valour F, Zeller V, Lustig S, Laurent F, Chidiac C, Ferry T; Lyon BJI study group.
Tigecycline-based prolonged salvage therapy in patients presenting with complex bone and joint infection.
Med Mal Infect. 2018 Feb;48(1):53-57.

Edslev SM, Westh H, Andersen PS, Skov R, Kobayashi N, Bartels MD, Vandenesch F, Petersen A, Worning P, Larsen AR, Stegger M.
Identification of a PVL-negative SCCmec-IVa sublineage of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC80 lineage: understanding the clonal origin of CA-MRSA.
Clin Microbiol Infect. 2018 Mar;24(3):273-278.

Delaunay J, Villani AP, Guillem P, Tristan A, Boibieux A, Jullien D.
Oral ofloxacin and clindamycin as an alternative to the classic rifampicin-clindamycin in hidradenitis suppurativa: retrospective analysis of 65 patients.
Br J Dermatol. 2018 Jan;178(1):e15-e16.

(iii) Communications nationales, (iv) Communications internationales

Orales

Gustave CA, Dupieux-Chabert C, Bes M, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A
Toxigenic *Staphylococcus aureus*: does a resistance phenotype provides a photofit picture of the culprit ? ePoster
28th ECCMID, Madrid, 2018

Mouton W, Diot A, Assant-Trouillet S, Josse J, Caillon J, Bouvard D, Jacqueline C, Laurent F.
Impact of *Staphylococcus aureus* infection on bone homeostasis.
37th annual meeting of the European Bone and Joint Infection Society, Septembre 2018, Helsinki, Finland.

Leloire M, Gustave CA, Fabre M, Josse J, Diot A, Vandenesch F, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lavigne JP, Laurent F, Tristan A

Persistence de *Staphylococcus aureus* dans les infections de MPP diabétiques
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Andre C, Martins-Simoes P, Cortes Farrel M, Cremet L, Bmer P, Corvec S, Caillon J, Vandenesch F, Dupieux-Chabert C, Laurent F.

Première épidémie française de plasmides cfr+ chez *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative.
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Maali Y, Monteix A, Clerc PA, Tasse J, Valour F, Ferry T, Josse J, Trouillet-Assant S, Laurent F.

Biomatériaux orthopédiques et biofilm chez les Staphylocoques à coagulase négative.
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Cara A, Tasse J, Saglio M, Josse J, Villet R, Laurent F.

BiofilmCare®: une approche innovante pour quantifier le biofilm.
Congres SFM, Paris, Octobre 2018.

Kolenda C, Josse J, Medina M, Lustig S, Ferry T, Laurent F.

Intérêt des bactériophages dans le cadre du traitement des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*.
Congres SFM, Paris, Octobre 2018.

Affichées

Abad L, Diot A, Lustig S, Josse J, Ferry T, Laurent F, Valour F.

Staphylococcus aureus bone and joint infection: comparison of rifamycins intraosteoblastic activity and impact on intracellular emergence of small colony variants.

ISSSI 2018, Copenhague

Mouton W, Diot A, Assant-Trouillet S, Josse J, Caillon J, Bouvard D, Jacqueline C, Laurent F.

Impact of staphylococcus aureus infection on bone homeostasis.

ISSSI 2018, Copenhague

Cara A, Tasse J, Josse J, Saglio M, Valour F, Ferry T, Villet R, Laurent F.

A steam-based method to investigate biofilm.

ISSSI 2018, Copenhague

Dupieux C, Diot A, Fraunholz M, Filippi L, Sinnadurai D, Verlhac P, Claviere M, Vandenesch F, Faure M, Rasigade JP, Laurent F.

Staphylococcus aureus phenol-soluble modulins induce host cell death via autophagy subversion.

ISSSI 2018, Copenhague

Mouton W, Bouvard D, Assant-Trouillet S, Josse J, Caillon J, Jacqueline C, Diot A, Laurent F.

Staphylococcus aureus internalization: decipher the signaling pathway to identify novel therapeutic targets.

ISSSI 2018, Copenhague

Mouton W, Tasse J, Bietrix J, Haenni M, Bes M, Madec J-Y, Sale G, Dupieux C, Laurent F. Epidemiological evidence of nasal colonization of *S. aureus* strains in horses and equestrian centres in 41 French farms. ISSSI 2018, Copenhague

Butin M, Dumont Y, Martins Simoes P, Raphard A, Picaud J-C, Laurent F.

Diffusion and environmental persistence of pathogenic *Staphylococcus capitis* isolates inside a neonatal intensive care unit. Poster.

ISSSI 2018, Copenhague

Ory J, Laurent F, Cazaban M, Richaud-Morel B, Di Maio M, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Butin M.

Successful management of an outbreak involving a multiresistant *Staphylococcus capitis* clone following implementation of several hygiene measures inside a NICU.
ISSSI 2018, Copenhagen

Maurin E, Ranc AG, Tristan A, Bes B, Gustave CA, Vandenesch F, Laurent F.
Dépistage nasal SASM/SARM : Evaluation du système Panther Fusion® Hologic.
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Hodille E, Beraud L, Périan S, Berti V, Bes M, Tristan A, Blond E, Lina G, Dumitrescu O
Effet anti-toxinique de l'oxacilline sur les PSM α chez les SARM-C
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Fabre M, Horikian A, Fatah S, Bes M, Tasse J, Josse J, Laurent F.
Etude du biofilm dans les infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*.
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

Abad L, Tafani-Dyon V, Tasse J, Lustig S, Josse J, Ferry T, Diot A, Laurent F, Valour F.
Infections ostéo-articulaires : activité intra-ostéoblastique des rifamycines et oxazolidinones sur *S. aureus*.
38ème RICAI, 17 – 18 Décembre 2018 Paris.

(v) *Conférences sur invitations.*

F. Vandenesch. Trace amount of antibiotic combined with slight virulence enhancement drove MRSA expansion in the community. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 23-26 August 2018, Copenhagen, Denmark.

F. Vandenesch. *S. aureus* endocarditis: the host or the bug ?. ESCMID Postgraduate Education Courses : Update on Endocarditis and Endovascular Infections. 20-23 March 2018, Munster, Germany

F. Vandenesch. Staphylococcal leukocidins: a redundant and multifunctional arsenal of pore-forming toxins. French Society for Microbiology Annual Meeting. 1-3 October 2018, Paris, France.

F. Laurent. *Staphylococcus aureus* and bone and joint infections: in vivo adaptation to induce relapse and chronicity International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 23-26 August 2018, Copenhagen, Denmark.

F. Laurent. Rapid detection of resistance mechanisms. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, April 2018

F. Laurent. CRIOAC Network : Centres de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes. Reference Centers for Complex Bone and Joint Infections. Oxford Bone Infection Conference, Oxford, April 2018.

F. Laurent. Multidrug resistant *S. aureus* and BJI - Treatment and diagnosis, ESCMID Summer School 2018, Paris.

F. Laurent. Antibiorésistance hétérogène et de bas niveau : Mythes et réalités chez *Staphylococcus aureus*. RICAI, Paris, Décembre 2018

F. Laurent. Mécanismes de résistance aux nouveaux anti-infectieux : Daptomycine et *Staphylococcus sp.* RICAI, Paris, Décembre 2018

F. Laurent. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* et ses pièges. Journée du collège de bactériologie virologie des hôpitaux généraux (COLBVH), Paris, Juin 2018.

F. Laurent. Effets délétères des antibiotiques pour les services de néonatalogie. Journée Francophone de Recherche en Néonatalogie, Paris, Décembre 2018.

F. Laurent. Identification bactérienne et épidémiologie bactérienne. Journée Santé Publique France, Paris, Mars 2018.

F. Laurent. Nouvelles technologies de la détection rapide de la résistance bactérienne. Forum Labo, Mars 2018.

F. Laurent. La résistance aux antibiotiques : pourquoi changer nos pratiques ? Antibiotiques chez l'Homme. Séminaire Global Health VetagroSup, Marcy-l'étoile, Décembre 2018.

G. Lina. Menstrual toxic shock syndrome in 2018. Institut für Medizinische Mikrobiologie seminar, Munster, Allemagne, May 2018

G. Lina. Menstruations, protections périodiques et santé ; où en sommes-nous aujourd'hui ? Table ronde du Planning Familial de l'Isère, Mars 2018, Grenoble.

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

Le CNR a établi de longue date une collaboration étroite avec le laboratoire de L'ANSES Lyon avec des échanges réguliers en termes de projets et de collaborations. Le CNR des staphylocoques apporte son expertise au laboratoire de l'ANSES lorsque celui-ci en fait la demande dans les domaines de l'identification MALDI-Tof, de la caractérisation moléculaire (puces à ADN), de typage moléculaire ou d'analyse bioinformatique des données de WGS pour les souches animales de staphylocoques.

A titre d'exemple le CNR des staphylocoques et l'ANSES ont conduit un travail collaboratif concernant l'étude de la structure des populations des souches de *Staphylococcus pseudintermedius* sensibles et résistants à la méticilline isolées chez l'animal. (voir paragraphe 6.1)

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR poursuivra en 2019 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal.

8.1 Activités d'expertise

8.1.1 Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Le CNR a développé une relation de confiance et d'échange avec un nombre important de correspondants. Il s'agit principalement de laboratoires de microbiologie et de cliniciens des CHU et des CHR pour les 2/3 mais aussi des laboratoires privés qui desservent des établissements de soins ou des patients directement pour le 1/3 restant. La rétro-information systématique auprès des demandeurs par le biais de courriers personnalisés, les contacts téléphoniques directs auprès des biologistes et des cliniciens dans les situations d'urgence et/ou inhabituelles ont certainement contribué à entretenir une relation de confiance entre les partenaires. Pour les années qui viennent nous souhaitons renforcer ces collaborations en améliorant la rapidité, la sécurité et la traçabilité des avis rendus dans le cadre du projet de télémédecine exposé au paragraphe 8.2.

8.1.2 Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu

Utilisation du séquençage de haut-débit (NGS)

Cf chapitre 2.6

Protéomique haut débit

Comme indiqué au chapitre 2.1, le CNR développe actuellement en partenariat avec l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon UMR CNRS 5280 (Jérôme Lemoine), une méthode de protéomique haut débit¹⁸ ciblant une centaine de facteurs de virulence et de régulateurs globaux en vue de déterminer l'expression de ces facteurs dans les souches cliniques. A terme, cet outil pourrait être développé en routine pour la caractérisation des souches de Staphylocoques adressées au CNR. Pour plus de détails se reporter à l'annexe confidentielle

8.1.3 Les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés

Le CNR poursuivra comme au cours des mandatures précédentes en adéquation avec les missions des CNR confiés par Santé Publique France, l'évaluation des nouvelles techniques et des nouveaux kits mise sur le marché. Il est ainsi envisagé en 2018, d'évaluer les performances et l'intérêt des réactifs suivants :

Utilisation précoce du test Alere™ PBP2A Culture Colony Test sur les hémocultures positives à *S. aureus*

Ce test est déjà utilisé en routine au CNR et dans de nombreux laboratoires de routine pour la confirmation de la présence de PLP2a (et donc du gène *mecA*) chez les souches de *S. aureus* directement sur colonies après 24h d'incubation. Compte tenu des modifications des workflow au sein des laboratoires de routine de bactériologie notamment pour les hémocultures, une identification précoce au niveau de l'espèce est maintenant réalisée après seulement 6 à 8 heures de culture sur milieu gélosé en utilisant des colonies encore petites. La mise à disposition rapide de l'identification pose la question de la disponibilité rapide au même moment de certaines résistances ayant un impact majeur sur la prise en charge optimal des patients et notamment pour les septicémies à staphylocoque doré, la résistance à la méticilline. En lien avec le laboratoire de bactériologie de l'IAI, le CNR a débuté en septembre 2018 une étude ayant pour but d'évaluer prospectivement, les performances du test Alere™ PBP2A Culture Colony Test sur les colonies de *S. aureus* obtenues à partir d'hémocultures positives après seulement 4 heures d'incubation. Une collection de 100 souches de SARM parfaitement caractérisées au niveau moléculaire et couvrant l'ensemble des clones circulants dans le monde a été utilisée pour réaliser des fausses hémocultures positives (flacon + sang + 10² bactéries) incubées dans l'automate VIRTUO bioMérieux). Une fois les flacons détectés positifs, les flacons ont été ensemencés sur gélose au sang et incubés 4h avant d'être testés avec le kit. Les résultats ont montré que de rares souches de SARM n'étaient pas correctement détectées (FN pour la résistance à la méticilline). Une étude prospective en routine est actuellement conduite en collaboration avec le CHU de Nantes pour tester cette technique en conditions réelles. Les résultats seront connus dans le courant de l'année 2019 et feront l'objet d'une publication.

Performances du test UMIC Linézolide et Dalbavancine sur les souches staphylocoques dorés et blancs

A l'image des travaux conduits en 2018 pour les tests UMIC Daptomycine, nous proposons d'évaluer les performances du test UMIC Linézolide et Dalbavancine sur les souches staphylocoques dorés et blancs de la collection de CNR staphylocoques

¹⁸ Rougemont B et al. Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by *Dickeya dadantii* Proteomic Analysis during Plant Infection. *Anal Chem.* 2017 Feb 7;89(3):1421-1426.

8.1.4 Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.

Etude "Analyse des capacités et fréquences de transfert (chez SCN) et de réception (chez SA) des mécanismes de résistance aux oxazolidinones"

Cette étude a pour objectif d'investiguer les capacités de transfert des mécanismes de résistance aux oxazolidinones présent sur des éléments mobiles des SCN vers *S. aureus*. Elle est basée sur des études in vitro de différents modes de transfert (conjugaison, transduction) et des dénombrements sur des milieux sélectifs chromogéniques SARM en utilisant :

- i) des souches représentatives des clones de SCN porteurs de mécanismes transférables de résistance (cfr, optr) obtenue au cours de l'étude nationale,
- ii) les 20 clones de SARM/SASM les plus prévalents en Europe appartenant aux Sequence Type ST5 (n= 4), ST 8 (n=4), ST15, ST22, ST30, ST45, ST72, ST398.

Le coût biologique de la résistance sera déterminée in vitro par comparaison des cinétiques de croissance des couples de souches de SARM "avant" et "après" acquisition des mécanismes transférables de résistance.

La stabilité de ces mêmes mécanismes chez les bactéries réceptrices sera déterminée en suivant par numération sur milieu gélosé sélectif (LNZ 4 mg/L) vs. non sélectif la proportion de colonies résistantes/sensibles au LNZ en milieu liquide par subculture quotidienne sur plusieurs semaines en l'absence de pression de sélection.

Cette étude vise aussi à identifier de nouveaux gènes de résistance. Pour les souches résistantes au LZD sans génotypes de résistance connus (mutations, cfrA/B, optrA) une recherche d'association génétique (GWAS) sera réalisée par comparaison des génomes avec ceux de souches sensibles afin d'identifier de possibles nouveaux gènes impliqués dans le phénotype de résistance. Les potentiels gène-candidats feront l'objet d'une validation par des approches de transfert de résistance, construction de mutants et complémentation.

Les données obtenues permettront de disposer d'une vision globale (épidémiologique, phénotypique et génétique) de la résistance aux oxazolidinones en France et d'anticiper le niveau de risque de dissémination des mécanismes transférables en fonction des souches réservoirs. Ces données permettront de mieux appréhender l'épidémiologie des bactéries concernées par ces résistances, de mieux anticiper les évolutions possibles et d'adapter les mesures de prévention et contrôle de la diffusion des souches de SCN et SA résistantes aux oxazolidinones ainsi que la prise en charge des patients colonisés/infectés.

Etude OXAZO-Staph : Résistance aux oxazolidinones chez les staphylocoques : étude épidémiologique et moléculaire, analyse de la dynamique de transfert inter-espèces

Les souches de staphylocoques résistantes aux oxazolidinones présentent le plus souvent des mutations chromosomiques de l'ARNr 23S et/ou des gènes codant les protéines ribosomales, avec une transmission uniquement verticale (bactérie mère à bactéries filles). De façon plus inquiétante, d'autres mécanismes de résistance sont liés à l'acquisition de gènes plasmidiques qui sont eux transférables horizontalement : gènes cfrA/B, optrA ou poxtA codant respectivement une méthyltransférase et pour un ABC transporteur.

L'augmentation de la prévalence de ces résistances touche surtout les staphylocoques à coagulase négative (SCN).

Cette émergence est préoccupante en raison :

- i) du niveau de résistance global aux antibiotiques déjà élevé des SCN et de leur pouvoir pathogène intrinsèque notamment dans le cadre d'infections chroniques en présence de matériel,
- ii) de l'omniprésence des SCN dans la flore commensale cutanéomuqueuse qui en font des réservoirs potentiels de gènes de résistance avec un risque élevé de transfert aux souches de SA virulents et déjà multirésistants.

Objectifs

Dans ce contexte, notre objectif est de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la prévalence de la résistance aux oxazolidinones en France chez les SA et SCN ?
- Quelle est la prévalence des différents mécanismes de résistance et leurs impacts sur les niveaux de résistance au LNZ/TDZ ?

- Existe-t-il des clones de SCN plus à risque de transmettre et/ou des clones de SA plus aptes à acquérir ces résistances et quel est le coût biologique de cette acquisition ?
- Existe-t-il des mécanismes de résistances au LNZ et TDZ non encore identifiés ?

Méthodes

- Etude nationale de prévalence de la résistance aux oxazolidinones avec un recueil des souches de SA et SCN résistantes aux OXZ (voir étude infra) via le réseau des CHU en lien avec Santé Publique France et le CNR de Staphylocoques.

- Caractérisation phénotypique des résistances aux oxazolidinones avec détermination des CMI LNZ/TDZ (microdilution en milieu liquide) et réalisation d'un antibiogramme classique (Vitek2, bioMérieux)

- Caractérisation moléculaire des souches de SCN résistantes au LNZ à partir des données de séquençage complet des génomes (HiSeq) des souches incluses avec typage MLST in silico (identification des clones), recherche des mutations ARNr 23S/protéines ribosomales L3-L4 (recherche de SNPs) et recherche des gènes cfr et optrA (BLAST sur les génomes assemblés) afin d'étudier la prévalence des mécanismes et leurs distributions clonales.

Une analyse de corrélation entre CMI et nature des mécanismes de résistances sera aussi réalisée.

Cette étude qui devait initialement voir le jour fin 2017 a été repoussé à 2018 afin de s'appuyer sur le réseau de laboratoire sentinelle que le CNR "Résistance aux antibiotiques" et le CNR des staphylocoques sont en train de formaliser. Les travaux seront donc initiés en septembre 2019.

8.2 Activités de conseil, formation et information

8.2.1 Les projets de formation envisagés

Concernant les formations, les membres du CNR continueront à répondre à toute demande d'interventions concernant les infections staphylococciques en lien avec l'activité du CNR dans le cadre de formations universitaires (Master, DES, DU, DESC, etc.), de formations post-universitaires, de formations médicales continues, de congrès régionaux, nationaux ou internationaux.

8.2.2 Les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR (p.ex. création, développement d'un site internet dédié)

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la **rétro-information** des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque-là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations aux prescripteurs des analyses afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées dans les situations de cas groupés. L'amélioration prochaine portera sur la mise en place d'un serveur sécurisé de transmission des résultats d'examens développé par les Hospices Civils de Lyon.

8.2.3 Les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales

Comme cela a été le cas en 2018, le CNR des staphylocoques s'engage à répondre à toutes les demandes de ses tutelles concernant les infections staphylococciques qu'il s'agisse de gestion des phénomènes épidémiques, de recommandations au niveau nationale concernant la gestion des patients, de leur traitement, de leur prise en charge plus globale ou de l'analyse de risque de transmission humaine ou animale. Par le passé le CNR a su apporter son expertise dans le cadre de la saisine de l'INVS par l'HAS sur la gestion des infections à SARM communautaires.

8.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

8.3.1 Les projets de constitution, développement, animation de réseaux de partenaires

Comme annoncé dans le projet de renouvellement des CNR - Mandature 2017-2021, les CNR "Résistance aux antibiotiques" et "Staphylocoques" ont souhaité constituer un réseau commun incluant des laboratoires publics et privés, auxquels ils pourraient s'adresser régulièrement pour des activités de surveillance épidémiologique. Ce dispositif concerne les espèces bactériennes entrant dans le champ d'expertise des CNR (staphylocoques, entérocoques, entérobactéries, bacilles à Gram négatif non fermentaires). Cependant l'enquête réalisée auprès de plus de 60 partenaires potentiels (cf chapitre 3) révèle les limites de cette approche et plaide plutôt en faveur de la mise en place de réseaux informels dans le cadre des enquêtes ciblées comme pratiqué jusqu'à ce jour. Par ailleurs, compte tenu de la mise en place de la mission nationale 2 "Surveillance et Prévention de l'AntibioRésistance en Établissements de Santé" (SPARES), le CNR des staphylocoques devrait pouvoir bénéficier des informations collectées à l'échelle nationale sur les Staphylocoques et en extraire des pertinentes. Conformément à ses missions, le CNR collaborera avec le réseau en cours de constitution afin d'étendre le dispositif de collecte de souches présentant potentiellement des résistances émergentes, et ainsi assurer une meilleure surveillance de l'épidémiologie nationale. La même démarche sera effectuée dans le cadre de la mission nationale 1 pour les souches communautaires.

8.3.2 La contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels

La comparaison des profils génomiques obtenus par les différentes techniques génétiques et génomiques détaillées aux chapitres 2 et 3, permettra de confirmer ou infirmer la présence de cas groupés dans les structures sanitaires françaises et d'alerter rapidement en cas de nécessité Santé Publique France comme cela été le cas lors des différentes épidémies présentées dans le présent dossier. En cas d'épidémie, le CNR contribuera activement au recueil des souches isolées chez les malades et les contacts, aux enquêtes concernant les modes et les sources de contamination et apportera son expertise dans la gestion de tels épisodes au plus près des équipes locales (laboratoire, hygiène, services cliniques, ARS, CPIas).

En outre, l'ensemble des souches d'origine humaine, animale ou environnementale adressées au CNR continueront de bénéficier d'une analyse moléculaire par puce à ADN (remplacée progressivement par une approche NGS) et notre objectif est l'intégration de ces résultats et des métadonnées associées dans une base de données relationnelles gérée par le logiciel BioNumerics®. Le point fort de BioNumerics® réside dans sa capacité à combiner des informations de sources génomiques et phénotypiques diverses dans une base de données globale permettant des analyses croisées. Cet outil permettra de mettre en place des indicateurs et des outils de surveillance et d'alerte automatisés. Ces derniers devraient faciliter la détection de phénomènes inhabituels et permettre d'identifier l'émergence de nouveaux clones et/ou l'émergence de formes cliniques rares.

8.3.3 La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Comme indiqué au chapitre 5.1, le CNR via sa participation au groupe ESGS de l'ECCMID, souhaite organiser une surveillance de la sensibilité diminuée et de la résistance aux glycopeptides et lipoglycopeptides en Europe dans les bactériémies afin d'établir des données d'incidence en lien avec les consommations antibiotiques pas centres. Ce réseau, constitué sur la base d'un volontariat des CNR Européens devrait démarrer à l'initiative du CNR français.

8.3.4 Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance

Surveillance et caractérisation de la résistance aux glycopeptides, à la daptomycine et aux oxazolinidones

Surveillance au niveau animal

Cette surveillance apparaît nécessaire compte tenu des transferts possibles entre Animal et Homme, comme ont pu l'illustrer au cours de la mandature précédente les travaux conduits sur les clones ST398, les clones portant les gènes *mecC* ou sur les animaux domestiques qui peuvent être porteur de souches multi-résistantes et virulentes. L'objectif est de suivre les souches de SARM mais aussi de *S. pseudintermedius* résistants à la méticilline isolés chez l'animal en utilisant le recueil de souches réalisé par l'ANSES Lyon via le réseau ResaPath et de comprendre les liens entre les différents clones de *S. pseudintermedius* sensibles et résistants à la méticilline mais aussi avec les souches de MSSA et de MRSA.

Pour ce qui concerne l'espèce *S. pseudintermedius*, en collaboration avec le laboratoire de l'ANSES Lyon (Jean-Yves MADEC, Marisa HAENNI), l'étude génomique initiée en 2018 (voir sous-chapitre 6.1), qui a fait l'objet d'un article publié récemment, sera poursuivie afin de proposer une analyse exhaustive de toutes les séquences accessibles ainsi que d'environ 200 WGS de cette espèce auxquelles l'accès avant soumission nous a été proposé par un industriel du domaine vétérinaire pharmaceutique.

Il a été décidé de d'étudier, via le réseau Resapath, à la dissémination chez l'animal des clones de *S. epidermidis* multi-résistants endémique au niveau mondial chez l'Homme et présentant une double mutation conférant une résistance à la rifampicine et la vancomycine (voir plus haut).

8.4 Contribution à l'alerte

Le CNR des Staphylocoques, sur la base des résultats obtenus avec les différentes techniques décrites dans ce document, est à même d'identifier l'émergence de nouveaux clones présentant des profils de virulence ou de résistance particulier comme cela a été le cas avec le clone de *S. epidermidis* résistant au linézolide devenu endémique en France au cours de la dernière mandature et du clone de *S. capitis* NRCS-A endémique dans les services de néonatalogie en France, en Europe et plus largement à travers le monde ou de caractériser des phénomènes endémiques, épidémiques ou pandémiques. Les fiches de recueil de données cliniques associées à l'envoi des souches complètent ce dispositif et alimentent la base de données du CNR. L'ensemble permet au CNR des staphylocoques d'apporter sa contribution à l'alerte dans le domaine des infections staphylococciques tant sur le plan de la virulence que de la résistance. Le CNR communique avec ses correspondants de Santé Publique France par voie électronique et par téléphone en temps réel sur tous les cas et situations inhabituels, comme nous l'avons fait cet hiver lors de l'augmentation de la prévalence des pneumonies graves associées à la grippe et dues à des souches PVL+. Nous surveillons actuellement la diffusion du clone de SASM PVL+ CC152-MSSA qui devient le clone majoritaire dans les infections graves comme les pneumonies nécrosantes et investiguons les facteurs permettant de caractériser simplement ce clone afin de pouvoir alerter nos partenaires.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le CNR Staphylocoques s'engage à assurer les missions définies par le décret no 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

1. Expertise

- en développant et en diffusant des techniques de typage moléculaire ;
- en développant et en maintenant une collection de souches responsables d'infections nosocomiales et communautaires ;
- en identifiant et en typant les souches responsables de formes cliniques inhabituelles et les souches multi-résistantes de diffusion clonale et caractériser leurs toxines ;
- en recherchant et en caractérisant les toxines dans les prélèvements cliniques et alimentaires, dans le cadre de l'investigation de toxi-infections alimentaires ou d'autres cas groupés ;
- en identifiant de nouveaux génotypes de résistance aux anti-infectieux et en caractérisant les mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR Résistance aux antibiotiques ;
- en évaluant et en validant, en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques, les techniques de détection de la résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques, en assurant leur diffusion et en développant une procédure de contrôle de qualité ;
- du fait de la fréquence des souches résistantes à la méticilline (SARM) dans les établissements de santé en France, le CNR Staphylocoque entretiendra des relations privilégiées avec le CNR Résistance aux antibiotiques et sera membre du réseau constitué autour de ce dernier.

2. Conseil

Dans le cadre des missions Biotox :

- en apportant son expertise spécifique au service des instances concernées de santé publique et de sécurité nationale
- en contribuant, avec les instances chargées de leur pilotage, à l'animation du réseau des laboratoires hospitaliers Biotox
- en contribuant à l'élaboration d'une collection nationale de souches.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- en ciblant en priorité les infections et toxémies staphylococciques et les souches présentant une résistance particulière ;
- en renforçant les collaborations avec les réseaux des laboratoires hospitaliers de microbiologie, notamment pour les souches responsables d'infections nosocomiales ;
- en développant un partenariat avec des réseaux de laboratoires de biologie médicale pour la surveillance de l'émergence de clones responsables d'infections en ville ;
- en collaborant aux enquêtes épidémiologiques ;
- en participant à l'investigation des cas groupés d'infections staphylococciques ;
- en collaborant avec les réseaux de surveillance européens et internationaux.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : émergence d'un nouveau phénotype de résistance aux antibiotiques ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), émergence de souches à la virulence particulière ; détection de cas groupés ; etc

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Au sein de l'Institut des Agents Infectieux, les personnels affectés au CNR des staphylocoques comprennent des personnels affectés spécifiquement et exclusivement au CNR (techniciens et ingénieur) et des personnels qui consacrent une partie de leur temps seulement au CNR selon un principe de multi-affectation (biologistes, secrétaires, cadre médico-technique).

Les personnels affectés à l'activité de ce CNR pour tout ou partie de leur temps de travail sont les suivants :

François Vandenesch – Directeur du CNR PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : francois.vandenesch@univ-lyon1.fr
Anne Tristan – Directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@chu-lyon.fr
Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr

1. Secteur virulence et épidémiologie

Anne Tristan – Directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@chu-lyon.fr
Claude-Alexandre Gustave AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : claude-alexandre.gustave@chu-lyon.fr
Michèle Bes Biologiste contractuel-IAI	E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Gérard Lina PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr
Jérôme Etienne PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : jerome.etienne@univ-lyon1.fr

2. Secteur résistance

Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux-Chabert PHU - IAI PHU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle Ranc PH-IAI	E-mail : anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr

3. Secteur sérologie

Frédéric Laurent – Directeur adjoint PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux-Chabert PHU - IAI PHU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux@chu-lyon.fr

Patricia Martins-Simoes Ingénieure– IAI	E-mail : patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr
--	---

Yves Gillet (Réfèrent infectiologue pédiatre) PH - Hôpital Femme Mère Enfant PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : yves.gillet@chu-lyon.fr
Tristan Ferry (Réfèrent infectiologue adultes) PH - Hôpital de la Croix-Rousse PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : tristan.ferry@chu-lyon.fr
Pascal Del Giudice (Réfèrent dermatologie) PH- CHI Fréjus Saint Raphaël	E-mail : del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr

Cadre Hélène Rutschi	
Techniciennes Nadia Boulegroun Caroline Bouveyron Christine Gardon Emelyne Jeanne Charline Vuillot	
Secrétaires Yamina Lakehal / Laurence Morales	

1.3 Locaux et équipements

L'IAI se est installé depuis le 30 janvier 2017 dans un bâtiment existant (Photo) conçu il y a environ 10 ans comme un Centre de Biologie pour l'Hôpital de la Croix Rousse. Le projet de restructuration de la biologie a conduit à des opérations tiroirs de redéploiement des activités spécialisées entre les différents sites de HCL, la biochimie se concentrant sur le groupement hospitalier Est, la microbiologie se concentrant sur l'Hôpital de la Croix Rousse (pôle Nord),... Ainsi, hormis un plateau de biochimie-hématologie d'urgence destiné aux patients de l'hôpital de la Croix Rousse, plateau qui occupe un demi étage du bâtiment, le reste des 5 étages du bâtiment soit environ 4500 m² seront occupés à terme par la Microbiologie :

- le R+5 est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie,
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique),
- le R+2 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24,
- le R+3 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie-Hématologie 24h24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée,
- le R+1 héberge le CNR des staphylocoques, le CNR des Légionelles, l'hygiène environnementale et la Parasitologie-Mycologie non automatisée.



L'étage des CNR de Bactériologie.

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (Figure 27). Les CNR bénéficient par ailleurs de toute l'infrastructure et des différents plateaux de l'IAI, notamment les outils d'identification MALDI-TOF et d'antibiogramme du plateau de microbiologie 24/24 (R+2), les outils de biologie moléculaire et d'analyse bioinformatique du plateau de Biologie Moléculaire (R+4) et toutes les facilités logistiques du bâtiment. Cela inclut notamment l'existence d'un secrétariat centralisé pour l'ensemble de l'IAI assurant une réponse téléphonique 6 jours sur 7 sur un n° unique. En dehors des heures ouvrables et le week-end, ce numéro est basculé sur les n° d'astreinte sur site. Ainsi, un interlocuteur pour le CNR est pratiquement toujours disponible au minimum pour orienter la réponse. Outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie, incluant celles du CNR, le laboratoire a acquis un outil de gestion de base de données spécifique pour les CNR sur une base du logiciel BioNumerics® hébergé sur un serveur sécurisé à la direction de l'informatique des hospices civils de Lyon.



Figure 27. Espaces du R+1 (en jaune) affectés aux CNR de Bactériologie (Staphylocoques et Légionelles)

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve la totalité des échantillons (congélation à -20 °C) qui lui sont adressés qu'il s'agisse de souches cliniques, de souches type ou de référence, de sérums et autres prélèvements cliniques (pus, biopsies...). Il dispose aussi d'une DNAtèque de la totalité des souches reçues au laboratoire depuis 2005.

Le CNR est à même de fournir des souches représentatives des différents clones de *Staphylococcus aureus* sensibles (SASM) ou résistants à la méticilline (SARM) diffusant actuellement en milieu hospitalier (SARM-H) et dans la communauté (SARM-C) (France et Pays étrangers), ainsi que des souches représentatives des différentes formes cliniques (SARM ou SASM) : pneumonies nécrosantes, choc toxique staphylococcique, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique, etc. Ces souches sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) aux laboratoires académiques et hospitaliers sur demande motivée adressée au responsable du CNR sous réserve de signature d'un accord de transfert de matériel entre les parties (les HCL et le laboratoire demandeur- Annexe 5).

Le CNR conserve également les souches types représentant les différentes espèces de staphylocoques et toute nouvelle espèce décrite fait l'objet d'une demande auprès des collections internationales afin d'obtenir la souche de référence. Dans le même esprit, toute description de nouveaux mécanismes de résistances aux antibiotiques nous conduit à faire une demande auprès des auteurs des articles afin d'obtenir des souches «contrôle» afin de pouvoir mettre au point les PCR spécifiques correspondantes qui sont ensuite utilisés de façon rétrospective pour évaluer la prévalence de ces mécanismes dans les collections du CNR et de façon prospective pour caractériser les souches reçues en cas de résistance aux antibiotiques concernés.

En conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain, l'ensemble de la collection du CNR des Staphylocoques a été déclaré sous le numéro DC-2008-176.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

1.5.1 L'enjeu de l'accréditation

Le laboratoire de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon (LBMMS) est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (accréditation COFRAC n°8-3442) et le même système de management de la qualité est appliqué à tous les services du laboratoire. De ce fait, le CNR des staphylocoques est accrédité pour la PCR PVL en urgence sur les souches (extension demandée en 2015, audit du COFRAC effectué en 2016, confirmation du COFRAC suite à notre déménagement en janvier 2017).

1.5.2 La structure qualité du laboratoire

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 28).

Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur.

Le CNR des staphylocoques s'appuie également sur la technicienne qualité du Centre de Biologie Nord et celle de l'IAI. La Figure 29 représente l'organigramme qualité de l'IAI.

Cartographie des processus du LBMMS

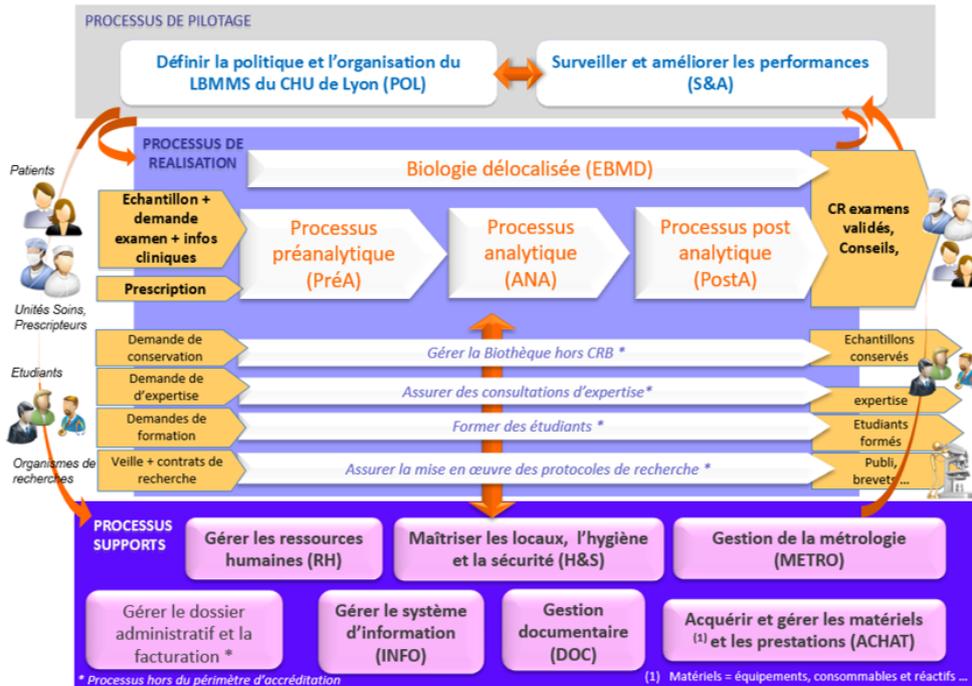


Figure 28- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-05)



Organigramme Qualité IAI

PILOTE QUALITÉ DE DISCIPLINE

Bactériologie C. ROURE-SOBAS / A.G. RANC
Microbiologie Environnementale L. BERAUD / P. CASSIER
Parasitologie Mycologie M. RABODONIRINA / F. PERSAT
Virologie M. BOUSCAMBERT / M.A. TRABAUD

TECHNICIEN QUALITÉ IAI

N.GOUDIN

RÉFÉRENT QUALITÉ DE SECTEUR (RQS)

Microbiologie 24/24
C. ROURE-SOBAS / A.G. RANC

Biologie moléculaire
H. SALORD/M. RABODONIRINA/M. BOUSCAMBERT

Virologie conventionnelle
F. MORFIN

Sérologies infectieuses
C. ROURE-SOBAS/F. PERSAT/ M.A. TRABAUD

Parasito-mycologie conventionnelle
M. RABODONIRINA

Microbiologie Environnementale
P. CASSIER

Mycobactéries
E. HODILLE

CNR Grippe
M. VALETTE

CNR Staphylocoques
A. TRISTAN

CNR Entérovirus
I. SCHUFFENECKER

CNR Légionelles
L. BERAUD

NE-RH-DE-012

*RQS correspond au Référent Qualité de Site dans Kalilab, ici appliqué aux secteurs de l'IAI

Figure 29- Organigramme qualité de l'IAI

1.5.3 Les audits

Des audits internes ont lieu tous les ans pour vérifier la mise en place du système de management de la qualité et le respect des exigences de la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire formé à l'audit et donnent lieu à des rapports qui permettent de mettre en place des actions d'amélioration. De plus, le COFRAC fait ses audits de surveillance y compris au CNR.

1.5.4 Le logiciel de gestion de la qualité

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (100 documents qualité gérés pour le CNR des staphylocoques), (ii) de suivre les compétences du personnel (formations, évaluations et qualifications), (iii) de gérer le matériel et ses maintenances.

Ce logiciel permet également de tracer les événements indésirables (non-conformités ou réclamations) et de suivre les actions d'amélioration mises en place (plans d'actions, audits, revues, objectifs...).

Chaque personne du laboratoire a accès à ce logiciel et peut par ce biais s'impliquer dans la démarche qualité à différents niveaux.

1.5.5 Avancement de la démarche qualité

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici 2020.

L'ensemble des activités font l'objet annuellement d'une revue au cours de laquelle l'atteinte des objectifs et le suivi des indicateurs qualité sont exposés et les axes d'amélioration pour l'année suivante sont décidés.

L'avancement du plan d'action pour l'accréditation est suivi régulièrement lors de réunions qualité avec l'ensemble du personnel.

Le CNR des staphylocoques a validé son accréditation suite à son déménagement en janvier 2017 sachant que l'audit interne LBMMS effectué en mars 2017 n'a relevé aucun écart et souligné la bonne gestion des risques lors du déménagement.

Les dossiers d'ajout pour les recherches de toxines, les PCR (*mecA/mecCC*, *agr*, *gyr* et *kos*) sont prêts mais en raison d'un chevauchement avec le secteur de bactériologie conventionnelle dans lesquels interviennent également les membres du CNR, les dossiers finalisés ne seront déposés en ajout que pour 2019.

1.5.6 Les contrôles qualité

Le CNR participe à plusieurs contrôles qualités européens réguliers dédiés aux activités spécialisées des laboratoires de référence des Staphylocoques.

1.5.6.1 *CQE Européen de l'ESGS*

Le groupe ESGS (ESCMID Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections) co-présidé par les Professeurs Jody Lindsay et François Vandenesch organise depuis 2014 un contrôle de qualité externe (CQE) destiné principalement aux Centres Nationaux de Référence d'Europe qui sont confrontés à l'analyse et à la caractérisation d'un grand nombre de souches de *Staphylococcus aureus*.

L'objectif de ce CQE est d'évaluer la capacité des laboratoires à effectuer l'identification, la détection de la résistance aux antibiotiques, la détermination du profil toxinique et le typage de 5 ou 6 souches de staphylocoques en utilisant leurs propres techniques phénotypiques et génotypiques.

Deux panels de tests sont proposés aux laboratoires en fonction des possibilités de chacun :

- Le panel de base incluant l'identification, la détermination des CMI de l'oxacilline, de la céfoxitine et de la mupirocine, la détection des gènes de résistance (*mecA*, *mecC* et *mupA*), des gènes codant les toxines (PVL,

TSST, ETA, ETB et entérotoxines A, B, C, D et E) et le typage par une méthode génotypique (*spa*-typing, MLST, WGS...)

- Le panel élargi incluant les tests complémentaires suivants : profil de résistance à 16 antibiotiques, détection de gènes codant la résistance à la tétracycline, aux macrolides-lincosamides-streptogramines et aux aminoglycosides, détection du locus ACME (Arginine Catabolic Mobile element) incluant *arcA*, détection des gènes *etd* et *seh* ainsi que le typage de la cassette *SCCmec*.

Le bilan des deux premiers CQE (2014 et 2016) organisés par le laboratoire de référence de Belgique (Bruxelles – Pr Olivier Denis) a fait l'objet d'une publication : Deplano A et al. European external quality assessments for identification, molecular typing and characterization of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2018 Oct 1;73(10):2662-2666.

Pour la deuxième année consécutive, le CNR français a organisé le CQE en 2018. Quatorze laboratoires incluant 10 pays y ont participé : Allemagne (n=2), Angleterre (n=1), Belgique (n=1), Danemark (n=2), Ecosse (n=1), France (n=1), Grèce (n=1), Italie (n=2), Irlande (n=1), Portugal (n=1) et Roumanie (n=1).

Le CNR, bien qu'organisateur, a utilisé en interne ce CQE pour le maintien des compétences des techniciens et biologistes du CNR.

Les résultats soumis par le CNR français ont été conformes aux résultats attendus.

1.5.6.2 *Mise en place d'échanges inter-laboratoires pour la détection des gènes *mecA* et *mecC* et codant la leucocidine de Panton Valentine.*

Nous avons mis en place un contrôle externe avec le laboratoire de l'EHGP qui souhaitait évaluer ses techniques de détection de la résistance à la méticilline et des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine. Ce contrôle nous a également été demandé en 2018 pour deux autres laboratoires d'hôpitaux militaires français.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Diagnostic/identification

2.1.1.1 *Techniques d'identification*

PCR agr (dossier accréditation déposé)

Le système *agr* (accessory gene regulator) est un régulateur global qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Sans être un gène de ménage, ce système n'en est pas moins universel au sein de l'espèce *S. aureus* et le polymorphisme observé, distinguant 4 allèles fortement enracinés dans la phylogénie de l'espèce, a permis de développer une PCR d'espèce qui constitue le test diagnostique de base (avec la détection des gènes de résistance à l'oxacilline) pour toute souche arrivant au CNR.

PCR-séquençage du gène *tuf* pour l'identification d'espèce sur souche

Le séquençage du gène *tuf* a été retenu, parmi plusieurs approches moléculaires de type PCR-séquençage de gènes tels que l'ADNr16S, *hsp60*, *sodA*, *rpoB*, *gap*, comme méthode d'identification des espèces de staphylocoques non aureus pour son bon pouvoir discriminant. L'amplification-séquençage du gène *tuf* s'est substituée aux multiples techniques conventionnelles (tests biochimiques) et moléculaires longues, fastidieuses, et d'interprétation parfois délicate pour l'identification des staphylocoques. Cette technique est maintenant utilisée au CNR pour toutes les identifications non concluantes de souches par la technique du Maldi-Tof (insuffisance de la base de données) ou lors de résultats atypiques ou aberrants obtenus au cours de la caractérisation complète des souches.

Identification à l'espèce des staphylocoques par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Depuis 2011, le CNR utilise la technique par spectrométrie de masse MALDI-TOF (VITEK MSTM version 2.0) pour l'identification des souches de staphylocoques reçues principalement des staphylocoques à coagulase négative et des souches de *S. aureus* présentant des caractères « atypiques » ou discordants par les techniques conventionnelles. Les techniques développées au CNR ou mises en place lors du précédent « mandat » : séquençage du gène *tuf* et Maldi-tof ont permis entre 2011 et 2016 de caractériser une centaine de souches au niveau de l'espèce. Les espèces concernées étaient les suivantes : *Staphylococcus argenteus*, *aureus*, *auricularis*, *capitis*, *caprae*, *carneus*, *condimenti*, *epidermidis*, *haemolyticus*, *hominis*, *hyicus*, *intermedius*, *lugdunensis*, *pettenkoferi*, *pseudintermedius*, *saprophyticus*, *schleiferi*, *sciuri*, *warneri*, et *xylosus*¹⁹.

Identification de lignées proches de l'espèce *S. aureus*

Les puces à ADN (*S. aureus* genotyping kit 2.0 – Alere technologies) bien qu'étant essentiellement utilisées dans le cadre d'une caractérisation des facteurs de virulence nous ont également permis d'identifier, depuis 2011, 11 souches appartenant à la lignée *Staphylococcus argenteus*. Cette nouvelle espèce ou lignée *S. argenteus*, isolée d'infections humaines et animales, est assimilée au groupe *S. aureus* dont elle représente la plus proche lignée phylogénétique connue (séquence de rRNA 16S similaire et similitude de nombreux caractères phénotypiques tels que la production de certains facteurs de virulence comme la coagulase). Les souches appartenant à cette lignée sont habituellement identifiées *S. aureus* par la technique de Maldi-tof selon les bases de données actuellement commercialisées. Seules les techniques de séquençage (génomique complète ou MLST) ou les puces à ADN permettent d'identifier correctement les souches appartenant à cette espèce. La base de données actuelle utilisée pour l'interprétation des séquences du gène *tuf* (BIBI) n'a pas encore été mise à jour pour la reconnaissance nominative de

¹⁹ Bergeron M et al. Species identification of Staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-5

cette espèce ; cependant lors de l'alignement de la séquence du gène *tuf* de nos souches de *S. argenteus* dans Genbank, la plus forte homologie est observée avec la séquence correspondant au gène *tuf* de la souche MSHR1132, souche type de *S. argenteus* dont le génome entier a été séquencé. Les puces à ADN reconnaissent également l'espèce *S. schweitzeri*, récemment décrite qui est également proche phylogénétiquement de *S. aureus* et *S. argenteus* mais isolée principalement chez les primates non humains en Afrique²⁰. Aucune souche appartenant à cette espèce n'a été reçue au CNR depuis sa description²⁰.

2.1.1.2 Techniques de caractérisation de la virulence

Recherche globale des entérotoxines A-E directement dans les prélèvements cliniques

Le CNR dispose du kit RIDASCREEN® SET Total (R-Biopharm) qui permet la détection globale par technique immunoenzymatique de type sandwich des entérotoxines SEA, SEB, SEC, SED et SEE de *S. aureus*. En cas d'intoxication alimentaire, la présence globale de ces entérotoxines est recherchée par le CNR dans les produits de vomissements des patients ou les liquides gastriques et digestifs autopsiques à l'aide d'une procédure développée avec l'aide du Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-alfort (Anses). Il faut néanmoins noter que ces recherches sont parfois rendues impossibles en raison du pH trop acide du prélèvement et/ou des volumes de prélèvement requis (>10mL) qui ne sont pas toujours disponibles.

Puces à ADN (dossier accréditation prêt)

Le test *S. aureus* genotyping kit 2.0 (Alere technologies) permet de détecter 336 gènes ou allèles de gènes. L'ensemble du protocole permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée.

Cette technologie a remplacé l'ensemble des techniques de PCR simplex, duplex ou triplex utilisées auparavant par le CNR pour la caractérisation des facteurs de virulence, des gènes de résistance ainsi que pour le typage des souches (*agr*, *SCCmec*,...). Dans le domaine des facteurs de virulence, la puce assure la détection : (i) de l'ensemble de toxines staphylococciques connues à ce jour ainsi que de certains variants ; (ii) de 62 adhésines ou variants d'adhésines, (iii) de gènes impliqués dans la formation de la capsule et du biofilm, (iv) de gènes codant les protéases et autres facteurs de virulence (auréolysine, exfoliatine, ACME,...), (v) de gènes régulateurs (*agr*, *saer/S*, *vraR/S*, *sarA*).

L'utilisation de cet outil moléculaire sur toutes les souches reçues au CNR est sans équivalent en Europe et a permis au CNR d'assurer une caractérisation extensive des facteurs de virulence des différents clones circulants en France et une exploration des supports moléculaires des différentes formes cliniques d'infection staphylococcique.

Cet outil permet aussi d'analyser les gènes de résistance aux antibiotiques (voir ci-après dans le document) et d'assurer un assignement de la souche testée aux clones SASM ou SARM reliés génétiquement (voir ci-après dans le document).

PCR toxine simplex (dossier déposé en octobre 2019)

En cas de résultat(s) douteux avec la puce à ADN pour un des gènes codant les toxines staphylococciques, le CNR a maintenu en technique de recours des PCR simplex avec révélation en gel pour les gènes des principales toxines (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sel*, *sem*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *eta*, *etb*, *etd*, *tst*, *lukSF-PV*).

PCR toxine PVL en urgence sur souche (accréditée)

²⁰ Tong SY et al. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65:15–22

La détection rapide des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser la prise en charge des patients notamment en cas de suspicion de pneumopathie nécrosante. La mise à disposition d'un tel outil peut permettre une confirmation rapide du diagnostic et la mise en place de thérapeutique ciblée (antibiotiques « anti-toxiques », Immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine a été mise en place au CNR à partir des souches. La technique utilise une extraction manuelle et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV* avec révélation par incorporation de SYBR GREEN. Le résultat est disponible en 3 heures et peut être transmis immédiatement au laboratoire prescripteur.

2.1.1.3 Techniques immunologiques de diagnostic indirect

Sérologies TSST-1 et PVL

Le CNR a développé depuis 2011 deux techniques sérologiques pour l'aide au diagnostic et au suivi des pathologies associées à la leucocidine de Panton Valentine (PVL) et à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). La PVL est associée à des infections suppuratives sévères, dont la pneumonie nécrosante, et la TSST-1 au choc toxique staphylococcique menstruel (MTSS), chez la femme jeune ne possédant pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine, et au choc toxique non menstruel (NMTSS).

Les anticorps sériques dirigés contre la PVL ou la TSST-1 sont quantifiés par méthode ELISA et comparés à un calibrateur stable issu d'un pool de donneurs sains. Les seuils décisionnels et les performances analytiques de ces méthodes ont été déterminés en comparant les taux d'anticorps anti-PVL et anti-TSST-1 : (i) dans une population de témoins sains (patients adultes donneurs de sang, n=200) ; (ii) chez des patients présentant une infection à *S. aureus* PVL-positif (n=24) ; et (iii) chez des patientes présentant un MTSS (n=6). Les taux d'anticorps ont été exprimés en unités arbitraires (UA/mL), 1000 UA/mL représentant le taux observé pour des immunoglobulines humaines polyclonales (Tégéline®) à 12,5 g/L.

Sérologie PVL. Les taux moyens d'anticorps anti-PVL chez les témoins et les patients infectés à *S. aureus* PVL-positif étaient respectivement de 1534 UA/mL et 40873 UA/mL. La courbe ROC et l'indice de Youden ont permis de définir un seuil décisionnel (>4900 UA/mL) permettant le diagnostic rétrospectif d'infection à *S. aureus* PVL-positif avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% dans la population française.

Sérologie TSST-1. Le taux moyen d'anticorps anti-TSST-1 chez les témoins était de 1282 UA/mL. Un taux de 0 UA/mL était retrouvé chez 100 % des patientes ayant présenté un MTSS, contre seulement 5 % des témoins (n=10 sur 200), et 9,4% des femmes de 18 à 40 ans (n=5 sur 53). Face à une clinique évocatrice, l'absence d'anticorps anti-TSST-1 à la phase aigüe du choc est donc en faveur du diagnostic de MTSS (sensibilité 80%, spécificité 90%).

Si l'isolement des souches de *S. aureus* responsables des signes cliniques doit demeurer un objectif prioritaire, nous avons montré que ces deux sérologies constituent des outils rétrospectifs pouvant concourir au diagnostic de certaines infections toxiques staphylococciques. Elles sont contributives lorsqu'un diagnostic direct est impossible (notamment lors de traitement antibiotique précoce ayant pu négativer les prélèvements bactériologiques), ainsi que pour estimer le risque de récurrence de MTSS en cas de persistance d'une séronégativité.

La sérologie PVL peut présenter un intérêt dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même s'il nous reste encore à investiguer la cinétique de séroconversion. Dans le cas de la sérologie TSST-1, l'absence d'anticorps à la phase aigüe du choc en période menstruelle est en faveur d'un choc toxique staphylococcique ; le suivi sérologique permet d'observer une absence de séroconversion chez la majorité des patientes. Or, la persistance d'un taux négatif à distance de l'épisode de choc est associée à un risque accru de récurrence et conduit donc à conseiller aux femmes concernées de s'abstenir d'utiliser des tampons vaginaux ou des coupes menstruelles.

Une **sérologie alpha-toxine** a également été mise en place : il s'agit d'une sérologie contrôle. L'alpha-toxine est une toxine quasi-constante chez *S. aureus* (car codée par le *core-genome*). Toute la population générale étant exposée à des souches de *S. aureus*, des anticorps anti-alpha-toxine sont présents systématiquement chez tous les patients.

2.1.2 Typage (marqueurs épidémiologiques)

La caractérisation des liens de clonalité entre souches de *S. aureus* nécessite l'utilisation d'une ou de plusieurs méthodes de typage infra-spécifique. Différentes approches ont été développées au CNR afin d'analyser le fond génétique des isolats cliniques et le cas échéant de les rattacher à certains clones épidémiques, endémiques ou pandémiques.

Identification des groupes *agr* (dossier déposé)

Le système *agr* (accessory gene regulator) est un régulateur global qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Un polymorphisme dans la séquence en aa du récepteur (AgrC) et de l'autoinducteur (AIP dérivé d'AgrD) permet de définir quatre allèles *agr* sur la base d'une PCR multiplex emboîtée développée par le CNR. La divergence des allèles *agr* est un événement évolutif ancien qui permet de séparer l'espèce *S. aureus* en quatre fonds génétiques distincts : *agr* 1, 2, 3 et 4. Cette PCR qui permet en outre de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *S. aureus* représente le test de base (avec la PCR *mecA*) pour toutes les souches lors de leur arrivée au CNR.

Caractérisation de la Casette SCC*mec*

L'élément génétique mobile portant le gène *mecA* est appelé cassette SCC*mec* ou « Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* ». Il existe plusieurs types de cassette dont la structure et la taille varient. Elles sont toutes formées de deux éléments essentiels : le complexe *mec* et les gènes codant les recombinases. Le complexe *mec* est composé du gène *mecA*, des éléments de régulation *mecI* et *mecR1*. Des variations ont été détectées, notamment des délétions ou des insertions partielles dans les gènes de régulation de *mecA*, donnant naissance à quatre types de complexes *mec* : classe A, B, C, et D. Les gènes codant les recombinases, responsables de l'intégration et de l'excision de la cassette forment eux le complexe *ccr*. Il est impliqué dans l'intégration au niveau d'un site spécifique des cassettes SCC*mec*. Différents types ont été caractérisés : *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4*, *ccrC1*, *ccrC2*. La combinaison des quatre classes de complexe *mec*, des six types de recombinases, et différents types de jonction J1 (région entre *ccr* et la partie droite du chromosome), J2 (entre *mec* et *ccr*) et J3 (entre *orfX* et *mec*, contenant de nombreux gènes et pseudogènes) permet de définir à ce jour 13 types de cassettes SCC*mec* différentes.

Le CNR dispose d'outils de PCR assurant la détection rapide des différents complexes *mec* et *ccr* (PCR-M1 et PCR-M2 de Kondo). Cette approche est complétée par les données provenant directement des puces à ADN qui permettent notamment la détermination des complexes *mec* et des combinaisons de recombinases.

Le *dru*-typing

Afin de disposer d'outils complémentaires de caractérisation des clones de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistant à la pénicilline, un outil permettant de caractériser rapidement la nature des cassettes SCC*mec* insérées au sein du gène *orfX* a été implémenté au CNR en 2014. La technique, appelée *dru*-typing (direct repeat units-typing), a pour but d'amplifier une série de séquences répétées de 40 paires de composition variable située à côté de la séquence d'insertion IS431 présente au sein de la cassette SCC*mec*. Le produit d'amplification est ensuite séquencé. La nature (enchaînement de bases) et le nombre des séquences répétées permet de définir une combinaison particulière dénommée *dru*-type et signalée par le préfixe dt, un chiffre différent pour chaque combinaison. Plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir discriminant de cette approche pour différencier les clones de staphylocoques résistant à la pénicilline.

Technique de MLST

Elle consiste en un séquençage de 7 gènes d'environ 500 pb impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de l'espèce *S. aureus* (gènes de « ménage »). Pour chacun des 7 gènes, chaque séquence différente représente un allèle auquel un numéro arbitraire est attribué par la base de données MLST (multilocus sequence type) (<http://www.mlst.net>) quelle que soit l'origine de la différence, mutation ponctuelle ou large

recombinaison. Chaque isolat est désigné par la combinaison de sept chiffres formant ainsi le « Sequence Type » ou ST ou profil allélique. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement relié entre eux et peuvent être alors regroupés au sein d'une même unité : le complexe clonal (CC). Chaque CC est désigné par le numéro du ST considéré comme l'ancêtre à l'aide du logiciel eBURST® permettant de définir des familles. Cette technique, appliquée à partir de l'an 2000 à l'espèce *S. aureus* présente de nombreux avantages : une excellente corrélation avec le PFGE, une excellente reproductibilité, des données facilement comparables car basées sur des séquences génomiques et un échange aisé des données grâce à une base de données accessible par internet et continuellement actualisée. Enfin, cette technique permet la réalisation de modèles d'évolution, permettant de comprendre l'apparition temporelle des clones de *S. aureus*. Sa nomenclature continuera vraisemblablement de perdurer quand le séquençage de génome entier (qui donne lui-même accès à la séquence de ces gènes de ménage) aura progressivement remplacé les autres techniques.

Technique de *spa*-type

Cette technique est basée sur le séquençage de la région polymorphique de la protéine A (codée par le gène *spa*) qui, bien que basée sur le polymorphisme de ce seul gène (délétions, insertions, duplications, mutations ponctuelles), est un bon reflet du fond génétique d'un isolat. A chaque variation tant de la séquence que du nombre des répétitions de 21 paires de bases de cette région variable de la protéine A, un numéro arbitraire est attribué à l'aide du serveur «RidomStaph Type Software » (<http://www.spaserver.ridom.de/>). L'utilisation d'un tel outil permet de collecter et d'harmoniser l'ensemble des données. De plus, les séquences saisies sont automatiquement contrôlées permettant un haut niveau de qualité. Cette technique génère alors des « types *spa* » (par exemple t004), que le logiciel regroupera au sein de « *spa*-CC » ou complexes clonaux « *spa* », contenant des « types *spa* » proches. Cette technique apparaît comme plus discriminante que la MLST et de réalisation plus facile et moins coûteuse, car ne nécessitant le séquençage que d'un seul gène. Elle reste donc utilisée au CNR en routine. Cependant, cette méthode est moins discriminante que le séquençage de génome entier qui devrait progressivement s'imposer.

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

Cette technique historique est utilisée lors de l'investigation d'épidémies ayant des fenêtres temporelles et spatiales étroites, car c'est une des techniques la plus discriminante à l'exception du séquençage génome entier. L'ensemble des résultats analysés à l'aide du logiciel BioNumerics® permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline. Cette technique est surtout utilisée pour le typage de souches de staphylocoques non *aureus*, espèces pour lesquelles les techniques de *spa*-typing, MLST *aureus*, puces à ADN ne sont pas utilisables.

Puces à ADN

En plus de son apport dans la caractérisation de la virulence et de la résistance, cette technologie apporte aussi une solution innovante au problème de l'identification et du typage de *Staphylococcus aureus*. En effet pour une souche clinique donnée la comparaison de l'ensemble des informations génétiques recueillies grâce à la puce avec la base de données implémentées sur l'automate (et mise à jour régulièrement), permet d'assigner chaque souche testée à un clone de SARM ou SASM. Les puces à ADN permettent donc à la fois de connaître rapidement et en temps réel : (i) à l'échelle individuelle : la nature du clone impliqué dans la forme clinique rapportée par le prescripteur pour le patient concerné, (ii) à l'échelle collective : la nature des clones circulants en France qui sont adressés au laboratoire. Ces informations permettent donc un suivi de l'épidémiologie à l'échelle locale, régionale ou nationale et éventuellement une alerte rapide en cas d'apparition de nouveaux clones.

2.1.3 Techniques de séquençage

L'utilisation du séquençage de haut-débit (NGS) a pour objectif l'amélioration des missions du CNR en ce qui concerne : (i) l'identification de souches, (ii) la recherche de liens de clonalité, à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés et (iii) pour la surveillance avec une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones présents sur le territoire français.

Cette méthode est à présent en phase d'implémentation progressive au sein du CNR des Staphylocoques. Le CNR dispose d'un accès à la plateforme de séquençage génomique des HCL qui comporte notamment un séquenceur NextSeq (Illumina). Ce séquenceur permet un débit maximal de 120 Gb (400 millions de « reads ») par run. Dans la présente période d'évaluation, le CNR réalise un run par mois. Entre 40-50 souches sont séquencées par run en utilisant un séquençage « pair-end » (2x150 bp) visant une couverture moyenne de 30x.

Au sein du CNR, les souches d'intérêt clinique et des souches de référence sont choisies pour permettre d'évaluer la performance des données NGS par rapport à l'identification et typage déjà connus (puces ADN, phénotype de résistance, etc). La culture des souches et l'extraction d'ADN sont réalisées par des technicien(nes) du CNR des Staphylocoques et un ingénieur hospitalier du CNR est responsable de la préparation des banques (bibliothèques) d'ADN pour chaque run.

Voir paragraphe 2.6. du rapport

2.1.4 Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

Détection des gènes *mecA/mecC* de résistance à la méticilline (dossier accréditation déposé)

Les gènes *mecA/mecC* sont recherchés par PCR duplex maison pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative. Cette technique est effectuée sur toutes les souches de *S. aureus* reçues au CNR.

Détection PLP2a

Le test Clearview Exact PBP2a® (Alere) est disponible au CNR pour la recherche sur souche de l'expression de la PLP2a chez *S. aureus*. Ce test a remplacé les tests d'agglutination latex moins performants et moins faciles d'utilisation.

Détection de la résistance aux glycopeptides

Pour ce qui concerne la détermination de la CMI en milieu liquide selon les recommandation EUCAST/CASFM, le CNR utilise depuis 2017 le test UMIC Vancomycine-Teicoplanine (Biocentric).

A partir de colonies isolées d'une culture bactérienne pure de 24h, un inoculum de 0.5Mcf est réalisé dans du sérum physiologique puis une dilution au 1/100 dans 1:100 dans un bouillon Muller Hinton II. Enfin, 100µl de la suspension diluée sont transférée dans chaque puits pour inoculer la galerie UMIC avant de la recouvrir avec le couvercle de plaque. L'incubation est réalisée à 36°C pendant 18h. La lecture visuelle de la turbidité dans chacune des cupules est reportée sur la feuille de résultats (fourni dans le coffret). Le 1er puits correspond au contrôle de croissance (GC). Du 2^{ème} au 12^{ème} puits, nous disposons d'une concentration croissante d'antibiotiques (de 0.25 à 4 mg/L pour la vancomycine et de 0.25 à 8 mg/L pour la teicoplanine). La CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne (ce qui correspond à la 1ère cupule limpide). Les concentrations critiques en mg/L selon le CASFM 2017 sont :

- *Staphylococcus aureus* : vancomycine et teicoplanine ≥ 2 mg /L
- Staphylocoque coagulase négative : vancomycine ≥ 2 mg/L et teicoplanine ≥ 4 mg /L.

En cas de dépistage positif, la conformation définitive repose sur une analyse de population selon la technique d'Hiramatsu :

- sans induction sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.
- après induction 48h en bouillon cœur-cerveille contenant 2 mg/L de vancomycine puis inoculation sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine. Le dépôt sur les géloses cœur-cerveille s'effectue un même jour (induction simple) et toutes les 48 h (induction en cascade). La nature des courbes obtenues permet de confirmer ou d'infirmer la résistance.

Détection du gène *vanA/B* par PCR

Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une dizaine de souches de *S. aureus* à travers le monde mais son apparition et sa dissémination en France constituent une source d'inquiétude majeure. Dans le cadre de son rôle de surveillance continue des résistances, le CNR assure un criblage de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui sont adressées grâce à la puce à ADN (utilisée en systématique) qui comporte des spots dédiés à la détection des gènes *vanA*, *vanB*, et *vanZ*. A ce jour, aucune souche de *S. aureus* portant ce mécanisme de résistance n'a été identifiée en France.

Détermination de la résistance aux antibiotiques par puces à ADN

La puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® comme décrit plus haut permet en une seule réaction de PCR et d'hybridation d'avoir accès à un large panel de gènes. Quarante-neuf gènes ou variants de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et antiseptiques chez *S. aureus* sont criblés avec la puce à ADN (Tableau 3). Les gènes codant la PLP2a, les méthylases (*erm*), pompes (*msrA*) et enzymes (*linA*) conférant la résistance aux macrolides, les enzymes altérant les aminosides, mais aussi les gènes *mup* (résistance à la mupirocine) ou *qac* (résistance aux ammoniums quaternaires), les résistances aux glycopeptides des entérocoques de type *van* (*vanA*, *vanB*, *vanZ*, potentiellement transférables chez *S. aureus* comme cela a été décrit sporadiquement) sont notamment inclus. Au total, la caractérisation moléculaire de la cassette *SCCmec* est aussi possible grâce à cet outil.

Tableau 3- Ensemble des gènes de résistance détectés avec la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere)

<i>blaZ</i>	<i>mpbBM</i>	<i>sat</i>	<i>fexA</i>
<i>blaI</i>	<i>vatA</i>	<i>dfrA</i>	<i>fosB</i>
<i>blaR</i>	<i>vatB</i>	<i>far1</i>	<i>qacA</i>
<i>ermA</i>	<i>vga</i>	<i>mupR</i>	<i>qacC</i>
<i>ermB</i>	<i>vgaA</i>	<i>tetK</i>	<i>vanA</i>
<i>ermC</i>	<i>vgb</i>	<i>tetM</i>	<i>vanB</i>
<i>linA</i>	<i>aacA-aphD</i>	<i>tetEfflux</i>	<i>vanZ</i>
<i>msrA</i>	<i>aadD</i>	<i>cat</i>	
<i>mefA</i>	<i>aphA-3</i>	<i>cfr</i>	

Détermination de la résistance au linézolide

Elle repose sur la recherche des déterminants génétiques qui aboutissent à la modification du site de liaison du linézolide au ribosome.

. des PCR spécifiques ciblant le locus *cfrA*, le locus *cfrB* (décrit en 2015) en position plasmidique qui codent des méthylases modifiant l'ARN 23S à la position 2503, ont été développées. Les souches que le CNR a été amené à expertiser étaient essentiellement des staphylocoques à coagulase négative adressés pour recherche spécifique du mécanisme associé à une résistance au linézolide détectée phénotypiquement par le laboratoire demandeur. Il faut noter que le premier *S. aureus* positif pour le gène *cfrA* a été détecté en juillet 2015. Cette modification confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (Linézolide), Pleuromutilins et Streptogramine A. Ce mécanisme conduit à des hauts niveaux de résistance au linézolide (CMI > 256 mg/L). Le CNR assure par ailleurs un criblage systématique de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui sont adressés, puisque la puce à ADN utilisée dispose d'un spot spécifique pour la détection du gène *cfrA*.

. une PCR spécifique ciblant les locus *optRA* (décrit en 2015) et *poxtA* (décrit en 2018) en position plasmidique qui code pour des ABC-transporteur conférant une résistance de haut niveau au linézolide, a été récemment mise en place au CNR.

. la résistance au linézolide pouvant aussi être associée à des mutations dans la séquence de l'ARN 23S (une vingtaine sont décrites jusqu'à présent) et dans les séquences codant les protéines ribosomales L3 et L4 (plus d'une dizaine) le CNR a développé une approche par PCR-séquençage des régions d'intérêt.

Détermination des CMI par dilutions en milieu liquide et par dilutions en milieu gélosé

Outre les techniques d'antibiogramme en milieu liquide (Vitek, bioMérieux) et en milieu solide (diffusion en gélose). Le CNR dispose de l'ensemble des outils (réplicateur de Steers) et des personnels techniques formés pour la réalisation des mesures de CMI par les méthodes standard de référence (dilutions en milieu liquide, dilutions en milieu gélosé). Ces techniques sont utilisées lors des protocoles (ex : Etude endocardite ; Etude IOA), lorsqu'un grand nombre de souches doit être étudié, ou pour des vérifications de résultats obtenus par des méthodes commerciales.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Dans le cadre de son expertise sur la résistance aux antibiotiques, le CNR avait adressé un document de synthèse au CA-SFM concernant l'analyse de ses recommandations 2017. Le CNR a notamment proposé une simplification des recommandations sur la détermination de la sensibilité des staphylocoques dorés et bancs aux glycopeptides. Le CA-SFM a pris en compte l'ensemble des remarques et recommandations du CNR et la version la plus récente du document du CA-SFM reprend l'ensemble des propositions du CA-SFM.

Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

Rappel : cette annexe doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

3.1 Permanence du CNR ²¹

- *Horaires de fonctionnement habituels du CNR ;*
- *Personne(s) à contacter en cas d'urgence en dehors de ces horaires : mentionner ici les numéros de téléphone permettant de contacter le (la) responsable du CNR ou son adjoint(e), ainsi que tout autre numéro permettant de joindre le CNR (si existant).*

3.2 Autorisations MOT ²²

- *Une personne est-elle autorisée par l'ANSM à effectuer des opérations sur les MOT pour les activités du CNR ? A défaut, une demande d'autorisation a-t-elle été déposée à l'ANSM et à quelle date ?*
- *Si OUI, qui est titulaire ²³ ou demandeur de cette/ces autorisations(s)*

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

- *Le personnel du CNR inclut-il au moins un(e) biologiste médical au sens de l'article L6213-1 ou de l'article L6213-2 du Code de la santé publique ? Préciser le nom de cette (ces) personne(s) et à quel titre elle(s) est (sont) autorisée(s) à exercer la biologie médicale.*
- *Pour le (la) responsable du CNR ou son adjoint(e) ayant déposé un dossier d'autorisation à la Commission nationale de biologie médicale (CNBM), date du dépôt du dossier et nature de la réponse.*

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition des budgets MIGAC ou Santé publique France (texte libre)

3.6 Autres remarques à destination du comité des CNR (texte libre)

²¹ Ces informations seront conservées exclusivement par Santé publique France aux seules fins de contacter un CNR en cas d'urgence ; elles ne seront pas rendues publiques.

²² Micro-Organismes et Toxines de la liste prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. La liste des MOT est actuellement fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par les arrêtés du 6 novembre 2014 et par l'arrêté du 2 octobre 2015.

²³ Ne pas indiquer les personnes habilitées mais seulement les personnes titulaires.

Annexe 4 : Résultats enquête réseau résistance

PARTENAIRES RESEAU	ALERTE												SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE PHENOTYPES RARES										ENQUETES								
	Staphylocoques		Entérocoques		Entérobactéries						Non fermentants		Staphylocoques		Entérocoques		Entérobactéries			Non fermentants		EPC	Staphylocoques	Entérocoques	Entérobactéries						
	Tous	Tous	<i>E. faecalis</i>	Tous	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i> BLSE	Toutes	<i>E. coli</i> / <i>K.pneu</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	SARM	<i>S. aureus</i>	Tous	<i>E. faecium</i>	Tous	Tous	Toutes	Toutes	Toutes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>	Toutes	Tous	Tous	Toutes				
	Daptomycine R	Gentamicine R Colistin R	Ampicilline V/R	Daptomycine R	Tigécycline V/R	Amoxiclavine R Ampic C. clov R	Témoins (10-17mm)	Ceftazidime/avé R	Colistine R	Tigécycline V/R	Colistine R	Ceftazidime/tazé R	Pen G R - Ose R Fic. R (ces isolés)	Mérog R - Ose R (rec. tabac)	Glycopeptides R	Lincosolide R	Ampicilline V/R	Gentamicine R (haut niveau)	Vancomycine R	BLSE	Genta/Tobrac/Akn R (contact)	Fusidomycine R	Ceftazidime/avé R	Ceftazidime/tazé R	Implémine V/R Miropléme V/R	EPC	Oxacidimone R	Oxacidimone R	Amp C plasmidiques	Genta/Tobrac/Akn R (contact)	
Aix-en-Provence	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Amiens	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Angers	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Argenteuil	O	N	O	O	O	N	O	N	O	N	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	N	N	O	O	O	
Bayonne	O	O	O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	
Beauvais	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Besançon	O	N	O	O	O	O	O	N	O	N	O	O	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Bordeaux	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	
Cholet	N	N	O	N	N	O	O	N	N	N	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	N	O	N	O	O	N	O	N	N	N	
Clermont-Ferrand																															
Colmar	O	N	O	N	N	O	O	O	N	N	N	O	O	O	N	O	O	N	O	N	N	N	N	O	N	N	N	N	N	N	
Créteil - CHC																															
Limoges	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N
Lyon																															
Mamoudzou (Mayotte)	N	N	O	N	N	N	N	N	N	N	N	O	O	N	O	N	N	N	N	N	N	N	N	O	N	O	O	O	O	N	
Montpellier	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Nancy	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Nantes	O	N	N	O	N	N	N	N	O	N	N	N	N	N	N	O	N	N	N	N	N	N	O	O	N	N	N	N	N	N	
Nevers	O	O	O	O	N	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Nouméa (Nouvelle Calédonie)	N	N	O	N	O	N	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	
Paris - Ambroise Paré	O	O	N	O	N	N	N	N	N	N	N	O	O	O	N	N	N	O	O	O	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O
Paris - Bichat	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Paris - Cochin	O	O	O	O	O	N	O	N	O	N	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	N	O	N	N	N
Paris - Kremlin-Bicêtre																															
Paris - Necker	O	N	O	O	N	N	N	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	N	O	O	O	O	O	N
Reims	N	N	O	N	N	N	N	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O
Rennes	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Saint-Denis (La Réunion)	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N
Saint-Etienne	O	O	N	O	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Suresnes - Fach	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Toulon	O	N	N	N	N	O	O	N	O	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	O	N	O	O	O	O	N	N	N	N	N	N
Tour	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	N	N	N	N	N	N
Versailles Le Chesnay	O	O	O	O	O	N	N	O	O	O	O	O	N	O	N	O	N	O	O	N	N	N	N	O	O	O	O	O	O	O	O

Annexe 5 : Lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques

(A faire en double exemplaire)

En réponse de la requête émise par :
désigné Demandeur
du matériel :

au Centre National de Référence des Staphylocoques désigné CNR-S.

Le CNRS demande que le Demandeur accepte que :

- Le matériel fournis par le CNR-S reste la propriété du CNR-S et qu'il est mis à la disposition de Demandeur pour ses activités.
 - Le Matériel est utilisable pour l'enseignement et la recherche à but non lucrative.
 - Le Matériel ne pourra pas être redistribué par le Demandeur à un tiers autre que les collaborateurs impliqués dans la réalisation du programme de travail et travaillant directement sous l'autorité du responsable du laboratoire destinataire. Toute demande sera automatiquement signalée au CNR-S et le transfert ne pourra se faire qu'après signature d'une Lettre d'agrément pour transfert de matériel avec le nouveau Demandeur et le CNR-S.
 - Les deux parties s'engagent à garder confidentielles toutes les informations transmises oralement, par écrit ou de toute autre manière, dans le cadre du présent Accord et se rapportant au MATERIEL. Ces INFORMATIONS ne pourront pas être communiquées à des tiers sans autorisation préalable et écrite.
 - Le Demandeur informera le CNR-S, de manière régulière et confidentielle, des résultats de ses travaux obtenus avec ou à partir du MATERIEL
 - Conformément aux usages scientifiques en vigueur, toutes les publications ou communications ayant trait à l'utilisation du MATERIEL font référence à l'origine CNRS. De même, la contribution des agents CNR-S ayant rendu le MATERIEL accessible sera mentionnée expressément dans toutes les publications ou communications, soit par remerciements, soit en qualité de co-auteurs.
 - Le CNR-S est reconnu comme le propriétaire exclusif du MATERIEL et des droits de propriété intellectuelle afférents.
 - Il est expressément convenu entre les Parties que le droit d'utilisation du MATERIEL concédé au titre du présent Accord ne peut, en aucun cas, être interprété comme conférant, de manière expresse ou implicite, à un quelconque droit ou titre de propriété, ou option ou licence sur le MATERIEL fourni par le CNR-S.
 - Au cas où les résultats obtenus seraient susceptibles de conduire au dépôt d'une demande de titre de propriété industrielle, les Parties décideront d'un commun accord de la stratégie à mettre en œuvre en matière de protection et d'exploitation de ces résultats et, le cas échéant, des personnes habilitées à procéder à un tel dépôt et/ou à une telle exploitation.
 - Le Demandeur reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRS ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.
 - Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
 - Le Demandeur s'engage à utiliser le MATERIEL selon les lois et réglementations en cours.
 - Le MATERIEL est accessible gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition)
- Le Demandeur et le CNR-S, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signée étant gardée par le Demandeur et l'autre par le CNR-S.

Le Centre National de Référence des Staphylocoques

Nom de la personne autorisée :

En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Staphylocoques,

Adresse : Centre de Biologie et de Pathologie Nord, IAI, 103 grande rue de la Croix-Rousse, 69317 LYON cedex 04

Signature

Le Demandeur :

Nom de la personne :

Organisation :

Adresse :

Signature

Date

Annexe 6 : Sommaire du Manuel qualité du laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon



CBN- I.A.I.
Bât. O
103 Grande-Rue de la
Croix-Rousse
69300 LYON

LBMMS - MANUEL QUALITE DU
LBMMS DU CHU DE LYON

Ref : MU-POL-MQ-001-05
Version : 05
Applicable le : 08-06-2018



Manuel qualité

Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de LYON

Hospices Civils de Lyon
Bâtiment A
162 Avenue Lacassagne
69424 LYON Cedex 03

Tel : 04 72 11 51 72
Fax : 04 72 11 51 79

Diffusion contrôlée

Diffusion non contrôlée



Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

Référentiels NF ISO EN 15189 - NF ISO EN 22870 – NF EN ISO 17025

Page 2/39

Sommaire	
SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	5
PRESENTATION DU LABORATOIRE	6
ORGANISATION DU LABORATOIRE	9
A / DEFINIR LA POLITIQUE ET L'ORGANISATION DU LBMMS (POL)	10
A1. Politique qualité et engagement de la direction	10
A2. Organisation des responsabilités	10
A3. Organisation de la qualité au LBMMS	11
A4. Communication et éthique	12
A4.1 Communication interne	12
A4.2 Communication avec les professionnels de santé	13
A4.3 Communication avec les patients	15
A4.4 Ethique	16
B / SURVEILLER ET AMELIORER LES PERFORMANCES (S&A)	16
B1. Processus de gestion documentaire	16
B2. Vigilances	18
B3. Satisfaction des utilisateurs	18
B4. Suivi des indicateurs	19
B5. Gestion des audits internes	19
B6. Maîtrise des non-conformités	20
B7. Gestion des actions correctives et préventives	20
C / PRE-ANALYTIQUE (PreA)	22
C1. Sous-traitance	23
D / ANALYTIQUE (ANA)	24
E / POST-ANALYTIQUE (PostA)	26
F / BIOLOGIE DELOCALISEE (EBMD)	28
G / GERER LES RESSOURCES HUMAINES (RH)	28
H / GERER LES SYSTEMES INFORMATISES (SI)	29
I / ACQUERIR ET GERER LES MATERIELS ET LES PRESTATIONS (ACHAT)	30
I1. Maîtrise des achats	31
I2. Maîtrise des matériels, réactifs et prestations	31
J/ GERER LA METROLOGIE (METRO)	32
K/ MAITRISER LES LOCAUX, L'HYGIENE, ET LA SECURITE (H&S)	33
L / PROCESSUS HORS PERIMETRE D'ACCREDITATION	34
L1. Gérer le dossier administratif et la facturation	34
L2. Assurer la mise en œuvre des protocoles de recherche	34
L3. Gérer la Biothèque hors Centre de Ressources Biologiques des HCL	34
L4. Assurer des consultations d'expertises	35
L5. Former des étudiants	35
ANNEXE 1- POLITIQUE QUALITE DU LBMMS DU CHU DE LYON	36
ANNEXE 2- Corrélation NF EN ISO 15189 et Manuel Qualité	38
ANNEXE 3- Corrélation NF EN ISO 17025, NF EN ISO 15189 et Manuel Qualité	39

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-05)

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

Référentiels NF ISO EN 15189 - NF ISO EN 22870 – NF EN ISO 17025

Page 3/39

Version : 01	Date d'application : 01/06/2013
Version : 02	Date d'application : 15/05/2014
Version : 03	Date d'application : 24/06/2015
Version : 04	Date d'application : 01/09/2017
Version : 05	Date d'application : 08/06/2018
Motif de révision :	
<ul style="list-style-type: none"> - Création d'un processus analytique « Biologie Environnementale » - Explication du lien entre les SMQ selon les normes 15189 et 17025 - Mises à jour des documents liés et informations des différents chapitres, particulièrement : <ul style="list-style-type: none"> - Mise à jour de l'organigramme fonctionnel (page 11) - Mise à jour du chapitre A4 Communication (pages 12 à 14) - Ajout d'un paragraphe sur la prescription connectée au chapitre C (page 22) - Mise à jour de la Politique Qualité 	
Rédaction : PILOTES DE PROCESSUS	
Vérification : Mylène GADOUX, RQ LBMMS, Maud BAUME, Adjointe	
Approbation : Pr Claude NEGRIER, Biologiste responsable du LBMMS, Chef de Pôle Activité Médicale Biologie et Anatomie et Cytologie Pathologiques, Dr Anne MIALON, Adjointe	