Rapport annuel d'activité

2018

Centre national de référence des Staphylocoques

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

Année d'exercice

2017

STAPHYLOCOQUES
Centre National de Référence

Hospices Civils de Lyon

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 7

2. ACTIVITES D'EXPERTISE 9

2.1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES 9
2.2. TRAVAUX D'EVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES 10
2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES 10
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'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS 15
3.2.1. *Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique 15*
3.2.2. *Syndromes d'exfoliation staphylococcique 17*
3.2.3. *Infections suppuratives à S. aureus PVL+ 19*
3.2.4. *Furonculoses familiales 21*
3.2.5. *Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine 21*
3.2.6. *Intoxications alimentaires individuelles et collectives 24*
3.2.7. *Ostéites et infections ostéo-articulaires 24*
3.2.8. *Sérologies PVL et TSST-1 ..... 25*
3.3. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX 26
3.3.1. *Définition de l'échantillon de souches testées 26*
3.3.2. *Définitions utilisées pour exprimer la résistance 28*
3.3.3. *Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances 28*
3.3.4. *Analyse des tendances 34*
3.4. INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX 34
3.5. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE 35

4. ALERTE 38

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 38
4.2. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX 38
4.2.1. *Épidémies de S. aureus dans plusieurs services de néonatalogie en France 38*
4.2.2. *Épidémie dans une Maison d'Enfants à Caractère Social 41*
4.2.3. *Épidémie d'infections à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement 42*
4.2.4. *Recherche de lien de clonalité 42*
4.2.5. *Alerte Vitek 43*
4.3. ANALYSER DES TENDANCES ET LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME LORS DE L'ALERTE 44

5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 44

5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE 44
5.1.1. *Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires pour le transfert de techniques 44*
5.1.2. *Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) 45*
5.1.3. *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR : 45*
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), ... 46*
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES 46
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC …) 47

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR 49

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 49
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE L'ANNEE N, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR 51

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX 57

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES 57

8.1. ACTIVITES D'EXPERTISE 57

8.1.1. *le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer 57*

8.1.2. *Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu 57*

8.1.3. *Les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés 58*

8.1.4. *les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR. 58*

8.2. ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION 61

8.2.1. *Les projets de formation envisagés 61*

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) 61*

8.2.3. *Les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales 62*

8.3. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE 62

8.3.1. *Les projets de constitution, développement, animation de réseaux de partenaires 62*

8.3.2. *La contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels 63*

8.3.3. *La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux 63*

8.3.4. *Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance 64*

8.4. CONTRIBUTION A L'ALERTE 64

ANNEXE 1- MISSIONS & ORGANISATION DU CNR 65

1.1. MISSIONS DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES 65

1.2. ORGANISATION DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES 66

1.3. LOCAUX ET EQUIPEMENTS 67

1.4. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE 69

1.5. DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE 70

1.5.1. *L'enjeu de l'accréditation 70*

1.5.2. *Structure qualité du laboratoire 70*

1.5.3. *Audits 71*

1.5.4. *Logiciel de gestion de la qualité 71*

1.5.5. *Avancement de la démarche qualité 71*

1.5.6. *Contrôles qualité 72*

ANNEXE 2- CAPACITES TECHNIQUES DU CNR 74

2.1. LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE 74

2.1.1. *Diagnostic/identification 74*

2.1.2. *Typage (marqueurs épidémiologiques) 77*

2.1.3. *Techniques de séquençage 79*

2.1.4. *Evaluation de la sensibilité aux anti-infectieux : 79*

2.2. LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR 82

ANNEXE 3- AUTRES INFORMATIONS 85

ANNEXE 4- LETTRE D'AGREMENT POUR TRANSFERT DE MATERIEL DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES STAPHYLOCOQUES 86

ANNEXE 5- SOMMAIRE DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES DU CHU DE LYON 88

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 2017 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 (2490) souches et ADN analysées, 442 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 de la transmission grâce à l'implémentation du NGS. Ce dernier a permis de proposer des conclusions définitives dans l'investigation de divers épisodes épidémique ou cas groupées là où les méthodes conventionnelles ne permettaient qu'une conclusion prudente : exemple identification d'une souche endémique du clone Géraldine dans un service de néo-natologie comme en témoigne l'existence d'un maximum de 18 SNPSs d'écart entre les souches isolées sur une période de 3 ans dans ce même service, ou encore la quasi identité (moins de 5 SNPs d'écart) entre deux souches de SAMS PVL positives provenant de deux enfants présentant une pneumonie communautaire sévère et ayant fréquenté le même service d'urgence à 12h d'intervalle.
- la détection croissante de souches de staphylocoques résistantes au linézolide, notoirement mais non exclusivement chez les staphylocoques *non-aureus*
- l'alerte en réacto-vigilance sur le système d'antibiogramme Vitek sur la mauvaise détection de la résistance à la méticilline de certaines souches par ailleurs non-multi-résistantes, sans qu'il s'agisse de clones particuliers. L'alerte de réactovigilance a conduit à la mise en place de mesures correctives ont été mises en place à l'échelle nationale sur recommandations conjointes du CNR et de bioMérieux

- 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'animation d'un groupe spécifique Staphylocoques au sein de *l'European Society for Microbiology and Infectious Diseases* (*European Study Group on Staphylococci & Staphylococcal Infections*) dont le *vice chair* est F. Vandenesch (https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/staphylococci/). Le CNR de Lyon a organisé en 2017 dans le cadre de ce groupe un contrôle de qualité à destination des CNR Européens.
- La communication au grand public sur le choc toxique staphylococcique. Dans un contexte médiatique sensible laissant parfois place à des communications alarmistes, une mise au point a été réalisée par le Centre National de Référence (CNR) des Staphylocoques et Santé publique France concernant l'épidémiologie des CTS et leur prévention.

- enfin, le CNR participant d'une **recherche intégrée** « *bed to bench & bench to bed* » associée à notre unité 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 2017 are the following:

- **regarding expertise**, the NRC received as in the past year an impressive number of strains and DNA for characterization (2490), conversely, 442 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 and affirmation of transmission based on NGS approaches that allowed definite conclusion contrasting with the use of previous methods that imposed more cautious conclusions. For instance, an endemic strain of the Geraldine clone was demonstrated in a newborn ICU as assessed by a maximum number of 18 SNPs between all strains isolated in this unit in a 3-year period of time. Or, the affirmation of transmission within an emergency ward of a PVL-Positive MSSA between two children admitted at a 12h interval assessed by less than 5 SNPs between the two isolates
- the continuous increase detection of linezolide-resistant staphylococci, notably but non-exclusively in *non-aureus* staphylococci
- the alert in react-vigilance for the Vitek AST system that did not properly detect certain strains of non-multi-resistant MRSA of various lineages. Alert of the health authorities lead to the implementation of corrective measures by the manufacturer with the advices of the NRC

- 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:

- activities in the *European Study Group on Staphylococci & Staphylococcal Infections* within the *European Society for Microbiology and Infectious Diseases,* funded by F. Vandenesch who is presently vice-chair of this group (https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/staphylococci/). The French NRC organized in 2017 an external quality control for the other European NRCs.
- The communication to the general audience on toxic shock syndrome. In a highly sensitive mediatized context that included some alarmist communication, a position tribune on the current knowledge of the epidemiology of menstrual TSS has been co-written by the NRC and Santé Publique France and publicly released.

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 PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle-Ranc PA-IAI	E-mail : anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr

3. Secteur sérologie

Frédéric Laurent – directeur adjoint PH - IAI PU - Faculté de Pharmacie de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux@chu-lyon.fr

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

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

Cadre Aline Billoud	
Techniciennes Nadia Boulegroun Caroline Bouveyron Christine Gardon Emelyne Jeanne Charline Vuillot	
Secrétaire Yamina Lakehal / Laurence Morales	

Le CNR a emménagé dans ses nouveaux locaux à l'IAI le 30 janvier 2017.
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).
Les dossiers d'ajout pour les puces à ADN, les PCR (*mec*A/B/C, *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 que pour 2019. L'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici 2020.

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 2018 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.
Le CNR des staphylocoques a emménagé dans de nouveaux locaux rejoignant ainsi l'Institut des Agents Infectieux (IAI) basé sur le site de l'hôpital de la Croix-Rousse, en janvier 2017.

Éléments clés en termes de production d'expertise :
- 2490 souches reçues
- 94 départements 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 quantitative haut débit ciblant une centaine de facteurs de virulence et de régulateurs globaux en vue de déterminer l'expression de ces facteurs dans les souches cliniques. L'objectif est d'identifier des pathovars chez *S. aureus* sur la base des profils d'expression protéique corrélés aux données cliniques, en particulier les marqueurs de sévérité. A terme cette approche permettra de sélectionner de nouveaux biomarqueurs et de développer éventuellement des tests rapides d'identification des pathovars.

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 remplaçant les méthodes actuellement utilisées (Vitek2®, diffusion et e-tests®) par la détermination des concentrations

minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide. Avec cette perspective, le CNR a évalué le système Sensititre® (Thermo Scientific™) selon une configuration regroupant des 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
  - 50 Staphylocoques non *aureus*,
  - 50 *Staphylococcus aureus* (dont 25 SASM et 25 SARM)
- Phase 2 : évaluation de la reproductibilité
  - 5 Staphylocoques non *aureus*
  - 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 2018.

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Evaluation d'un système d'identification et d'antibiogramme rapide directement sur prélèvements - *Accelerate* PhenoTest™ (*Accelerate* Diagnostics)

L'automate Accelerate est un instrument permettant l'identification bactérienne et la réalisation d'un antibiogramme par mesure de la CMI vraie, directement à partir du bouillon d'un flacon d'hémoculture détecté comme positif. L'originalité du système tient à l'utilisation de techniques de cytométrie d'image et d'hybridation in situ pour l'identification microbienne et d'une technique de cytométrie d'image dynamique pour l'antibiogramme-CMI. Cette approche permet un rendu de l'identification en quelques heures et celui de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques en moins de 6 heures. Outre le bénéfice médical direct pour le patient lié à un ajustement thérapeutique plus rapide, cette technologie devrait concourir à une meilleure rationalisation de l'utilisation des antibiotiques.

Le CNR a évalué les performances de cet automate sur des hémocultures artificielles avec sang frais surchargés avec un inoculum faible après incubation dans l'automate Virtuo (biomérieux) en utilisant un panel de 80 souches présentant des résistances homogènes ou hétérogènes à la méticilline, au linézolide, aux glycopeptides ou à la daptomycine. Les résultats préliminaires sur une partie de la collection ont conduit à interrompre d'un commun accord l'étude dans l'attente de modifications du dispositif.

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 2017, nous avons notamment transmis à plusieurs laboratoires les protocoles PCR et les souches contrôles permettant l'identification des souches de SARM portant le gène *mec*C et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leucocidine de Panton 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 DNAthèque de la totalité des souches reçues au laboratoire depuis 2005. En 2017, le CNR a reçu **2490 souches** pour expertise (virulence et résistance) **hors** protocoles (Cf paragraphe 2.5) et **327** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France (y compris Lyon) et à l'étranger (198 dont Brésil : 71, Suisse : 5, Afghanistan : 108, USA : 14).

En 2017, nous avons envoyé 442 souches ou ADN à nos correspondants en France (y compris Lyon) (347) et à l'étranger (95 dont Allemagne : 7, Australie : 20, Suisse : 20, UK : 10, USA : 38)

Cf Annexe 1.

2.5. Activités d'expertise

Entre 2006 et 2017, le CNR a reçu **25942** 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.)

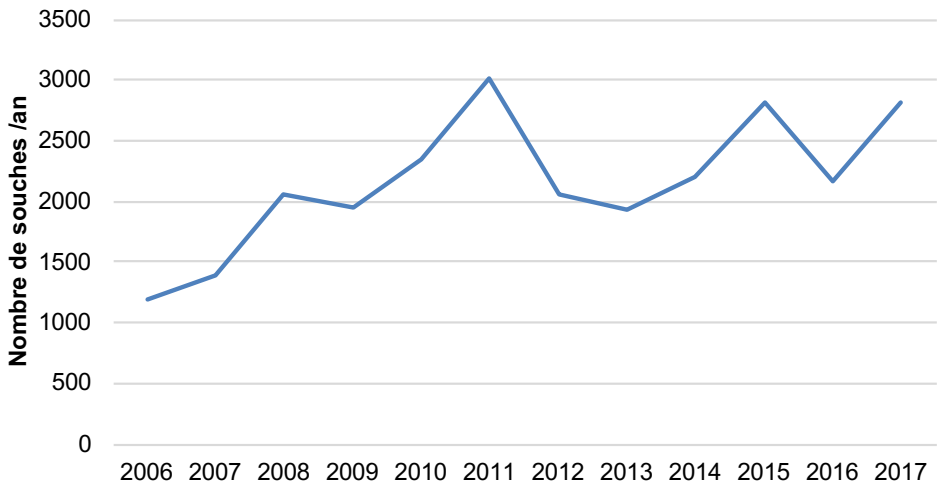


Figure 1- Évolution du **nombre de souches reçue**s au CNR entre 2006 et 2017**.**

En 2017, le CNR a reçu **2490 souches** pour expertise (virulence et résistance) **hors** protocoles.

Ces souches provenaient de **94 départements** ou des DROM COM. Plus de 65 % des souches provenaient de 4 régions principales : 41 % (Auvergne- Rhône-Alpes), 12 % (Ile de France), 8 % (Hauts de France), 8 % (Provence-Alpes-Côte d'Azur), 4 % venaient des DROM COM), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions.

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 Panton Valentine est réalisée dans un délai de 72H maximum à réception de la souche.

En 2017, nous avons reçu **327** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France (y compris Lyon) et à l'étranger (198 dont Brésil : 71, Suisse : 5, Afghanistan : 108, USA : 14)

2.6. Activités de séquençage

Au cours de l'année de 2017, 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 2 séquenceurs Illumina NextSeq et un séquenceur Illumina Miseq. Pendant l'année de 2017 une migration du séquençage NextSeq 2x150 bp vers le séquençage Miseq 2x300 bp a été mise en place en raison d'un accès plus fréquent (2 *runs* par mois) et à la possibilité d'obtention de *reads* plus longs (300 bp *vs.* 150 bp), plus adaptés au séquençage de génomes bactériens complets.
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 ?*
  - *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 ?*
  - *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 ?*
  - *Si OUI, pour quelles activités :*
    - *Investigations d'épidémies : OUI*
    - *Surveillance : OUI*

- *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 v0.36[1], Kraken v0.10.5-beta[2] 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 SRST2[3] 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-mem[4], samtools et bcftools[5], IGV[6]-[7]
- Détermination *in silico* du profil des puces ADN de *Staphylococcus aureus*, tel qu'ils sont définis par Alere[8], en particulier les profils d'entérotoxines et la PVL en utilisant le logiciel SRST2 et une base de données des séquences nucléotidiques des gènes utilisés dans les puces d'ADN ;
- Détermination des profils de résistance en utilisant SRST2 et les bases de données de ARG-Annot v3[9] et ResFinder v3[10]
- Analyses de génomique comparative en utilisant un workflow d'assemblage : Kmergenie v1.7044, SPAdes v3.10.1[11] et Quast v4.5[12] , suivi des alignements multiples de génomes[13]
- 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 2017, 86 souches ont été séquencées dans le cas d'investigation d'épidémies ou de cas groupés. Dans un exemple particulièrement frappant, le NGS a permis d'affirmer la transmission au niveau du service des urgences d'un hôpital de la région Parisienne d'une souche de *S. aureus* PVL+ entre deux enfants hospitalisés successivement dans le même service pour pneumopathie sévère.

---

[1] Bolger A *et al.* (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, 30(15), 2114-2120.
[2] Wood DE and Salzberg SL. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biology, 15:R46.
[3] Inouye, M *et al*. (2014). SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. Genome Medicine, 6(11), 90.
[4] Li H and Durbin R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics, 26(5), 589-595.
[5] 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.
[6] James TR *et al.* (2011). Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 29, 24–26.
[7] Helga T *et al*. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in Bioinformatics 14, 178-192.
[8] 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.
[9] Gupta SK *et al.* (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 58(1), 212.
[10]Zankari E *et al*. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012; 67, 2640–2644.
[11] 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.
[12] Alexey G *et al.* (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, Bioinformatics, 29 (8), 1072-1075.
[13] 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 **à des fins de surveillance** :*
  - *Nombre de séquences réalisées dans l'année :* 108, comprenant *S. aureus* et *S. epidermidis*
  - *Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées,*
    Le CNR a pour objectif à terme de retenir le NGS comme outil unique de typage et de détermination des gènes de résistance et de virulence. Cependant, cette transition ne peut être immédiate pour des raisons de coût, d'accessibilité aux séquenceurs, de capacité de traitement des données et de délai de rendu. En 2017, 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. Ainsi, pour le complexe clonal CC152, clone de SASM PVL+ le plus prévalent en France depuis quelques années, l'échantillonnage était basé sur un critère de temporalité, c.a.d, en échantillonnant des souches de différentes années depuis la première détection de ce clone au CNR. Pour les souches SARM du CC398, des souches avec des profils de SCC*mec* différents et d'origine animale et humaine ont étés choisies pour comparer la circulation des souches LA-MRSA en France. Pour le SARM ST59, le choix des souches était basé sur la présence de différents types de SCC*mec*. Pour les souches de *S. epidermidis* cfr+, toutes les souches ont été sélectionnées en raison à leur profil rare (*cfr*+) de résistance au linézolide associé à la présence du gène plasmidique *cfr*.

- *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 métadata 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 clefs en termes de surveillance :
- Maintien d'un haut niveau de notification des chocs toxiques staphylococciques
- Notification croissante des souches d'infections suppuratives avec un fort taux de PVL (>50%) et un faible taux de SARM (<30%)
- Poursuite de l'émergence des CC152 MSSA PVL
- Augmentation du nombre de souches de staphylocoques résistantes au linézolide
- Structuration en cours d'un réseau de surveillance conjointement 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 2017 notamment pour l'expertise résistance.

En 2017, le CNR a reçu **2490 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 **94 départements** ou des DROM COM. Plus de 65 % des souches provenaient de 4 régions principales : 41 % (Auvergne- Rhône-Alpes), 12 % (Ile de France), 8 % (Hauts de France), 8 % (Provence-Alpes-Côte d'Azur), 4 % venaient des DROM COM), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (Figure 2).

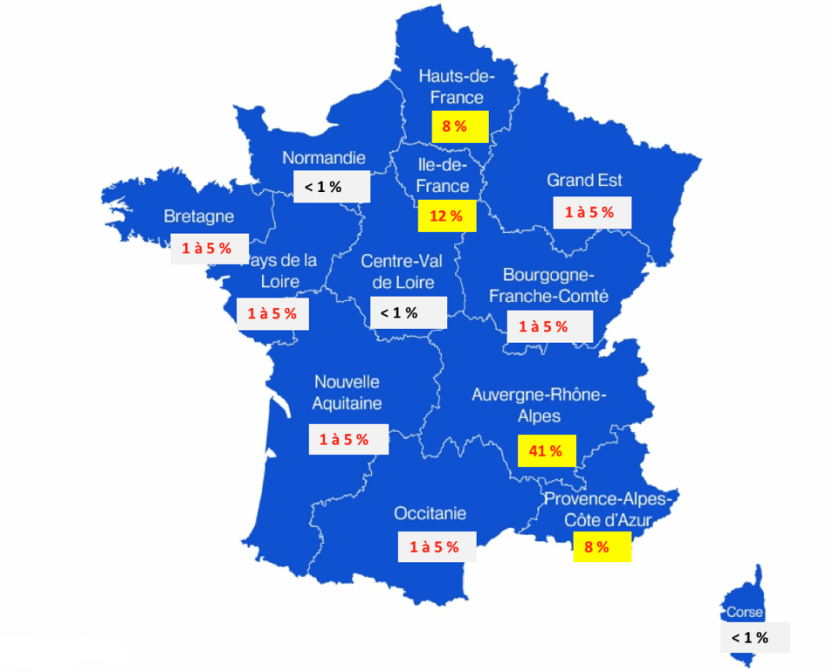


Figure 2- Répartition géographique des souches reçues en 2017 **pour expertise** (identification, recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques)

Nous avons reçu **327** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France (y compris Lyon) et à l'étranger (198 dont Brésil : 71, Suisse : 5, Afghanistan : 108, USA : 14)

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 **567** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et **47** souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

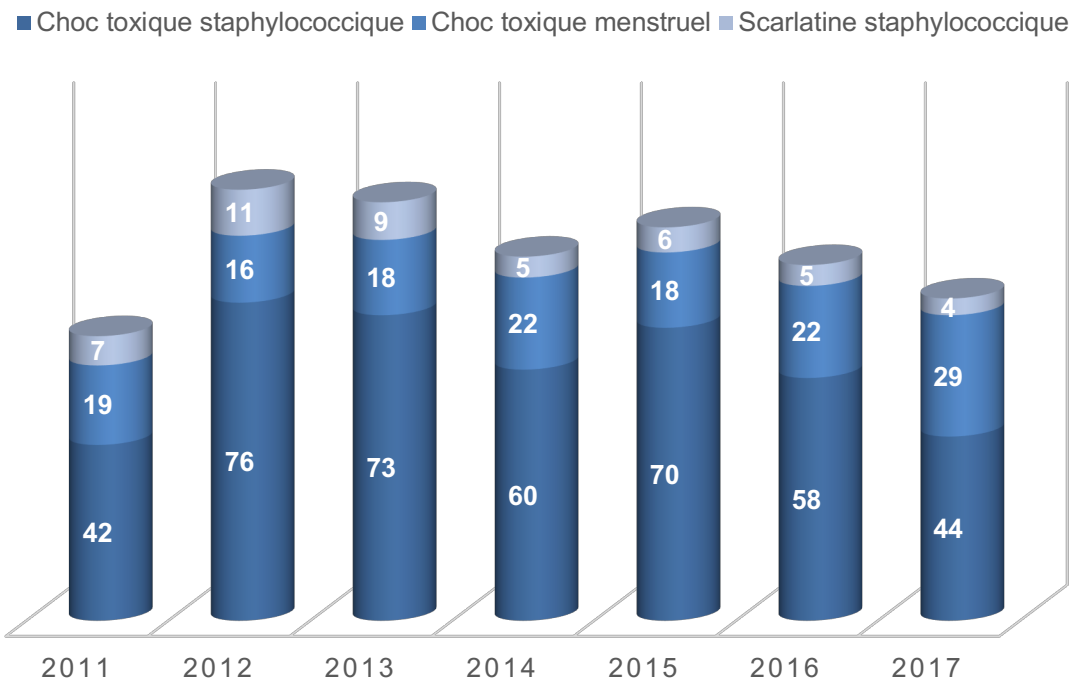


Figure 3- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour **choc toxique staphylococcique et formes mineures** entre 2011 et 2017.

En 2017, **73** cas de CTS ont été rapportés, dont **29 cas de CTS menstruels** ; ces chiffres, restent stables par rapport aux années précédentes.

Concernant les cas de chocs menstruels, l'âge des patientes s'étend de 14 à 45 ans avec une médiane de **21.7 ans**. Quand l'information est disponible, le pronostic a toujours été favorable. 89% des souches analysées possèdent le gène codant la toxine du choc toxique staphylococcique. Vingt-deux souches appartiennent au complexe clonal **CC30-MSSA** correspondant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté, deux au complexe clonal CC22-MSSA, et une au complexe clonal CC101-MSSA. Seule une souche analysée était un SARM appartenant au complexe clonal CC5-MRSA-VI (clone *New Paediatric*) qui est un clone nosocomial dont la prévalence croît en France.

Dans la continuité de la séquence médiatique des derniers mois associée à une inquiétude vis-à-vis d'une recrudescence ressentie des CTS d'origine menstruelle, maladie attribuée à l'utilisation de tampons périodiques à fort pouvoir absorbant chez des femmes préalablement colonisées au niveau vaginal par une souche de *S. aureus* productrice de toxine superantigénique, le CNR a œuvré pour rappeler les données épidémiologiques à sa disposition, les éléments de prévention, ainsi que pour éviter une communication alarmiste.

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 2017 (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.

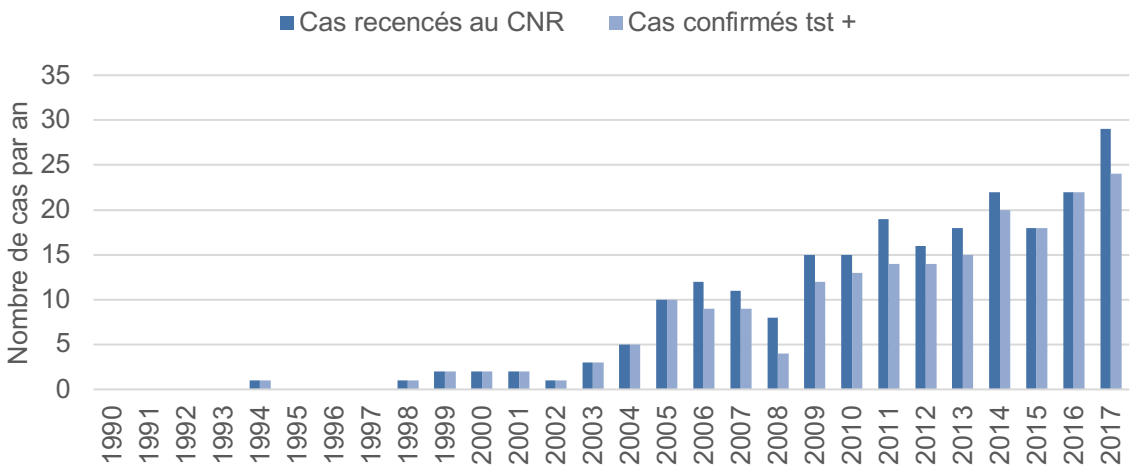


Figure 4- Évolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour **choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle** entre 1990 et 2017. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tst*.

Concernant les chocs non menstruels (**39 cas)**, les chocs sont survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. L'âge des patients s'étend de 0 à 87 ans avec une médiane d'âge de 53,2 ans tandis que le *sexe ratio* ♂/♀ de ces patients est de 2,1. Il n'y a que sept souches de SARM avec quatre clones Lyon (SARM nosocomial diffusant en France), un clone Géraldine (clone communautaire associé à des infections nosocomiales) et deux CC8-MRSA IV et V. Quatorze souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, quatorze autres souches négatives pour le gène codant la TSST-1 possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC), dix souches ne possédaient aucun superantigène majeur, une souche possédait les gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine.

En 2017, **quatre cas de scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 1 à 90 ans avec une médiane d'âge de 28,7 ans tandis que le *sexe ratio* ♂/♀ est de 1/3. Ces manifestations sont survenues principalement au décours d'infections cutanées communautaires. Chacune des souches possède au moins un gène codant un superantigène (TSST-1, SEA, SEB, SEC). Parmi ces souches on compte deux CC8-MRSA-IV et deux CC8-MSSA.

3.2.2. Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé au total 359 souches isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **139 cas de maladie exfoliante généralisée** (*staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) **ou de *mild* SSSS** et **220 cas d'impétigo bulleux** (Figure 5)

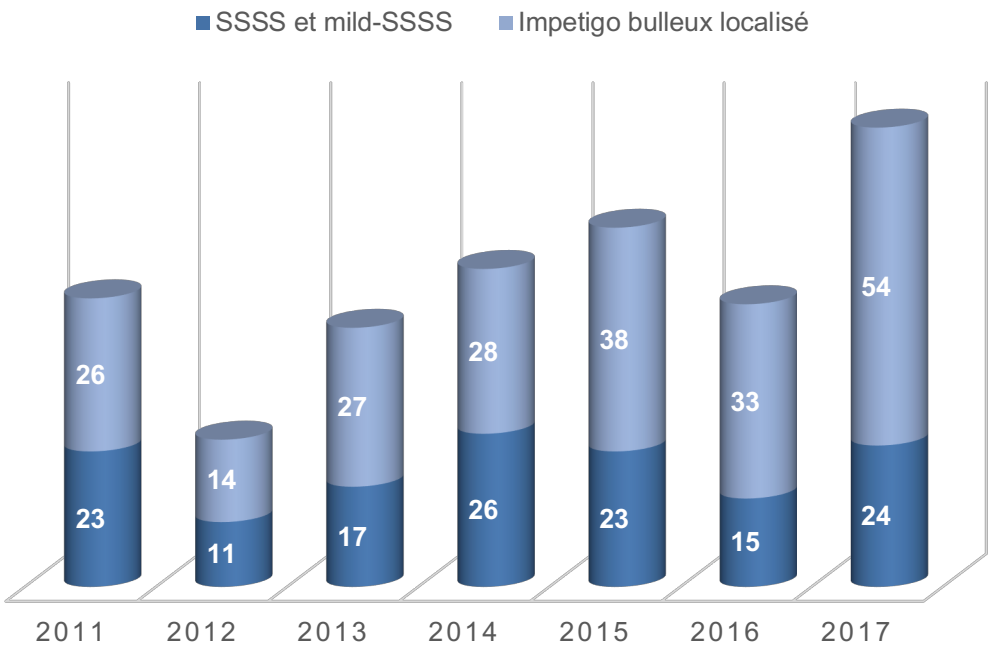


Figure 5- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour **syndrome d'exfoliation staphylococcique** entre 2011 et 2017.

En 2017, le CNR a analysé **78 souches** de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont **24 cas de maladie exfoliante généralisée** et **54 cas d'impétigo bulleux**. On constate donc une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR dans le cadre d'impétigo bulleux par rapport à l'année précédente.

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 2017, nous n'avons pas observé de cas de cette forme mineure de maladie exfoliante généralisée. La surveillance se poursuit.

En 2017, pour les 24 cas de patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique classique,** l'âge s'étend de zéro à 94 ans avec une médiane à 3,5 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de **2,4**. Huit souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), trois souches l'ETA seule et deux souches l'ETB seule. Cinq cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes (âgés de 32 à 94 ans) mais pour lesquels nous n'avons pas pu obtenir d'information clinique concernant une éventuelle insuffisance rénale chronique. Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

Par comparaison, en 2017, l'âge des 54 patients ayant présenté un **impétigo bulleux** s'étend de zéro à 91 ans avec une médiane de 13,2 ans tandis que le *sexe ratio* ♂/♀ de ces patients est de **0,75**. Onze souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, neuf souches l'ETA seule et deux souches l'ETB seule. Là encore, aucune souche n'était résistante à la méticilline.

3.2.3. Infections suppuratives à *S. aureus* PVL+

Le CNR reçoit un nombre croissant 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 un nombre croissant de souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 6).

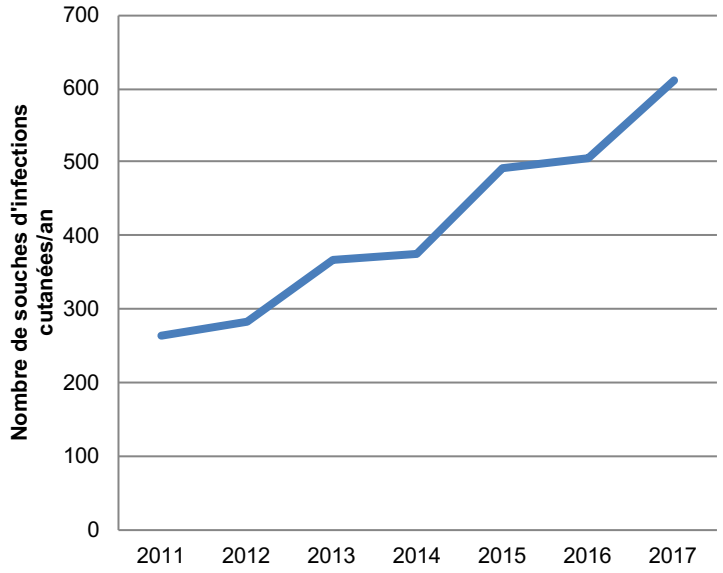


Figure 6. Évolution du nombre de souches reçues dans le cadre **d'infections suppuratives** (hors épidémies).

Ainsi pour la seule année 2017, nous avons expertisé **610 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, érysipèle…) **hors épidémies**. La proportion de souches PVL+ est de 55% au total mais de **92.3%** lorsque l'on ne considère que **les infections primitives** (Figure 7).

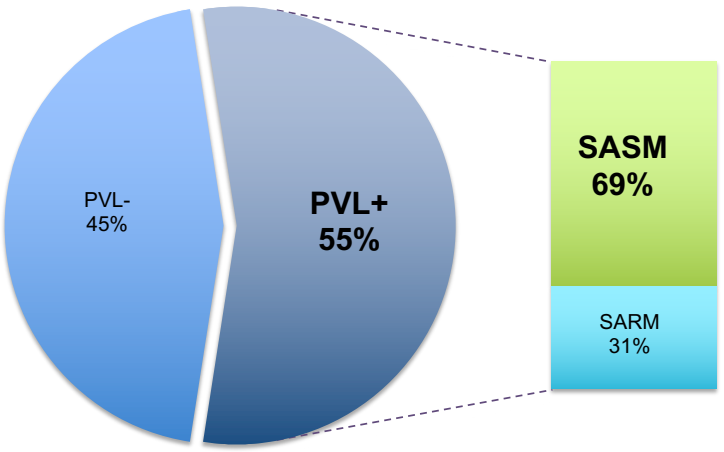
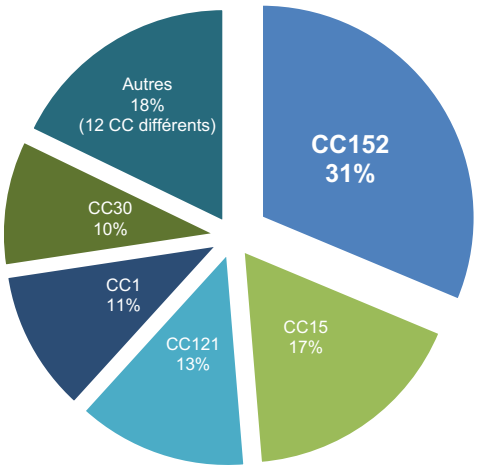


Figure 7- Caractéristiques des souches responsables d'**infections suppuratives** en 2017 (n=610).

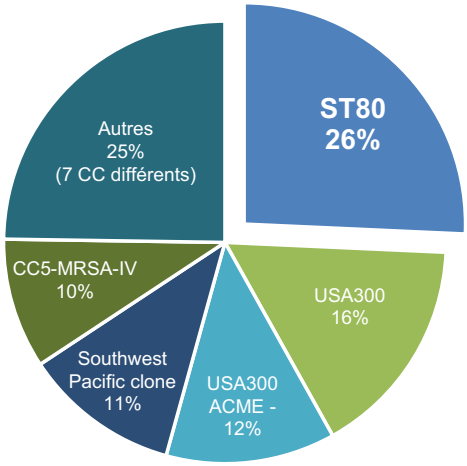
Parmi les souches PVL+ :

(i) **69 %** sont des **SASM** (Figure 7). Comme classiquement décrit, on note une plus grande diversité de 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 2017, il est en première position et représente 31% des souches de SASM PVL+ responsables d'infections suppuratives toujours en augmentation par rapport à 2016 où il représentait 29% de ces souches.

(ii) **31 %** 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** (*agr*3, PVL+, *mec*A+) reste le principal clone identifié. On note cependant une diminution du nombre de souches de ce clone reçues avec 26% en 2017 contre 36% en 2016 car les envois ne sont désormais moins systématiques. Nous observons des cas d'infections avec le clone d'origine Nord-américaine et à diffusion mondiale : le clone **USA300** (*agr*1, PVL+, *mec*A+) mais sa prévalence est restée stable au cours des 5 dernières années (Figure 8b).



a. Caractéristiques des clones de SASM PVL responsables **d'infections suppuratives** en 2017



b. Caractéristiques des clones de SARM PVL responsables **d'infections suppuratives** en 2017

Figure 8- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ responsables **d'infections suppuratives** en 2017

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 visant à établir la prévalence des SARM et notamment celle des clones communautaires dans les infections cutanées sévères des patients admis dans les services d'urgence[14].

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.

3.2.4. Furonculoses familiales

En 2017, **71 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 2017.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu **52 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

Le PHRC pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* a terminé ses inclusions en janvier 2017. Le total de patients inclus pour lesquels un CRF est disponible s'élève à 164 provenant de 147 centres dont une moitié de PVL+. Bien que les analyses statistiques n'en soient qu'à leurs débuts (le nettoyage et le verrouillage de la base a été finalisé en novembre 2017), le critère d'évaluation principal (la mortalité) est en faveur de l'hypothèse de travail : la PVL apparaît comme un facteur de sévérité dont l'importance dépend de l'âge. Chez l'enfant, la PVL étant prédominante (26 PVL+ sur les 28 enfants ≤18ans analysés, 60 PVL+ sur 136 adultes analysables), l'effet PVL sera difficilement mesurable chez l'enfant et l'exploitation des données chez les sujets ≤ 18 ans nécessitera une analyse séparée de la base. En revanche chez l'adulte la mortalité est de 45% chez les pneumonies PVL-positives *vs* 26,3% chez les pneumonies PVL-négative ($p<0,05$). Les autres facteurs significativement associés à la PVL et à la sévérité sont la valeur des lactates et la PCT. Tout cela sera bien entendu développé et affiné dans les analyses statistiques qui sont en cours. Les autres critères d'évaluation (impact du traitement anti-toxinique sur la survie, proportion de SARM dans les pneumopathies communautaires sévères à SARM) seront fournis par l'analyse complète de la base qui démarre actuellement. En revanche, le critère

[14] Bouchiat C *et al.* I. (2017). MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(2), 372–375.

de susceptibilité génétique à l'infection sera traité indépendamment, l'étude actuelle ayant permis le recueil de matériel génétique pour 98 patients et leur famille.

Nous avons observé un **parallélisme entre les pics de l'épidémie grippale** et une augmentation de l'incidence des pneumonies communautaires à *S. aureus*, suggérant l'existence d'une relation entre l'infection virale et cette pneumonie. Cette tendance s'est confirmée sur la période grippale 2016-2017. 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. Une validation sur un plus grand nombre de sujets et sur d'autres saisons grippales est pourtant nécessaire (Figure 9).

Seuls les cas inclus dans le PHRC étaient comptabilisés pendant ces 6 dernières années. Suite à la clôture du protocole, tous les cas de pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* dont la souche a été envoyée au CNR sont comptabilisés, permettant d'expliquer le nombre plus important de souches sur l'année 2017 par rapport aux autres années.

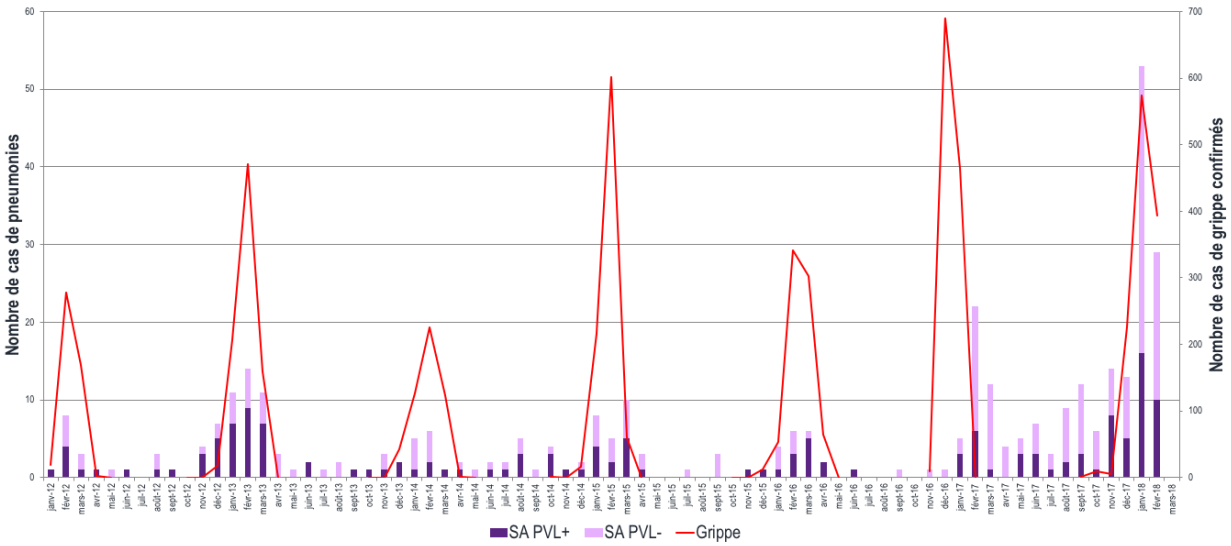


Figure 9- Nombre de cas de pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* au cours des épidémies grippales 2012-2017.

Concernant les souches reçues en 2017, la proportion de SARM est plus importante chez les souches productrices de PVL que chez les souches ne la produisant pas (23% pour PVL+ *vs* 11% PVL-) (Figure 10).

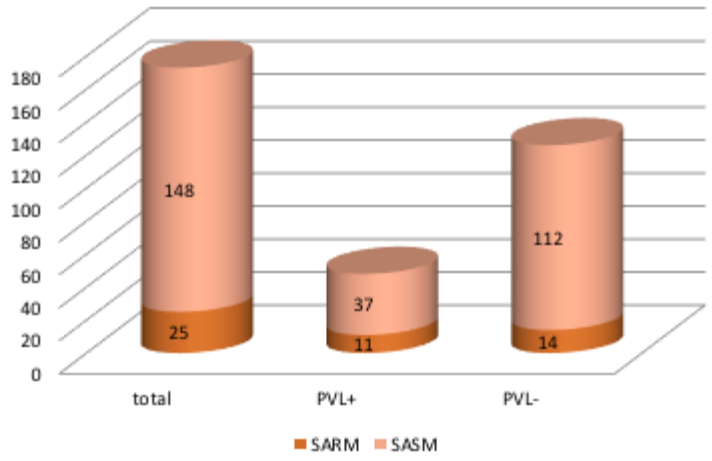


Figure 10- Proportion de SARM et de SASM dans les cas de **pneumonies** à *S. aureus*, productrices ou non de PVL, parmi les souches reçues au CNR en 2017.

Concernant les clones de *S. aureus* impliqués dans les pathologies PVL+, le clone 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).

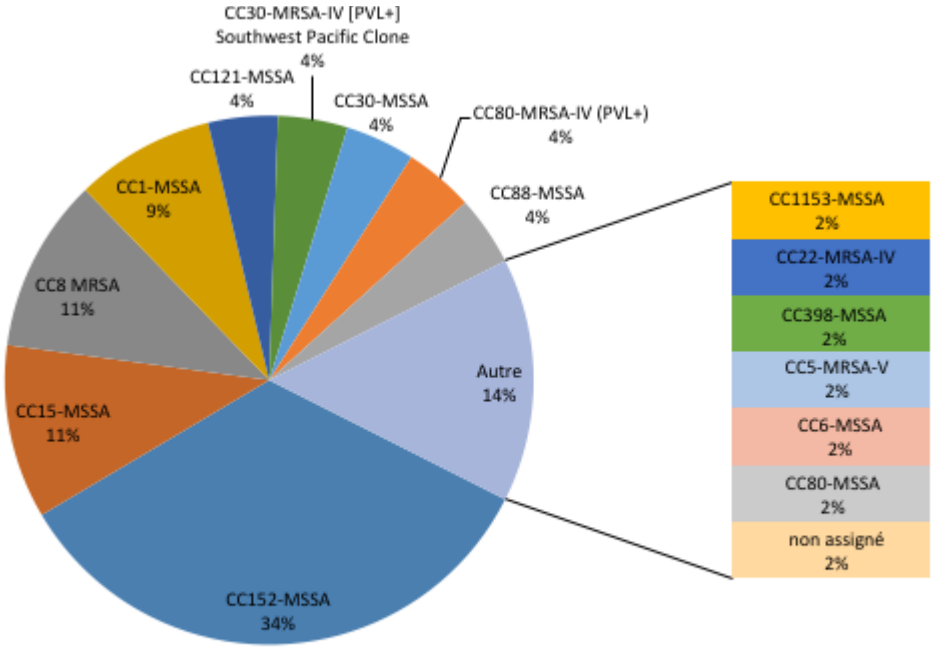


Figure 11- Clone de *S. aureus* PVL+ (SASM et SARM) identifiés pour les souches reçues au CNR en 2017 pour des **pneumonies sévères** à *S. aureus*.

Concernant les clones de *S. aureus* PVL- (SARM et SASM 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 CC30 qui sont fréquemment retrouvés (Figure 12).

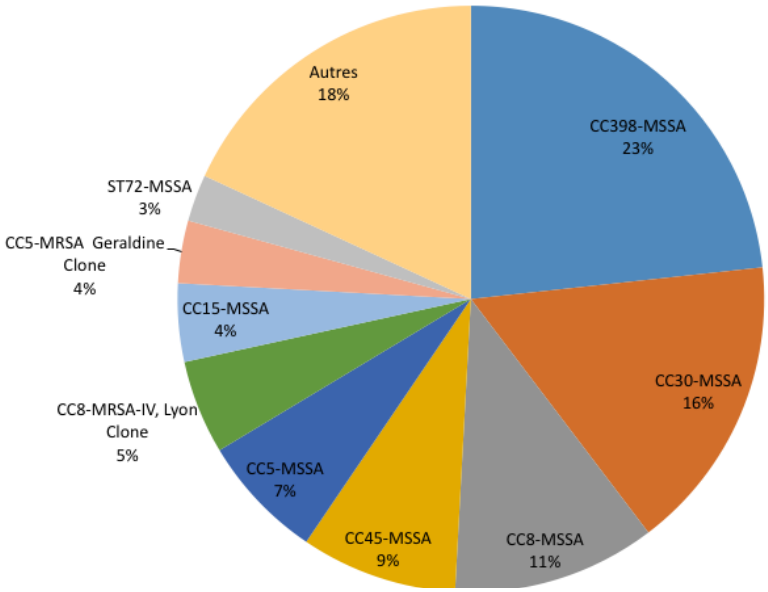


Figure 12- Clone de *S. aureus* PVL- (SASM et SARM) identifiés pour les souches reçues au CNR en 2017 pour des **pneumonies sévères** à *S. aureus*.

A noter cette année, deux cas de transmission intrafamiliale de pneumonies nécrosantes dues à des souches PVL+ chez des patients ayant contracté la grippe et une transmission inter-patient au sein d'un service d'urgences pédiatriques probablement en lien avec du matériel de soins. Dans ce deuxième épisode, la transmission a pu être affirmée grâce au séquençage NGS des deux souches incriminées, révélant moins de 5 SNPs de différence entre les deux souches incriminées.

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 2016, 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 **423 souches d'infections ostéo-articulaires** (dont 85 en 2016 et 102 en 2017, exclus les « pieds diabétiques » sans ostéite) (Figure 13).

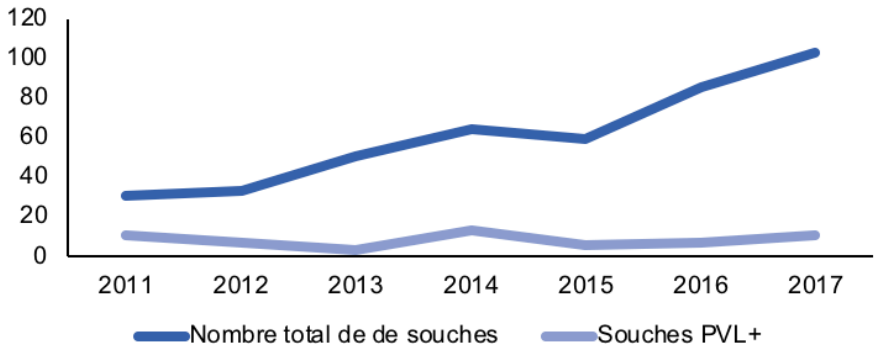


Figure 13- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour **infections ostéo-articulaires entre** 2011 et 2017.

En 2017, nous avons reçu pour expertise **102 souches** de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire, les patients étant âgés de 2 semaines à 100 ans (médiane d'âge 58,3 ans) avec un *sexe ratio* ♂/♀de 3,6. Vingt-six souches sont des SARM (Figure 14).

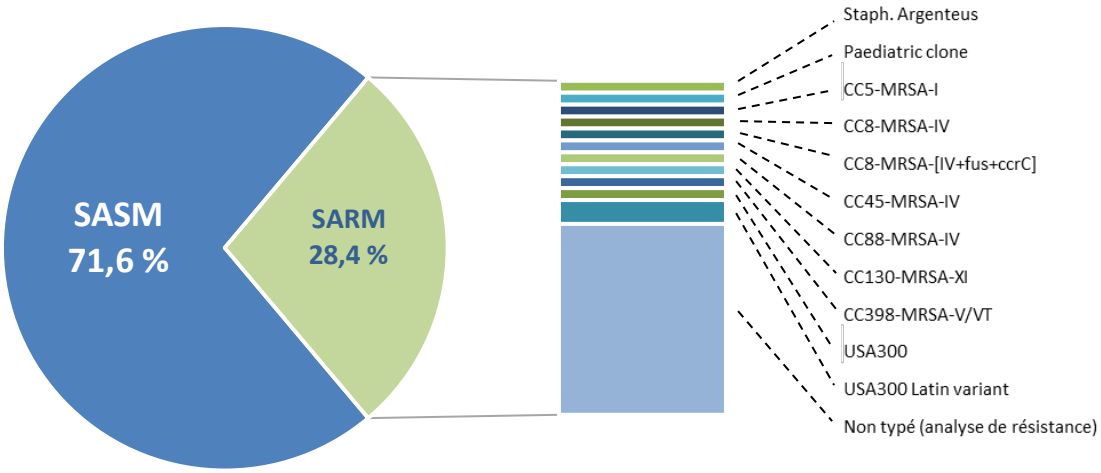


Figure 14- Caractéristiques des souches responsables **d'infections ostéoarticulaires** en 2017 (n=102).

Les tableaux cliniques sont très divers : ostéomyélites aigües de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèse,… Onze infections étaient dues à des souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine (sept SASM dont trois **CC152-MSSA** et quatre SARM avec un USA300, deux USA300 « Latin variant » et un CC88-MRSA-IV).

3.2.8. Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année **2017**, **46 demandes** de sérologies anti-PVL (leucocidine de Panton-Valentine) et anti-TSST-1 (toxine du choc staphylococcique) ont été adressées au CNR contre 77 en 2016. Cette diminution est à associer en partie à la fin du PHRC Pneumonies Nécrosantes, 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 cadre du PHRC, à déterminer le rôle d'une immunité préexistante comme facteur de protection contre les infections sévères liées à la PVL). En 2017, ces 46 demandes émanaient de 21 prescripteurs différents (principalement hospitaliers).

Sept demandes, en provenance de 4 hôpitaux différents, concernaient une **sérologie PVL,** 6 dans le cadre de pneumonies d'allure nécrosante (pour 4 patients différents) et une dans un contexte d'abcès récidivants. Le taux de positivité (>4900 UA/mL) était de 43% (n=3/7).
Concernant les patients présentant un tableau pulmonaire (n=4), une patiente a présenté une séroconversion après un épisode de pneumopathie nécrosante post-grippale et les 3 autres patients présentaient une sérologie inférieure au seuil de positivité. Cependant, pour 2 d'entre eux, 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.
Pour la patiente présentant des abcès nécrosants à répétition, le sérum reçu avait été prélevé plusieurs mois après le début des symptômes et présentait un taux d'anticorps positif (12900 UA /mL). Ce taux était donc compatible avec une infection invasive à *S. aureus* PVL-positif même si nous ne pouvons pas éliminer une cicatrice sérologique (infection ancienne).

Quarante **sérologies TSST-1** ont été effectuées pour 19 prescripteurs différents. Elles concernaient 28 patients (dont 23 femmes) et étaient négatives dans 80% des cas (n=32). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) dans 27 cas (67,5%), de choc toxique non menstruel (NMTSS) dans 11 cas (27,5%), de suspicion de syndrome de Kawasaki dans un cas et de glomérulonéphrite aigüe dans le dernier cas.
Les sérums en contexte de **MTSS** (reçus pour 18 patientes) étaient séronégatifs pour TSST-1 dans 24 cas sur 27 et très faiblement positifs dans 1 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 93% des cas au total. Les 2 sérums positifs concernaient *(i)* une patiente ayant séroconverti à la suite du choc (1er sérum négatif, 2ème sérum positif à 900 UA /mL 2 mois après), et *(ii)* une patiente ayant reçu des immunoglobulines polyclonales en traitement du choc (Tégéline®) entrainant une sérologie faussement positive (1064 UA/mL). Douze patientes ayant développé un choc toxique menstruel avant ou pendant l'année 2017 ont bénéficié de prélèvements itératifs tardifs (> 3 semaines après l'épisode de choc) pour recherche de séroconversion ; aucune augmentation d'anticorps n'a été observée chez 10 d'entre elles (83%), 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, ces résultats montrent que certaines patientes peuvent développer des anticorps à long terme même si le taux d'anticorps est resté faible (315 et 900 UA/mL pour les 2 patientes positives) et nous ne savons pas si ces anticorps sont protecteurs.
Les sérums en contexte de **NMTSS** (choc non menstruel) étaient séronégatifs dans 8 cas sur 11 (73%). Ils correspondaient à 8 patients (dont seulement 4 avaient une documentation bactériologique à *S. aureus* TSST-positif). Trois patients seulement ont bénéficié de prélèvements itératifs : 2 patients sont restés séronégatifs, tandis que le troisième a présenté une très faible augmentation du titre d'anticorps à la suite de l'épisode de choc toxique (de 0 à 185 UA/mL après 2 mois).
Les 2 sérologies prélevées dans un contexte de syndrome de Kawasaki et de glomérulonéphrite aigue avaient été prélevées précocement après le début des symptômes et étaient faiblement positives (390 et 1600 UA/mL). Ces valeurs sont proches du taux d'anticorps retrouvé dans la population générale. En absence de souche de *S. aureus* isolée et de sérum tardif pour objectiver une séroconversion, ces sérologies ne sont pas contributives pour le diagnostic d'une toxémie à TSST-1.
L'ensemble des demandes de sérologie TSST-1 émanait de **19 prescripteurs différents**, 18 prescripteurs français, répartis sur tout le territoire national (principalement des CHU), et un hôpital de Belgique. Ce nombre de prescripteurs a légèrement diminué par rapport aux années précédentes, probablement en lien avec l'arrêt du PHRC Pneumonies Nécrosantes. 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, **408 souches** ont été adressées au CNR en 2017 pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques, en provenance de 148 laboratoires et/ou prescripteurs différents. Ceci représente une **augmentation de 17,6% par rapport à l'année 2016** (347 souches) (Figure 15). 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,

- la mise sur le marché récente de nouvelles molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole ou le tédizolide pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des moyens pour 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. Ce dernier point représente la grande majorité de l'augmentation des demandes.

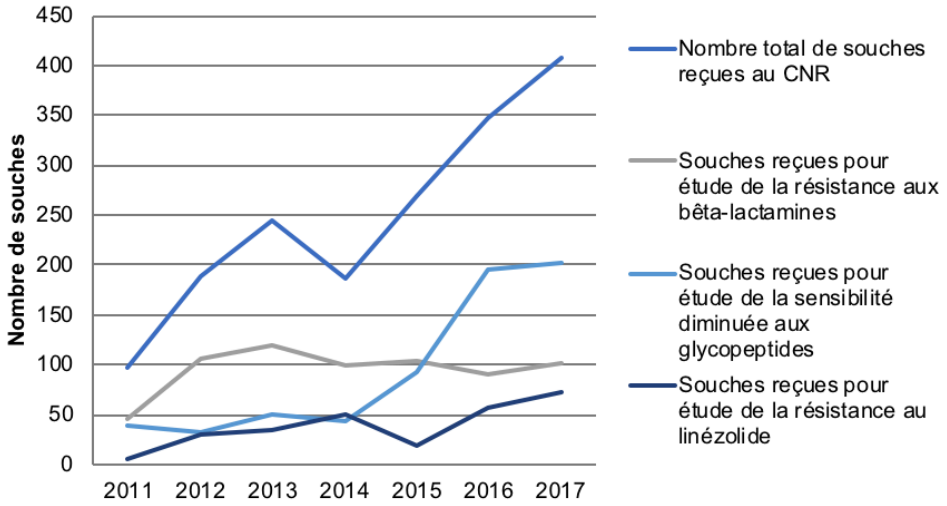


Figure 15- Souches reçues au CNR pour **expertise de la résistance aux antibiotiques** entre 2011 et 2017.

En 2017, les souches expertisées au CNR pour la résistance comprenaient 386 demandes extérieures et 22 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon. Au sein de ces 408 demandes, 50% (n=202) concernaient la seule résistance aux glycopeptides. 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 2017.

Espèce	**Nombre de souches reçues (%)**
S. aureus	199 (48,8)
S. capitis	15 (3,7)
S. epidermidis	141 (34,6)
S. haemolyticus	21 (5,1)
S. hominis	4 (1,0)
S. lugdunensis	9 (2,2)
S. pettenkoferi	4 (1)
S. saprophyticus	12 (2,9)
S. simulans	1 (0,2)
S. warneri	1 (0,2)
S. xylosus	1 (0,2)
Total	**408**

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 (85 souches pour l'année 2017).

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 2017 (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 *mec*A et *mec*C 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 2017**, 101 souches** ont été étudiées dans ce contexte : 91 souches pour une demande de confirmation de sensibilité/résistance à la méticilline 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).

Résistance à la méticilline
Les 91 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient **56 souches de *S. aureus*** et 35 **souches de staphylocoques à coagulase négative** (SCN).

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

	S. aureus	**SCN**
Souche *mec*A+	21	14
Souche *mec*C+	9	0
Souche *mec* négatif mais résistante à la méticilline	2	0
Souche sensible à la méticilline	24	21
Total	**56**	**35**

Concernant les souches de *S. aureus*, il s'agissait de :
- **39 souches** de *S. aureus* pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence ou absence de gène de type *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 intermédiaire ou 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). Sur ces 39 souches, 17 possédaient le gène *mec*A, 1 souche possédait le gène *mec*C et les 21 autres ne possédaient aucun gène *mec*. Cependant, 1 souche de *S. aureus* ne possèdant aucun gène *mec* présentait une CMI oxacilline de 4 mg/L (catégorisée résistante) mais avec des diamètres d'inhibition pour la céfoxitine et le moxalactam conservés, correspondant à un profil évocateur d'une souche BORSA (*borderline oxacillin-resistant S. aureus*).

- **16 souches** de *S. aureus* adressées au CNR pour recherche de gène *mec*C. Cette demande était motivée i) par une alerte du système expert d'analyse des antibiogrammes qui incitait à rechercher la présence du gène *mec*C 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 *mec*A négative. Huit de ces souches se sont révélées porteuses du gène *mec*C. Sur les 8 autres souches, 4 étaient en fait porteuses du gène *mec*A, 3 se sont avérées être sensibles à la méticilline. La dernière souche s'est avérée être négative pour *mec*A et *mec*C mais résistante à l'oxacilline avec une CMI confirmée à 3 mg/L, faisant suspecter soit une modification des PLP classiques soit une hyperproduction de pénicillinase. Les 8 souches *mec*C-positives ont été isolées à Dunkerque, Guéret, Agen, Chalon-sur-Saône, Contamines-sur-Arves, Lyon et Tarbes. Les 8 souches appartenaient toutes au complexe clonal CC130 qui est le clone *mec*C+ le plus courant en Europe.
- **une souche** de *S. aureus* isolée chez un patient présentant un échec de traitement par la céfazoline : cette souche ne possédait aucun gène *mec* et s'est avérée sensible à la méticilline (aucun phénotype lié à la résistance ne pouvant donc expliquer l'échec clinique).

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

- **17 souches** de *S. saprophyticus* et *S. lugdunensis*. Les souches appartenant à ces deux espèces présentent fréquemment des CMI catégorisées intermédiaires 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 *mec*A sont rares. Comme recommandé dans le CA-SFM, lorsque les diamètres ou les CMI céfoxitine ou oxacilline rendent un résultat intermédiaire 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 *mec*A, et les 10 autres étaient négatives pour *mec*A et *mec*C et étaient donc sensibles à la méticilline.
- **18 souches** de staphylocoques à coagulase négative appartenant à d'autres espèces (*S. xylosus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. simulans, S. pettenkoferi*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : 7 possédaient le gène *mec*A (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 des cinq dernières années 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 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.
En 2017, la détermination de la CMI **ceftaroline** ou la confirmation d'une résistance détectée par le laboratoire expéditeur ont été demandées pour **9 souches** résistantes à la méticilline : **4 souches de *S. aureus*** (3 étaient sensibles à la ceftaroline, avec des CMI comprises entre 0,38 et 0,75 mg/L et une était résistante avec une CMI à 1,5 mg/L), **2 souches de *S. epidermidis*** (CMI obtenues à 0,38 mg/L) et **3 souches de *S. haemolyticus*** (une souche sensible avec une CMI à 0,38 ; 2 résistantes avec une CMI à 1,5 mg/L).
Une souche de *S. aureus* a été envoyée pour vérification de la CMI du **ceftobiprole** : la souche était bien sensible (CMI 0,5 mg/L).

3.3.3.2. Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

En 2017, l'étude de la sensibilité aux glycopeptides a été effectuée pour **202 souches de staphylocoques** provenant de laboratoires extérieurs (108 *S. aureus* et 94 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié par des CMI élevées aux glycopeptides (> 1mg/L) ou un test de dépistage des hGISA (*heterogeneous glycopeptide intermediate S. aureus*) positif (le plus souvent le test Teico5, très rarement le test GRD). 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.
Sur les **108 souches de *S. aureus*** reçues dans ce contexte, 10 souches (9,3%) 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). Trois de ces 10 souches hGISA étaient également résistantes à la daptomycine. Pour 7 souches, les tests de dépistage des hGISA (tests en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un inoculum 2McF) étaient négatifs, ce qui a conduit à ne pas réaliser d'APOP. Cependant elles ne pouvaient être rendues sensibles aux glycopeptides car elles présentaient des CMI > 2 mg/L au moins pour la teicoplanine, ce qui conduit à les catégoriser résistantes à ce glycopeptide 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-onze souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage. Parmi elles, 28 présentaient une CMI vancomycine ≥ 1,5 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.
Par ailleurs, **au sein des Hospices Civils de Lyon**, la détection de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides est effectuée systématiquement par le CNR sur les souches de SARM de patients atteints de mucoviscidose car il s'agit de patients à risque de sélectionner une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Pour les 35 enfants atteints de mucoviscidose qui ont été détectés porteurs de SARM en 2017, deux souches ont été retrouvées de sensibilité diminuée aux glycopeptides.
Concernant les **staphylocoques à coagulase négative**, **94 souches** ont été adressées au CNR en 2017 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides. Ceci représente une augmentation importante du nombre de demandes (seulement 44 en 2015, 70 en 2016). 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 amené à envoyer les souches au CNR. Sur ces 94 souches, 30 souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides (en bandelettes E-test puis microdilution UMIC lorsque le CA-SFM a supprimé les bandelettes, CMI > 4 mg/L pour la teicoplanine et/ou CMI > 2 mg/L pour la vancomycine). Une des difficultés de ce changement de technique imposé par le CA-SFM est l'obtention de résultats parfois discordants entre les techniques par bandelettes et par microdilution. Cependant, la technique de microdilution est considérée comme la technique de référence et c'est donc sur la base des résultats de cette technique que la sensibilité ou la résistance de la souche sont au final interprétées même si nous n'avons que peu de recul sur l'utilisation de cette technique. Il faut noter que sur les 30 souches reçues 6 étaient également résistantes à la daptomycine et 6 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 SASM/SARM. La résistance aux oxazolidinones est liée soit :
- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *cfr*A 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 *optr*A** 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** entrainant un changement de conformation 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 2017, le CNR a expertisé **73 souches de staphylocoques** pour lequel le laboratoire expéditeur avait identifié une CMI augmentée pour le linézolide. Soixante-sept souches ont été confirmées résistantes au linézolide (CMI > 4 mg/L). Le nombre de souches reçues au CNR pour la détection de cette résistance est en constante augmentation depuis 2011 (Figure 16).

S. aureus
Les 3 souches de *S. aureus* résistantes au linézolide étaient résistantes à la méticilline et provenaient de 2 villes différentes : Brest (n=1) et Suresnes (n=2). Les 3 souches provenaient de prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose. Les deux souches isolées à Suresnes (CMI 12 et 32 mg/L) présentaient une mutation de l'ARNr 23S (G/2576/T, la mutation la plus fréquente) et ne possédait pas le gène *cfr*. La troisième souche ne présentait ni des mutations de l'ARNr 23S ni le gène *cfr* et avait une CMI au linézolide de 16 mg/L.

Staphylocoques à coagulase négative
Les 64 souches de SCN résistantes au linézolide appartenaient à 3 espèces : *S. epidermidis* (n=61), *S. hominis* (n=2) et *S. capitis* (n=1).
La souche de *S. capitis* présentait 2 mutations de l'ARNr 23S (G/2576/T et T/2319/C) et ne possédait pas le gène *cfr*. Les 2 souches de *S. hominis* avaient une CMI de 6 et 8 mg/L et portaient le gène *cfr* sans mutation de l'ARNr 23S associée.
Les 61 souches de *S. epidermidis* étaient toutes résistantes à la méticilline. Parmi ces 61 souches, 17 possédaient le gène *cfr* dont 16 présentaient une mutation associée de l'ARNr 23S

G/2576/T. Parmi les 44 souches ne possédant pas le gène *cfr*, 37 présentaient la mutation G/2576/T, 3 présentaient la mutation T/2504/A, 1 présentait la mutation M/156/T et 1 présentait à la fois la mutation G/2576/T et T/2504/A. Deux souches ne présentaient ni gène *cfr* ni mutations de l'ARNr 23S. Ces deux dernières souches sont en cours d'analyse par séquençage complet du génome.
Ces données confirment que la mutation majeure retrouvée en France est la mutation G/2576/T, à la fois chez *S. aureus* et chez les SCN. Elles montrent aussi une augmentation des souches *cfr* positives (3 détectées en 2015, 8 en 2016, 19 en 2017). L'analyse par séquençage du génome complet de chacune de ces souches est en cours afin de déterminer si le support plasmidique portant le gène *cfr* dans ces souches est le même ou non.
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 X). Elles sont de moins en moins rares et 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. Elles sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations sur l'ARNr 23S mais ces souches ont été responsables de plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières (Bordeaux, Toulouse, Paris). De façon plus inquiétante, nous observons aussi une augmentation du nombre de souches porteuses du 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 un an 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.

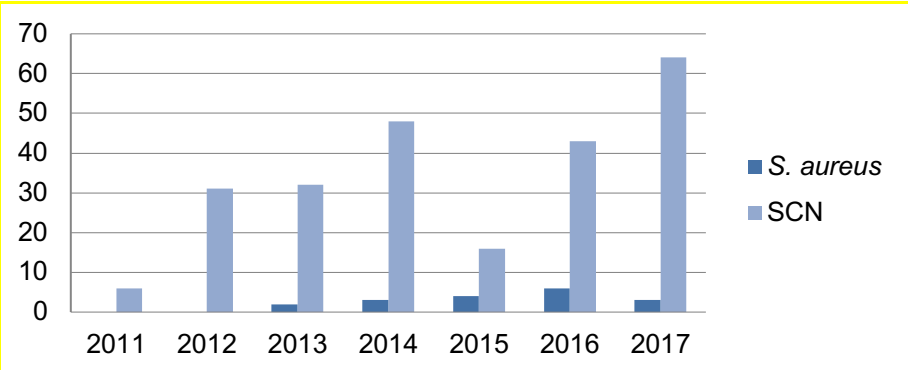


Figure 16- Nombre de souches de staphylocoques **résistantes au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2017.

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 2017, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **53 souches de staphylocoques** (24 *S. aureus* et 29 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 24 *S. aureus* reçues pour cette demande, 16 souches étaient bien résistantes à la daptomycine avec des CMI comprises entre 1,5 et 3 mg/L. Huit de ces souches provenaient d'hémocultures, deux de prélèvements respiratoires, une de prélèvement ostéo-articulaire, une de prélèvement de LCR (dans un contexte de méningite nosocomiale), une de prélèvement cutané alors que les 3 souches restantes étaient de localisation non précisée. Quinze de ces souches étaient des SARM et quatre présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Le gène *mprf* codant pour une lysyl-phosphotidylglycérol (L-PG) synthase 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 daptomycine qui est une molécule anionique. En effet, pour être active, la daptomycine doit venir s'insérer au sein de la membrane pour créer des pores induisant une fuite du potassium intracellulaire et la mort de la bactérie. Le séquençage du gène *mprf* a été réalisé pour 12 de ces souches : pour toutes les souches des mutations non-synonymes ont été retrouvées, pouvant expliquer l'augmentation des CMI daptomycine. 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.

Sur les 29 souches de SCN testées, 17 étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 3 mg/L : 9 *S. capitis*, 7 *S. epidermidis* et 1 *S. pettenkoferi*. Douze de ces souches étaient résistantes à la méticilline et six présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

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 E-tests permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococciques utilisés en thérapeutique.

- Six souches de *S. aureus* ont été reçues pour détection de la résistance à la **mupirocine**. Cinq se sont avérées sensibles et une souche s'est révélée intermédiaire (CMI 128 mg/L).

- Quatre souches de *Staphylococcus* ont été reçues pour vérification de la résistance à la **pristinamycine** : 1 souche de *S. aureus*, 2 souches de *S. epidermidis* et 1 souche de *S. haemolyticus*. A l'exception d'une souche de *S. epidermidis* qui s'est avérée être sensible à la pristinamycine, la résistance a bien été confirmée sur les 3 autres souches.

- Une souche de *S. epidermidis* a été reçue pour réalisation d'une CMI **tédizolide** qui s'est avérée être sensible (contexte d'IOA).

- 3 souches ont été reçues pour vérification de la résistance aux **macrolides** : 1 souche de *S. epidermidis* et 2 souches de *S. aureus*. Une des souches de *S. aureus* présentait un phénotype de type MLS_B inductible. Pour la souche de *S. epidermidis*, des discordances étaient observées pour les résistances aux lincosamides, synergistines et cotrimoxazole entre la méthode par diffusion et la méthode en milieu liquide. L'analyse de la souche par micropuce à ADN a permis d'identifier les gènes suivants : gène *vat*B (impliqué dans la résistance aux macrolides), gène *vga*A (impliqué dans la résistance aux lincosamides et synergistines A) et gène *dfr*S1 (impliqué dans la résistance au triméthoprime). Ces trois gènes pourraient expliquer une résistance d'expression variable à ses trois familles d'antibiotiques. Enfin, l'analyse de la dernière souche de *S. aureus* a permis de mettre en évidence le gène *vga*A (responsable d'un efflux conférant un phénotype de résistance LS_A) qui pourrait expliquer la discordance observée entre la technique en milieu liquide et la technique en diffusion pour cette souche.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour vérification de la résistance aux **aminosides** suite à une discordance sur des résultats antérieurs obtenus dans le laboratoire expéditeur et au CNR. Au CNR, la souche était sensible à la gentamicine et résistance à la kanamycine et la tobramycine, confirmant les résultats obtenus par le laboratoire expéditeur.

- Cinq souches (3 *S. aureus*, 1 *S. capitis* et 1 *S. lugdunensis*) 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.

- Une souche de *S. aureus* a été reçue pour confirmation de la résistance à la **tigécycline** (CMI 3 mg/L).

3.3.4. Analyse des tendances

Globalement, nous observons depuis 2 ans une très nette augmentation du nombre de souches reçues pour la vérification de la sensibilité aux glycopeptides en lien direct avec les changements des recommandations faites par le CA-SFM depuis 2015 et une augmentation du nombre de souches reçues pour la résistance à certains antibiotiques de recours comme le linézolide ou la daptomycine. Pour le linézolide, cette augmentation est d'autant plus inquiétante qu'elle implique de plus en plus souvent un mécanisme à support plasmidique dont on peut redouter, à l'avenir, le caractère épidémique. En lien avec le CNR des Résistances auquel le CNR des Staphylocoques est dorénavant associé pour la surveillance spécifique des résistances chez les staphylocoques, une étude de la prévalence de ces résistances est en cours de mise en place.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune) ou d'autres réseaux nationaux de surveillance le cas échéant

Se reporter au chapitre 4. «Alerte » pour SPF

Se reporter au chapitre 8.3.1 pour la mise en place du réseau commun des CNR “Résistance aux antibiotiques” et “Staphylocoques » incluant des laboratoires publics et privés, auxquels ils pourraient s'adresser régulièrement pour des activités de surveillance épidémiologique.

- 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, …)).

Aucun travail spécifique n’a été réalisé au cours de l’année 2017 (et n’est prévu en 2018), les activités et les financements de l’ECDC étant actuellement surtout focalisés sur les entérobactéries produisant des carbapénèmases.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- **SURVEILLANCE EN SANTE HUMAINE**

Choc toxique staphylococcique menstruel : épidémiologie en France
Dans un contexte médiatique sensible laissant parfois place à des communications alarmistes, une mise au point a été réalisée par le Centre Nationale de Référence (CNR) des Staphylocoques et Santé publique France concernant l’épidémiologie des CTS et leur prévention. En France, en l’absence de déclaration obligatoire, la surveillance de cette maladie repose sur la déclaration

spontanée des cliniciens et microbiologistes dont les données sont recueillies par le Centre Nationale de Référence (CNR) des Staphylocoques.

Entre les années 2000 et 2010, le CNR des staphylocoques a enregistré une augmentation continue des déclarations spontanées de CTS. Cependant, concernant les **CTS menstruels**, les données de surveillance communiquées par le CNR ne mettent pas en évidence d'augmentation significative du nombre de cas rapportés ces 6 dernières années (2010-2016). Une vingtaine de cas sont ainsi recensés en moyenne chaque année. Par ailleurs, cette évolution du nombre de cas de CTS recensés par le CNR restait significativement corrélée au nombre total de souches adressées pendant la même période. Plusieurs facteurs pouvant expliquer ces observations, comme la conséquence d'une notoriété croissante du CNR associée à une meilleure sensibilisation des médecins à cette maladie, l'augmentation réelle de l'incidence de cette pathologie, le contexte épidémiologique conduit à s'interroger sur l'évolution du nombre de cas de CTS et la proportion respective des **CTS menstruels**. Afin de compléter ces éléments, une première analyse réalisée sur les données du PMSI des Hospices civils de Lyon suggérait une tendance à la diminution, de 2010 à 2015, du nombre de diagnostics de CTS en milieu hospitalier.

Du fait de la gravité de la maladie et de l'absence de procédure exhaustive et régulière de surveillance, une analyse des données du PMSI sera réalisée afin d'évaluer la complétude des données recensées par le CNR. L'objectif de l'étude sera, dans un premier temps, de décrire les caractéristiques épidémiologiques et d'estimer l'incidence des cas hospitalisés pour SCT à partir de la base de données nationale du PMSI. Dans un second temps, une étude de faisabilité sera réalisée au sein d'établissements pilotes afin d'évaluer la sensibilité et l'intérêt de l'utilisation du PMSI pour la surveillance épidémiologique des CTS menstruels.

Choc toxique staphylococcique menstruel : facteurs concourant à la survenue de la maladie.

Collaboration : CNR des staphylocoques, UMR CNRS 5557 et UMR CNRS 5558 - LBBE "Biométrie et Biologie Évolutive" / Equipe Bioinformatique et Génomique Evolutive,

Nous avons décidé de réexaminer cette maladie et les facteurs qui concourent à son déclenchement. En effet, il reste de très nombreuses incertitudes, notamment sur la discordance entre la fréquence des femmes à risque et celle de la survenue de la maladie. D'après la littérature, environ 70% des femmes utilisent des tampons comme protection périodique, et 0,5% d'entre elles ont une colonisation vaginale à *S. aureus* producteur de TSST-1. Ainsi, le risque théorique de survenue du choc toxique menstruel est très supérieur à l'incidence réelle, indiquant que d'autres facteurs que la simple colonisation et l'utilisation de tampons pourraient intervenir dans sa survenue : les propriétés biochimiques de la protection périodique, son usage avec notamment la durée d'utilisation, les propriétés de la souche de *S. aureus* TSST-1+ (clone CC30-MSSA), la composition de la flore vaginale, les propriétés biochimiques du fluide vaginal, l'immunité anti-*S. aureus* de la patiente (anticorps anti-TSST-1, récepteur de la TSST-1).

A partir d'une cohorte d'utilisatrices de tampons périodiques, nous observons que la fréquence de colonisation des tampons périodiques par *S. aureus* est bien supérieure à celle décrite dans la littérature et atteint 30%. Les microbiotes des tampons colonisés par *S. aureus* sont différents de ceux des tampons non colonisés lors d'analyse en culturomique et métagénomique par *16S metabarrecodding*, mais cette différence ne peut pas s'expliquer par la simple présence de *Lactobacillus* comme initialement décrit (Jacquemond I *et al*. 2018. Scientific Reports, en cours de révision).

Ce travail indique aussi que 4% des tampons usagés contiennent une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1, avec une majorité de souches CC30-MSSA, et identifie donc les *S. aureus* CC30-MSSA producteurs de TSST-1 comme un pathovar vaginal. L'analyse en génomique

comparative des différents clones de *S. aureus* producteurs de TSST-1 a permis d'identifier quatre facteurs de virulence spécifiques au CC30-MSSA, dont une adhésine spécifique et deux enzymes capables d'altérer les jonctions inter-cellulaires, et donc de favoriser le passage de la toxine du vagin vers la circulation sanguine. La poursuite de ces analyses devrait nous permettre de déterminer plus clairement les mécanismes de colonisation vaginale en utilisant des modèles cellulaires et tissulaires, et ceux de passage de la TSST-1 à travers la muqueuse vaginale.
La question de l'implication de certains types et modèles de protections périodiques se pose naturellement. Malheureusement, malgré les relances, nous n'arrivons à connaître la marque du tampon incriminé que dans 30% des cas. Nous avons donc décidé d'examiner, à partir des indications données par les participantes à l'appel national, l'impact des marques et modèles de tampons les plus utilisés en France sur la production de TSST-1 dans un modèle expérimental *in vitro*. Les résultats sont très reproductibles quels que soient le fabriquant et le modèle. Les tampons de la marque Tampax® sont ceux qui favorisent le moins la croissance de *S. aureus*. Les coupes menstruelles et les tampons « bios » favorisent plus la croissance de *S. aureus* et la production de toxines que les autres modèles. L'étude nous a permis d'investiguer l'interaction entre le staphylocoque et les protections périodiques. Les différences observées entre les marques de tampons ne sont pas liées au relargage de molécules par les tampons, mais à la différence de nature des fibres et leur densité dans le tampon ; l'espace entre les fibres étant le lieu de croissance du staphylocoque et de production de toxine. De même, nous avons montré que les coupes menstruelles ne protègent pas de cette maladie, qu'un biofilm important de *S. aureus* se développe à sa surface et que les mêmes précautions d'utilisations doivent être préconisées avec les coupes et les tampons[15]

- **SURVEILLANCE EN SANTE ANIMALE**

Sur la base des liens anciens existant avec l'ANSES de Lyon et après de nombreux travaux consacrés aux clones de SAM et de SARM circulants chez les animaux domestiques, de rentes ou d'élevage, un travail collaboratif a été initié portant cette fois sur *S. pseudintermedius*, espèce très prévalente chez le chien. Cette espèce est responsable d'infections cutanées très inflammatoires voire nécrosantes chez ces animaux. Ce travail est apparu pertinent dans une optique de santé humaine compte tenu i) du nombre de chiens de compagnie en France et des liens étroits entre les animaux et leurs propriétaires, ii) de plusieurs cas sévères d'infections humaines à *S. pseudintermedius* rapportés et étudiés par le CNR après morsures ou léchages de lésions associées à des septicémies, des endocardites et des infections ostéo-articulaires ayant conduit à des amputations, iii) des niveaux de résistances élevés aux antibiotiques des souches cliniques au sein de cette espèces, notamment pour la méticilline.
Le travail porte sur l'analyse d'un panel d'une soixantaine de souches de *S. pseudintermedius* résistants à la méticilline isolés chez le chien en médecine vétérinaire via le réseau ResaPath. Les souches collectées par l'ANSES ont été séquencées et le CNR a apporté son expertise en réalisant l'ensemble de l'analyse des séquences en termes de phylogénie, de recherche de gènes de résistance et de virulence et de recherche de gènes spécifiques de chacun des clones identifier afin de comprendre la diffusion rapide de certains d'entre eux. Les travaux ont permis de mettre en évidence l'émergence de nouveaux clones de *S pseudintermedius* résistants à la méticilline en France avec des résultats cohérents avec ce qui a été observé notamment en Australie. Ce travail initié en Novembre 2017 est en cours de finalisation pour une publication dans les mois à venir.

[15] Nonfoux L. *et al*. 2018. « Impact of currently marketed tampons and menstrual cups on *Staphylococcus aureus* growth and TSST-1 production in vitro » accepté dans Applied and Environmental Microbiology.

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 (cas groupés : épidémie d'infections avec le clone de SARM-C USA300, épidémie d'infections à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement, épidémies dans des collectivités (services de néonatalogie, prisons, services cliniques…)) 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 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)

(Poster aux JNI 2017 « Signalements d'infections nosocomiales à *Staphylococcus aureu*s depuis 2012 : particularités épidémiologiques en réanimation néonatale »).

Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2017 et début 2018. Il est surprenant de voir 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 comme dans le cas du clone Géraldine retrouvé à Bordeaux, Lens, Limoges, Arras et Épinal, un clone à la fois communautaire et nosocomial. 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 des services avec décontamination des personnels après ou sans dépistage préalable.

Clone Géraldine. Depuis 2011, le CNR a participé à la détection et l'investigation d'épidémies à SARM (clone Géraldine) dans les services de Néonatologie de Bordeaux[16], de Limoges[17], d'Epinal et Arras et a poursuivi en 2017 l'investigation du service de néonatalogie de Lens.

Pour le suivi de l'épidémie de Lens, une analyse par séquençage a été réalisée pour vérifier s'il s'agissait d'une même souche ou de l'introduction successive de différentes souches appartenant au même clone.
Nous avons utilisé le NGS dans le cadre de l'investigation d'une ré-émergence en 2018 du clone Géraldine ST5-MRSA-I [*tst*+] dans le service de néonatalogie du CH de Lens (n=5). 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) et (iii) des souches du clone Géraldine isolées hors cas d'épidémies et de différents départements (n=11).
L'analyse par puces d'ADN a identifié les 5 souches comme appartenant au même fond génétique (ST5-MRSA-I [*tst*+], clone Géraldine, profil identique) que les souches isolées précédemment dans le même service. L'objectif était de savoir s'il s'agissait de la même souche ou d'introduction successive de souches différentes du même fond génétique.
Pour déterminer plus précisément les liens de clonalité entre les souches isolées à différents temps dans le service de néonatalogie de Lens, nous avons utilisé l'ensemble de souches du clone Géraldine déjà séquencées au CNR et qui provenaient de différents épisodes épidémiques en France (Arras (n=3), Bordeaux (n=37), Épinal (n=2), Limoges (n=3) et Lens (n=30)) et des témoins hors épidémies. Le génome de la souche N315, (ST5-MRSA d'une lignée différente), a été utilisé comme référence pour construire un arbre phylogénétique basé sur les positions polymorphiques conservées (SNP dans le *core*-génome).
Plus de 95 % de bases ont été alignées sur le génome de référence (pour toutes les souches) et un total de 1701 positions informatives (SNP) ont été trouvés dans le *core*-génome. La phylogénie basée sur ces SNPs a montré la structure fortement clonale des souches isolées à Lens pendant le premier épisode épidémique et pendant l'épisode de 2018. Un maximum de 18 SNPs été trouvé entre les souches de Lens. Ce nombre de SNPs est compatible avec l'horloge moléculaire de *S. aureus* qui est d'environ 1 SNP pour 15 à 30 jour d'évolution.
Ces résultats révèlent l'endémie de cette souche Géraldine au sein du service de Néonatologie de Lens et non pas l'introduction d'un nouvel isolat de cette lignée (Figure 17).

[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.

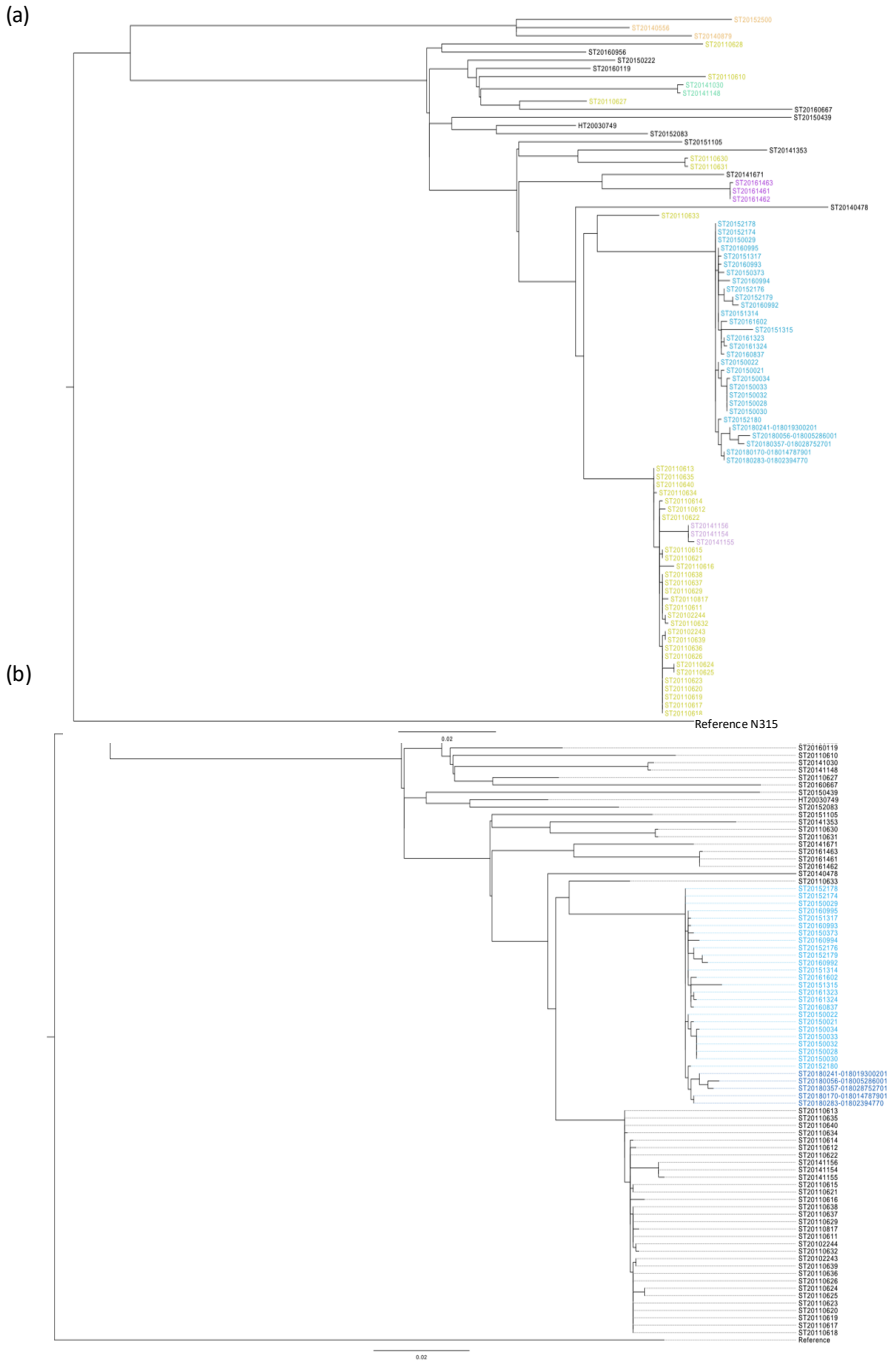


Figure 17. Phylogénie basée sur 1701 SNPs du *core*-génome des souches ST5-MRSA-I, clone Géraldine.
(a) arbre phylogénétique avec le positionnement des souches par origine géographique : bleu = souches des épisode épidémiques de Lens, vert-lime = souches de Bordeaux, vert clair = souches d'Épinal, rose = souches de Limoges, violet = souches d'Arras ; orange = souches avec une cassette SCC*mec* proche du clone Géraldine ; noir = témoins hors épidémie
(b) arbre phylogénétique avec les souches de Lens du premier épisode en bleu clair et les souches de l'épisode de 2018 en bleu foncé.

CC1-MRSA-IV. En 2017, le CNR a également participé à l'investigation d'épidémie du service de néonatalogie du Mans (9 souches : portage de nouveau-né et de personnel) en plus des 20 reçues en 2016. Les dépistages des soignants ont été effectués. Le clone responsable n'est que très faiblement représenté dans la biothèque du CNR avec quelques cas sporadiques d'infections communautaires. Il faudra poursuivre la surveillance de ce clone.

SARM. Une augmentation de la prévalence du portage et du nombre de cas d'infections à SARM a été signalée dans le service de néonatalogie de Lille en 2017. Nous avons reçu 13 souches

appartenant à 5 clones de SARM différents correspondant aux principaux clones de SARM-H circulant en France.

SASM. Une augmentation de la prévalence du portage et du nombre de cas d'infections à SASM a été signalée dans le service de néonatalogie de Cayenne en 2016 et s'est poursuivi en 2017. En 2017, nous avons reçu 20 souches de SASM et 1 souche de SARM en plus des 35 souches de SASM et 2 de SARM déjà reçues en 2016 (principalement des souches de portage). Il s'agissait de souches de SASM appartenant à des fonds génétiques distincts (9 fonds génétiques différents) et donc pas d'une source d'infection commune mais nécessitant un renforcement des mesures d'hygiène.

Le même phénomène a été observé dans le service de néonatalogie de Créteil en 2017. Nous avons reçu neuf souches appartenant à trois fonds génétiques différents avec nécessité d'un renforcement des mesures d'hygiène.

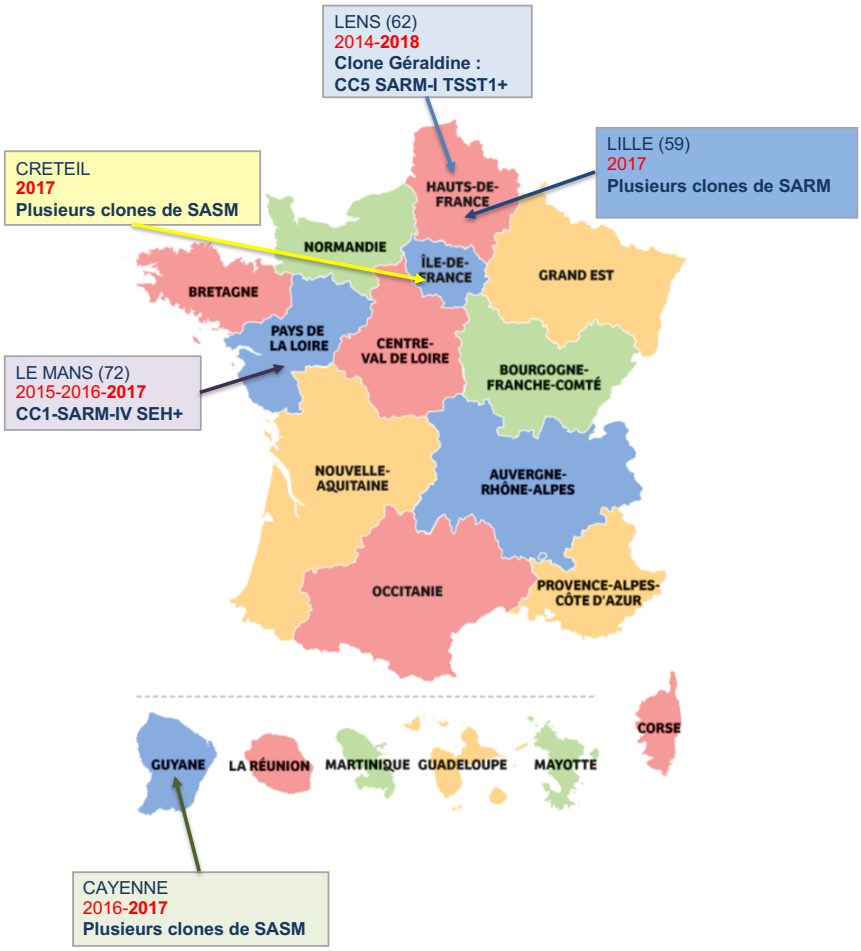


Figure 18- Épidémies d'infections à *S. aureus* dans les **services de néonatalogie** en France en 2017

4.2.2. Épidémie dans une Maison d'Enfants à Caractère Social

Le CNR a participé à la gestion d'une épidémie d'infections cutanées dues à un SASM PVL+ au sein de la MECS (maison d'enfance à caractère social) (59). La maison est organisée avec 4 sous-groupes (un total d'environ 70 enfants). Au moment du signalement début juin, un cas a été confirmé avec une souche CC1-MSSA-PVL+ et 4 autres enfants avaient eu des lésions cutanées suspectes, mais sans prélèvement et tous résolues au moment du signalement.

Une première CAT a été établi le 20/06 (dépistage des cas suspects avec envoi au CNR en cas de SASM+ et décolonisation des cas voire des sous-groupes si le dépistage confirme au moins un 2ème cas). Début juillet, un nouveau cas suspect était détecté ainsi que la récidive du cas confirmé. Après dépistage, 5 souches isolées chez 5 patients différents ont été identifiées par le CNR comme appartenant au complexe clonal CC1-MSSA. Après concertation téléphonique (ARS/Arlin, SPF, CNR), une décontamination ciblée a été organisée en lien avec l'Arlin/ARS-CIRE avec la mise en place de mesures d'hygiène adaptées (hygiène des mains, bionettoyage des locaux...). Deux patients ont récidivé : un en septembre et un en novembre. Les plaies ont été couvertes et les mesures d'hygiène à nouveau renforcées. Aucun nouveau cas n'a été signalé au CNR depuis.

4.2.3. Épidémie d'infections à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement

Le CNR a participé à l'investigation de cas groupés d'infections cutanées au sein d'un foyer d'hébergement et de travail pour handicapés. En décembre 2013, l'ARS Ile de France a informé l'Arlin de l'existence d'une épidémie d'infections cutanées à type de furoncles et/ou d'abcès touchant depuis 2008 les résidents d'un foyer d'hébergement avec une recrudescence du nombre de cas. Il s'agissait là encore d'une souche CC1-MSSA PVL+. Suite à une concertation téléphonique (ARS/Arlin/SPF/CNR), une décolonisation de l'ensemble de la structure sans dépistage préalable avait été décidée. En 2014, 10 nouveaux épisodes avaient été détectés affectant particulièrement 4 sujets à récidive. Il a été décidé de tenter une décolonisation digestive chez ces patients. Depuis, un cas a été signalé en 2016 et un en 2017 au sein de cette structure sans diffusion de la souche aux autres résidents du foyer.

4.2.4. Recherche de lien de clonalité

En 2017, de nombreuses demandes de recherche de lien de clonalité concernant des souches de *S. aureus* (SARM ou SASM) 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 19).
Il est important de rappeler que notamment pour l'espèce *S. aureus*, la circulation de grands clones de SARM mais également de SASM 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.

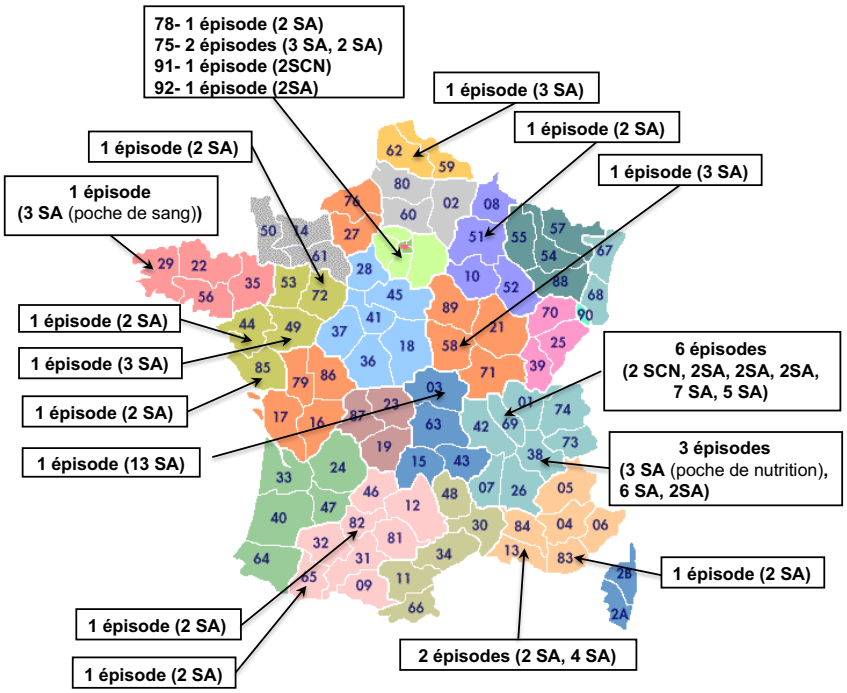


Figure 19- Recherches de lien de clonalité effectuées au CNR en 2017

4.2.5. Alerte Vitek

Fin juillet 2017, le CNR a été sollicité par deux laboratoires extérieurs pour l'expertise de souches de *S. aureus* dont les antibiogrammes réalisés en Vitek® (bioMérieux) et diffusion étaient discordants vis-à-vis de la résistance aux bétalactamines. Après vérification, le CNR a confirmé que ces souches étaient bien des SARM (résistants aux bétalactamines, porteurs du gène *mec*A et exprimant la PLP2a), mais pas détectés comme tels par l'automate Vitek® (bioMérieux). Cette absence de détection du phénotype de SARM constitue une erreur majeure avec impact pour le patient. Une réclamation a donc été adressée à bioMérieux par les deux laboratoires extérieurs. En parallèle, nous avons lancé une alerte de réactovigilance auprès de Santé Publique France le 14/08/2017, transmise à l'ANSM le 21/08/2017 (référence CERFA n°R1715012).
Afin d'évaluer rapidement l'ampleur de cette anomalie, nous avons sélectionné 24 souches de *S. aureus* isolées de prélèvements cliniques à l'Institut des Agents Infectieux de Lyon (IAI, Hospices Civils de Lyon), et présentant un profil d'antibiogramme suspect. Une seule de ces souches s'est révélée être un SARM non détecté sur Vitek® (soit près de 4,2 % des *S. aureus* avec le profil d'antibiogramme suspect). Fin août, le CNR avait collecté 6 souches de SARM non-détectées comme telles sur Vitek® (19 souches fin 2017). Leur typage par micropuce à ADN n'a pas révélé d'association de cette anomalie à un clone particulier. L'analyse des numéros de lots des cartes Vitek® P631 utilisées pour leur antibiogramme n'a pas révélé non plus d'association à un lot particulier.
Suite à l'alerte de réactovigilance, et en collaboration avec bioMérieux et l'Institut des Agents Infectieux de Lyon (IAI), nous avons réalisé une étude d'impact à grande échelle durant le mois de décembre 2017. La recherche systématique d'un défaut de détection du phénotype SARM a

permis l'expertise de 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 Vitek®.
Suite à cette étude d'impact, deux mesures correctives ont été mises en place à l'échelle nationale sur recommandations conjointes du CNR et de bioMérieux :

- Alerte auprès des utilisateurs Vitek® ; présentation de règles de vigilance associant la surveillance des profils d'antibiogrammes suspects et recommandation de vérification de la résistance aux bétalactamines par une seconde technique ; établissement de règles de vigilance à implanter au sein des systèmes d'analyse chez tous les utilisateurs de Vitek®
- Installation et évaluation d'une nouvelle version du système d'exploitation du Vitek® au sein de l'IAI, incluant un correctif produit par bioMérieux et visant à éviter le défaut de détection des 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 néonatologie 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 néonatologie 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 si 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. Le Dr NAIMI a effectué un premier séjour en France en 2017 ce qui a permis la caractérisation de 110 souches de SARM isolées d'infections nosocomiales. 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 »
. Cours Pasteur "Résistance bactérienne aux antibiotioques" - Résistance chez les staphylocoques

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

En 2017, le CNR n'a pas élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

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 2018.

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 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 2300 courriers en 2017). 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 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.

HAS
Anne Tristan fait partie du groupe de travail pour l'élaboration des recommandations de bonne pratique sur le thème : **« Prise en charge des infections cutanées bactériennes courantes ».**

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.

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 pour **13** 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 pas centres. Cette étude devrait démarrer en 2018 à l'initiative du CNR français.

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

Émissions télévisées grand public

- France 5. « Allodocteurs : Tampons hygiéniques : attention au choc toxique ! » 4.01.2017.(http://www.allodocteurs.fr/maladies/gynecologie/tampons-hygieniques-attention-au-choc-toxique_21233.html)
- France 5. « Le monde en Face : Tampons, notre ennemi intime » 25.04.2017.(http://www.france5.fr/emissions/le-monde-en-face/diffusions/25-04-2017_566417)

- France 3 Région. Journal télévisé de 19h30. 27.06.2017.
- France 5. Magasine de la Santé. 29.06.2017.

Émissions de radio grand public
- RTL. 26.04.2017.
- RFI. Priorité Santé. 05.07.2017.

Publications de vulgarisation scientifique et médicale
- Santé Magazine. Questions & réponses d'experts « Tampons, en mettre ou pas ? 3 choses à respecter pour une utilisation en toute sécurité ». N°497, avril 2017.
- Pourquoi Docteur. « Syndrome du choc toxique : les tampons ne le favorisent pas » 05.07.2017
- PasseportSanté. « 5 choses à savoir sur le syndrome du choc toxique staphylococcique » 10.07.2017

Sites internet d'information
- BFMTV. « Choc toxique : une étude pointe les coupes menstruelles et le manque d'informations sur les tampons ». 05.07.2017.
- MadmoiZelle. « Coupe menstruelle, tampons et Syndrome du Choc Toxique : que dit l'étude qui fait couler de l'encre ? ». 05.07.2017.
- LCI. « Choc toxique : "Les coupes menstruelles ne sont pas plus dangereuses que les tampons ». 07.07.2017.
- L'OBS Rue89. « Choc toxique : non, la cup n'est pas plus dangereuse que le tampon ». 08.07.2017.
- RTL. Toute l'actualité intime. 29.11.2017.
- 20 min. Quelles précautions prendre pour éviter le choc toxique lié aux règles. 23.01.2018.

Magazines grand public
- Cosmopolitan. « 6 choses que toutes les femmes devraient savoir sur le syndrome du choc toxique ». 20.04.2017.
- L'Express. « Le syndrome du choc toxique (SCT) lié au port des tampons ». 23.04.2017.
- Le Journal des Femmes. « Choc toxique : il n'y a pas un tampon plus à risque qu'un autre ». 24.04.2017
- Elle. « Tampon, notre ennemi intime : le docu que devraient voir toutes les femmes ». 25.04.2017.
- Marie Claire. « Choc toxique : faut-il arrêter d'utiliser des tampons ? » 25.04.2017.
- Femme Actuelle. « Tampon, notre ennemi intime : tout ce qu'on nous cache ». 28.04.2017.
- Les InRocks. « L'enquête-choc sur les tampons hygiéniques ». 28.04.2017.
- Le Parisien. « Chocs toxiques : la composition des tampons mises hors de cause par une étude ». 05.07.2017.
- 20 min. « Chocs toxiques liés aux règles : Risques, causes et prévention... Le point sur ce que nous apprend la nouvelle étude menée à Lyon ». 06.07.2017.
- Le Monde. « Coupe menstruelle ou tampon aucune protection testée ne favorise la production de toxine ». 07.07.2017.
- L'Express. « Les tampons ne favorisent pas les chocs ». 04.07.2017.
- Femmes Ici et Ailleurs. « Tampons et choc toxique ». 07-08.2017.
- Elle. « Faut-il avoir peur des tampons ? ». 17-08.2017.
- Psychologies. Vivre ses règles au naturel. 15-11.2017.
- Femina. Règles : le vrai -faux. 30-11.2017.

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 recrée au 1er 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'Ecole 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 ARN régulateurs. 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 2017, 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.

L'origine Européenne inattendue du SARM communautaire USA300
Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, Egyir B, Larsen AR, Laurent F, Monecke S, Peters G, Skov R, Strommenger B, Vandenesch F, Schaumburg F, Mellmann A.
Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Dec 5;114(49):E10596-E10604.
Abstract. USA300 is a pandemic clonal lineage of hypervirulent, community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) with specific molecular characteristics. Despite its high clinical relevance, the evolutionary origin of USA300 remained unclear. We used comparative genomics of 224 temporal and spatial diverse *S. aureus* isolates of multilocus sequence type (ST) 8 to reconstruct the molecular evolution and global dissemination of ST8, including USA300. Analyses of core SNP diversity and accessory genome variations showed that the ancestor of all ST8 *S. aureus* most likely emerged in Central Europe in the mid-19th century. From here, ST8 was exported to North America in the early 20th century and progressively acquired the USA300 characteristics Panton-Valentine leukocidin (PVL), SCC*mec* IVa, the arginine catabolic mobile element (ACME), and a specific mutation in capsular polysaccharide gene *cap5E* Although the PVL-encoding phage ϕSa2USA was introduced into the ST8 background only once, various SCC*mec* types were introduced to ST8 at different times and places. Starting from North America, USA300 spread globally, including Africa. African USA300 isolates have aberrant *spa*-types (t112, t121) and form a monophyletic group within the clade of North American USA300. Large parts of ST8 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolated in Africa represent a symplesiomorphic group of ST8 (i.e., a group representing the characteristics of the ancestor), which are rarely found in other world regions. Isolates previously discussed as USA300 ancestors, including USA500 and a "historic" CA-MRSA from Western Australia, were shown to be only distantly related to recent USA300 clones.

Un milieu chromogénique commercialisé pour identifier les *S. capitis* multi-résistants
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

Comment détecter correctement *mec*C ?
Dupieux C, Kolenda C, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Bes M, Teale C, Dickson E, Hill R, Skov R, Kearns A, Laurent F.
Variable performance of four commercial chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *mec*C.
Int J Antimicrob Agents. 2017 Aug;50(2):263-265.
Abstract. In this study, the performances of four methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) chromogenic screening media were compared for detecting *mec*C-positive MRSA. Using 111 clinical isolates representative of the various *mec*C-MRSA clones in Europe, chromID® MRSA (bioMérieux) and Brilliance™ MRSA 2 (Oxoid Ltd.) showed higher sensitivity (99.1% and 97.3%, respectively) than BBL™ CHROMagar® MRSA II (BD Diagnostics) and MRSASelect™ (Bio-Rad) (79.3% and 63.1%, respectively) (P <0.0001). These findings have important implications for effective public health diagnostics and epidemiological surveillance of MRSA.

***Staphylococcus capitis* en néonatologie : une endémie planétaire**
Butin M, Martins-Simões P, Rasigade JP, Picaud JC, Laurent F.
Worldwide Endemicity of a Multidrug-Resistant *Staphylococcus capitis* Clone Involved in Neonatal Sepsis.
Emerg Infect Dis. 2017 Mar;23(3):538-539
Abstract. A multidrug-resistant *Staphylococcus capitis* clone, NRCS-A, has been isolated from neonatal intensive care units in 17 countries throughout the world. *S. capitis* NRCS-A prevalence is high in some neonatal intensive care units in France. These data highlight the worldwide endemicity and epidemiologic relevance of this multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci clone.

***Staphylococcus capitis* résistant au linézolide : nouvelle menace**
Butin M, Martins-Simões P, Pichon B, Leyssene D, Bordes-Couecou S, Meugnier H, Rouard C, Lemaitre N, Schramm F, Kearns A, Spiliopoulou I, Hyyryläinen HL, Dumitrescu O, Vandenesch F, Dupieux C, Laurent F.
Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe.
J Antimicrob Chemother. 2017 Apr 1;72(4):1014-1020.
Abstract. Objectives: We investigated the epidemiological, clinical, microbiological and genetic characteristics of linezolid-resistant (LZR) *Staphylococcus capitis* isolates from French ICUs, and compared them with LZR *S. capitis* isolates from other European countries.Methods: All LZR isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing (AST) and the presence of cfr and *optr*A genes as well as mutations in the 23S rRNA and ribosomal proteins were investigated using specific PCR with sequencing. The genetic relationship between isolates was investigated using PFGE and WGS. Epidemiological data concerning LZR S. capitis were collected retrospectively in French microbiology laboratories. Results: Twenty-one LZR isolates were studied: 9 from France, 11 from Greece and 1 from Finland. All were resistant to methicillin and aminoglycosides.

In addition, this unusual AST profile was identified in *S. capitis* isolates from seven French hospitals, and represented up to 12% of the S. capitis isolates in one centre. A G2576T mutation in 23S rRNA was identified in all isolates*; cfr* and *optr*A genes were absent. All isolates belonged to the same clone on the basis of their PFGE profiles, whatever their geographical origin. WGS found at most 212 SNPs between core genomes of the LZR isolates. Conclusions: We identified and characterized an LZR S. capitis clone disseminated in three European countries, harbouring the same multiple resistance and a G2576T mutation in the 23S rRNA. The possible unrecognized wider distribution of this clone, belonging to a species classically regarded as a low-virulence skin colonizer, is of major concern not least because of the increasing use of oxazolidinones.

SARM communautaires dans les services de porte en Europe : no fear !
Bouchiat C, Curtis S, Spiliopoulou I, Bes M, Cocuzza C, Codita I, Dupieux C, Giormezis N, Kearns A, Laurent F, Molinos S, Musumeci R, Prat C, Saadatian-Elahi M, Tacconelli E, Tristan A, Schulte B, Vandenesch F; ESCMID Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS).
MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study.
J Antimicrob Chemother. 2017 Feb;72(2):372-375.
Abstract. BACKGROUND: MRSA is a therapeutic concern worldwide, and a major agent of community-acquired skin and soft tissue infections (CA-SSTIs). While the US epidemiology of MRSA in CA-SSTIs is well described and reports the high prevalence of the USA300 clone, data on the European situation are lacking.
OBJECTIVES: To determine the prevalence and clonal characteristics of MRSA in CA-SSTIs in seven European emergency departments.
PATIENTS AND METHODS: From April to June 2015, patients presenting to the tertiary hospital emergency department with a *Staphylococcus aureus* CA-SSTI were prospectively enrolled. *S. aureus* isolates were characterized by antimicrobial susceptibility testing, detection of Panton-Valentine leucocidin encoding genes and spa-typing, MLST and/or DNA microarray.
RESULTS: Two-hundred and five cases of *S. aureus*-associated CA-SSTIs were included, comprising folliculitis, furuncles, abscesses, paronychia, impetigo, carbuncles and cellulitis. Of the 205 cases, we report an MRSA prevalence rate of 15.1%, with a north (0%) to south (29%) increasing gradient. Fifty-one isolates were Panton-Valentine leucocidin-positive (24.9%), whether MSSA or MRSA, with a heterogeneous distribution between countries. Clonal distribution of MSSA and MRSA showed high diversity, with no predominant circulating clone and no archetypical USA300 CA-MRSA clone.
CONCLUSIONS: This original prospective multicenter study highlights stark differences in European MRSA epidemiology compared with the USA, and that the USA300 CA-MRSA clone is not predominant among community-infected patients in Europe.

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
Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, Métayer V, Bes M, Madec JY, Laurent F.
Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France.
Front Microbiol. 2017 Dec 13;8:2493.

Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, Egyir B, Larsen AR, Laurent F, Monecke S, Peters G, Skov R, Strommenger B, Vandenesch F, Schaumburg F, Mellmann A.

Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Dec 5;114(49):E10596-E10604.

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.

Kinross P, Petersen A, Skov R, Van Hauwermeiren E, Pantosti A, Laurent F, Voss A, Kluytmans J, Struelens MJ, Heuer O, Monnet DL; The European Human LA-Mrsa Study Group.
Livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013.
Euro Surveill. 2017 Nov;22(44).

Roux S, Vandenesch F, Perpoint T, Ferry T.
Necrotising pneumonia following influenza due to PVL-negative *Staphylococcus aureus* in a 64-year-old woman.
BMJ Case Rep. 2017 Oct 23;2017. pii: bcr-2017-222542.

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.

Dupieux C, Trouillet-Assant S, Camus C, Abad L, Bes M, Benito Y, Chidiac C, Lustig S, Ferry T, Valour F, Laurent F.
Intraosteoblastic activity of daptomycin in combination with oxacillin and ceftaroline against MSSA and MRSA.
J Antimicrob Chemother. 2017 Dec 1;72(12):3353-3356.

Kolenda C, Dupieux C, Decousser JW, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Bes M, Teale C, Dickson E, Hill R, Skov R, Kearns A, Laurent F.
Comparison of Automated Antimicrobial Susceptibility Testing Systems To Detect *mec*C-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.
J Clin Microbiol. 2017 Dec;55(12):3554-3556.

Ruppé E, Lazarevic V, Girard M, Mouton W, Ferry T, Laurent F, Schrenzel J.
Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study.
Sci Rep. 2017 Aug 10;7(1):7718.

Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O.
The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*.
Clin Microbiol Rev. 2017 Oct;30(4):887-917.

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 SCC*mec*-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.

Dupieux C, Kolenda C, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Bes M, Teale C, Dickson E, Hill R, Skov R, Kearns A, Laurent F.
Variable performance of four commercial chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *mec*C.
Int J Antimicrob Agents. 2017 Aug;50(2):263-265.

Cameron DR, Lin YH, Trouillet-Assant S, Tafani V, Kostoulias X, Mouhtouris E, Skinner N, Visvanathan K, Baines SL, Howden B, Monk IR, Laurent F, Stinear TP, Howden BP, Peleg AY.
Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors.
Clin Microbiol Infect. 2017 Oct;23(10):767-773.

Butin M, Rasigade JP, Subtil F, Martins-Simões P, Pralong C, Freydière AM, Vandenesch F, Tigaud S, Picaud JC, Laurent F.
Vancomycin treatment is a risk factor for vancomycin-nonsusceptible *Staphylococcus capitis* sepsis in preterm neonates.
Clin Microbiol Infect. 2017 Nov;23(11):839-844.

Bon E, Gadouri K, Avril C, Camuset G, Balleydier E, Mathieu I, Picot S, Jaubert J, Ballas R, Colomb-Cotinat M, Tristan A, Bouchiat C, Filleul L, Pagès F.
Possible outbreak of skin infections due to Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a commercial ship in 2012-2014.
Int Marit Health. 2017;68(1):70-71.

Couvé-Deacon E, Mons F, Garnier F, Leduc P, Ponthier L, Domelier M, Tristan A, Ploy MC, Pestourie N.
Neonatal Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Geraldine: A Bundle of Measures to Halt Transmission.
Infect Control Hosp Epidemiol. 2017 Jun;38(6):749-751.

Dupieux C, Bouchiat C, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Teale C, Edwards G, Hill R, Decousser JW, Trouillet-Assant S, Petersen A, Skov R, Kearns A, Laurent F.
Detection of *mec*C-Positive *Staphylococcus aureus*: What To Expect from Immunological Tests Targeting PBP2a?
J Clin Microbiol. 2017 Jun;55(6):1961-1963.

Butin M, Martins-Simões P, Rasigade JP, Picaud JC, Laurent F.
Worldwide Endemicity of a Multidrug-Resistant *Staphylococcus capitis* Clone Involved in Neonatal Sepsis.
Emerg Infect Dis. 2017 Mar;23(3):538-539.

Butin M, Martins-Simões P, Pichon B, Leyssene D, Bordes-Couecou S, Meugnier H, Rouard C, Lemaitre N, Schramm F, Kearns A, Spiliopoulou I, Hyyryläinen HL, Dumitrescu O, Vandenesch F, Dupieux C, Laurent F.

Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe.
J Antimicrob Chemother. 2017 Apr 1;72(4):1014-1020.

Hodille E, Delouere L, Bouveyron C, Meugnier H, Bes M, Tristan A, Laurent F, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O.
In vitro activity of ceftobiprole on 440 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bronchopulmonary infections.
Med Mal Infect. 2017 Mar;47(2):152-157.

Bouchiat C, Curtis S, Spiliopoulou I, Bes M, Cocuzza C, Codita I, Dupieux C, Giormezis N, Kearns A, Laurent F, Molinos S, Musumeci R, Prat C, Saadatian-Elahi M, Tacconelli E, Tristan A, Schulte B, Vandenesch F; ESCMID Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS).
MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study.
J Antimicrob Chemother. 2017 Feb;72(2):372-375.

(iii) Communications nationales

Orales

Mouton W, Diot A, Assant-Trouillet S, Josse J, Caillon J, Bouvard D, Jacqueline C, Laurent F.
Impact de l'infection à *Staphylococcus aureus* sur l'accrétion osseuse
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017

Kolenda C, Josse J, Sierra R, Hodille E, Badiou C, Renzoni A, Laurent F.
Rôle du système toxine-antitoxine *mazEF* dans la physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*.
Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 2017 (Paris, France)

Gustave CA, Dupieux-Chabert C, Bes M, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A
La guerre des clones - *S. aureus* en France - 2012 à 2016
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Affichées

Subiros M, Colomb-Cotinat M, Bernet C, Blanchard H, Sénechal H, Simon L, Venier AG, Bouchiat C, Tristan A, Berger-Carbonne A
Signalements d'infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* depuis 2012 et particularités épidémiologiques en réanimation néonatale
18èmes Journées Nationales d'Infectiologie, St Malo 21-23 juin 2017.

Lefort S, Tafani V, Saillant V, Hoet D, Pasquier O, Sabuco J-F, Coyne S , Josse J , Laurent F & Mourez M.
Activity of novel anti-staphylococcal persisters in synovial fluid and intra-osteoblast infection models.
EBJIS, 2017 (Nantes, France)

Dyon-Tafani V, Lefort S, Josse J, Valour F, Diot A, Sabuco J F, Coyne S, Mourez M & Laurent F.
Interaction *Staphylococcus aureus* / ostéoblastes : Activité in vitro de nouvelles molécules anti-staphylococciques.
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Gustave CA, Dupieux-Chabert C, Bes M, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A.
Peut-on identifier un *S. aureus* toxinogène uniquement à son antibiogramme ?
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Farrel Cortês M, Martins-Simoes P, Gustave CA, Bes M, Tristan A, Sa Figueiredo AM, Laurent F
Linezolid resistance in Staphylococcal clinical isolates in two different hospitals in France
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Hodille E, Badiou C, Bouveyron C, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O
Clindamycin suppresses virulence expression in *Staphylococcus aureus* clindamycin-inducible resistant strains
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Maali Y, Badiou C, Martins-Simoes P, Hodille E, Bes M, Valour F, Lina G, Laurent F, Trouillet-Assant S.
Caractérisation des facteurs de virulence impliqués dans la cytotoxicité de *S. pseudintermedius*
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

Tasse J, Badel-Berchoux S, Provot C, Laurent F, Bernardi T.
Une nouvelle approche dans la prise en charge des infections chroniques de plaies
37ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 17-18 décembre 2017.

(iv) Communications internationales

Orales
Durand G, Bes M, Javerliat F, Vandenesch F, **Tristan A**
Investigation of Geraldine clone of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* outbreaks in newborns: whole-genome sequencing can reveal unsuspected transmission events
27th ECCMID, Vienne, 2017

Kolenda C, Josse J, Sierra R, Renzoni A, Laurent F.
Importance of *mazEF* toxin-antitoxin system for intracellular development of *Staphylococcus aureus* in osteoblasts.
36th annual meeting of the European Bone and Joint Infection Society, Nantes, 2017

Maali Y, D'anthouard L, Martins-Simôes P, Monteix A, Valour F, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F, Trouillet-Assant S.
Pathophysiological mechanisms of bone and joint infections of coagulase negative staphylococci: specific behavior of *Staphylococcus lugdunensis.*
27th ECCMID, Vienne, 2017

Gustave CA, Tristan A, Martins Simoes P, Stegger M, Benito Y, Andersen P, Bes M, Glaser P, Laurent F, Wirth T, Vandenesch F
Demographic fluctuation of USA300 and European ST80 CA-MRSA lineages: potential role of flimsy antibiotic exposure in fitness increase. ePoster
27th ECCMID, Vienne, 2017

Affichées
Tafani V, Safrani-Lahyani J, Assant-Trouillet S, Chiganne M, Vincent F, Perouse De Montclos M, Anne Doleans-Jordheim A, Laurent F.

New chromogenic medium for the isolation of *Staphylococcus aureus* for Cystic Fibrosis Patient. 27th ECCMID, Vienne, **2017.**

Gustave CA, Bonnichon L, Bouchiat C, Bes M, Laurent F, Vandenesch F, **Tristan A**
Invasive infections: who wins on the battlefield of France in 2015: CC152-MSSA-PVL+, USA300MRSA-PVL+ or ST80-MRSA-PVL+
27th ECCMID, Vienne, **2017.**

Hodille E, Badiou C, Bouveyron C, Bes M, **Tristan A**, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O
Clindamycin still suppresses virulence expression in *Staphylococcus aureus* clindamycin-inducible resistant strains
27th ECCMID, Vienne, **2017.**

(v) Conférences sur invitations.

Vandenesch F. *S. aureus* endocarditis & bacteremia. ESCMID course: Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections – Advancing Technology and Quality for Better Care. Nice, France, 28 – 31 March 2017

Vandenesch F. Potential predictors of infective endocarditis in the course of *S. aureus* Bacteremia. ASM Microbes. New Orleans, June 1-4 2017.

Vandenesch F. MRSA in the community: a phylogeographic study. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 18-19 décembre 2017.

Laurent F. *S. capitis*: a world-wide multidrug-resistant clone responsible for sepsis in neonatal intensive care units. ECCMID 2017, Vienna.

Laurent F. Bacterial typing: what methodology should I use ? Meet the expert session. ECCMID 2017, Vienna.

Laurent F. *S. capitis*: from the local epidemiology … to a world-wide endemicity. ESCMID course: Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections – Advancing Technology and Quality for Better Care. Nice, France, 28 – 31 March 2017

Laurent F. *Staphylococcus aureus*: in vivo adaptation to induce relapse and chronicity. 29° Congresso Brasileiro Microbiologia CBM 2017, Iguazu, Brasil, 24-27 Octobre 2017.

Laurent F. Bone and joint infections: interaction between staphylococci, osteoblasts, osteoclasts and prosthetic materials. 29° Congresso Brasileiro Microbiologia CBM 2017, Iguazu, Brasil, 24-27 Octobre 2017.

Laurent F. *S. capitis* and NICUs: large dissemination throughout the world. Microbiology Workshop – University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 20 Octobre 2017.

Laurent F. Résistances émergentes aux antibiotiques d'impact clinique réel : le acs des bactéries à cocci Gram positif. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 18-19 décembre 2017.

Lina G. Toxic Shock Syndrome : une incidence à la hausse ? 20ème congrès GENESIS, Paris, Septembre 2017

Lina G. Association de la résistance aux antibiotiques et d'inhibiteurs de la réponse immunitaire chez *Staphylococcus aureus*. 9ème journée infections nosocomiales, Lyon, Novembre 2017.

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

Le CNR a établi de longue date des rapports étroits avec l'ANSES de Lyon et a réalisé de nombreux travaux en collaboration au cours des 10 dernière année.
Ainsi en 2017, les travaux conduits en collaboration avec l'ANSES sur les souches de SARM circulants chez les animaux de compagnie collectés via le réseau ResaPath ont fait l'objet d'une publication dans Frontiers in Microbiology (Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, Métayer V, Bes M, Madec JY, Laurent F. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France. Front Microbiol. 2017 Dec 13;8:2493. doi: 10.3389)

Pour les détails des travaux 2017, se reporter au chapitre 3.5.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR poursuivra en 2018 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
Cf chapitre 2.1

Identification des nouveaux mécanismes de résistances aux oxazolidinones
Le CNR poursuivra sa politique de mise en place des outils d'identification des nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques en fonction des descriptions dans la littérature. Ainsi en 2018, le CNR prévoit de mettre au point puis d'implémenter en routine une PCR permettant de détecter le gène de résistance *optr*A qui code un ABC trasporteur conférant la résistance au linézolide et tédizolide et est porté par un plasmide transférable.

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 2017, d'évaluer les performances et l'intérêt des réactifs suivants :

Kit PANTHER FUSION MRSA/MSSA assay (HOLOGIC)
Le CNR évaluera en 2018, un kit qui sera prochainement commercialisé en Europe par la société HOLOGIC pour la détection du portage nasal des souches de MSSA et MRSA. Cette étude prospective sur plus de 500 prélèvements visera à comparer les performances du kit sur automate PantherFusion (mise à la disposition du CNR) avec celle de la culture sur milieu chromogénique MSSA et MRSA directement sur le prélèvement mais aussi après enrichissement en BHI. L'étude devrait débuter en juillet 2018.

Alere™ PBP2A Culture Colony Test
Ce test est déjà utilisé en routine au CNR pour la confirmation de la présence de l'expression de PLPéa par les soyhes de *S. aureus* ou de SCN et don la présence du gène mecA 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 gélosé en utilisant des colonies encore petites. La mise à disposition rapide de l'indentification 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 prévu en 2018 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 8 heures d'incubation. Si cette étude permet montrer qu'une détermination de la sensibilité/résistance à la méticilline est possible dans ces conditions, l'utilisation de ce test permettrait une antibiothérapie adaptée précoce des patients présentant une septicémie à *S. aureus*.

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

Etude phylogénétique et phylogéographique à l'échelle mondiale des souches de *S. capitis* responsables de sepsis chez les grands prématurés
Le CNR a mis en évidence l'existence d'un clone de *S. capitis* (appelé NRCS-A) responsable de sepsis dans les services de réanimation néonatal. Nous avons démontré que ce clone est endémique au niveau mondial et touche spécifiquement les secteurs de réanimation néonatale

accueillant les enfants de très petits poids partout dans le monde. Nous avons caractérisé ce clone au niveau épidémiologique (prévalence, facteurs de sélection, facteurs de risque d'acquisition, etc.) et phénotypique (profils de sensibilité aux antibiotiques, formation de biofilm en étudiant un grand nombre de souches cliniques de ce clone. Sur la base d'une approche NGS et d'études moléculaires, nous avons pu identifier les gènes de virulence, de résistance les éléments mobiles ainsi que les gènes spécifiques au clone NRCS-A. En 2016 a débuté l'analyse d'un très large panel de 250 souches cliniques de *S. capitis* NRCS-A isolées entre 1994 et 2015 et provenant de tous les continents. Pour ces travaux un financement de l'ESCMID de 30 000 euros a été obtenu. L'objectif est, après séquençage HiSeq-Illumina des 250 souches, d'utiliser les approches Bayésiennes sur le jeu de données obtenu afin de reconstruire l'histoire évolutive du clone NRCS-A en intégrant les dimensions spatiales et temporelles pour comprendre les origines, les voies de dissémination, les évolutions en terme de virulence et de résistance aux antibiotiques impliqués dans la diffusion mondiale des souches de ce clone. Il s'agira aussi en comparant les données génétiques et phénotypiques des souches de *S. capitis* isolées chez les nouveaux-nés (clone NRCS-A) versus chez les adultes (n'appartenant pas au clone NRCS-A) d'identifier les traits et mécanismes moléculaires spécifiques du clone NRCS-A qui pourraient expliquer sa capacité de dissémination et sa virulence spécifique chez les grands prématurés. Ces données devraient nous permettre de mieux comprendre les composantes intervenant dans l'émergence, le maintien et l'évolution génétique des staphylocoques et de mettre en place les mesures préventives les plus pertinentes pour essayer de stopper l'expansion des souches NRCS-A dans les services de réanimation néonatale et pour améliorer la prise en charge des prématurés infectés. Ces travaux lancés en 2017 ont pris du retard en raison de problèmes d'inversion de souches par nos collègues anglais en charge de la réalisation des extractions d'ADN et de certaines caractérisations phénotypiques. Arès vérification et confirmation de l'identité de certaines souches, l'analyse des données a pu reprendre et est en cours de finalisation pour une soumission pour publication d'ici la fin de l'été 2018. Les résultats de séquençage complet des génomes confirment l'existence d'un clone présentant un très faible niveau de diversification spatio-temporelle avec identification de souches constituant un proto-clone ayant donné naissance au clone NRCS-A qui a diffusé au niveau mondial. Nous avons pu identifier des gènes spécifiques du clone NRCS-A qui donnent des éléments pouvant permettre d'expliquer l'émergence de ce clone spécifiquement en réanimation néonatale et sa large diffusion. Des travux sont en cours pour confirmer ces hypothèses.

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

Les oxazolidinones, seule véritable nouvelle famille d'antibiotiques commercialisée au cours des 30 dernières années, constituent un traitement de recours pour le traitement des SARM. Cependant, cette famille n'échappe pas à la règle et a vu l'émergence de résistances liée à une utilisation prolongée et à un mésusage du linézolide (LNZ) ou du tédizolide (TDZ) qui sont pour l'instant les seuls antibiotiques commercialisés au sein de cette famille. Les bactéries résistantes 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 *cfr*A/B et *optr*A 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 cutanéo-muqueuse 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 inclues 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 *optr*A (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 initier en septembre 2018

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

Cette étude est adossée à l'étude Etude OXAZO-Staph et 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, *cfr*A/B, *optr*A) 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.
Ces travaux s'étaleront sur 2017 et 2018 dans le cadre d'un master 2 en Infectiologie

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 portera sur le mode de transmission de ces résultats et conseils qui fera appel à un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la Direction des Systèmes d'Information pour la Direction Générale des HCL. Ce système permettra un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un **serveur sécurisé** « **MyHclPro** » (via les identifiants RPPS) qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des avis rendus. Les requérants ou demandeurs pourront adresser leur demande directement sur le site et recevront une alerte par mail les invitant à se reconnecter de manière sécurisée pour consulter l'avis rendu. Ce serveur MyHclPro devrait être opérationnel fin 2018 ; il ne se substituera pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au **site internet du CNR** (http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/) qui permet la diffusion aux professionnels des modalités de fonctionnement du CNR, des diverses recommandations concernant le staphylocoque et les infections staphylococciques, des bilans d'activités et publications du CNR, des enquêtes et études cliniques conduites par le CNR ainsi que les informations sur les formations et congrès.

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

Comme cela a été le cas en 2017, 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). Le réseau partenaire sera sollicité pour participer à trois types d'activité, chaque laboratoire ayant toute latitude pour répondre, en totalité ou partiellement, à la demande des CNR :

Une activité d'alerte

Selon les possibilités techniques des laboratoires, toutes les souches identifiées (en routine ou par des tests complémentaires) comme étant résistantes à des molécules antibiotiques "sentinelles" seront adressées aux CNR concernés pour y être analysées par des techniques de référence. L'objectif de cette surveillance est de détecter précocément et caractériser les mécanismes de résistance à la daptomycine, la ceftaroline et/ou le ceftobiprole chez les staphylocoques ; l'ampicilline, la daptomycine et/ou la tigécycline chez les entérocoques ; l'association ceftazidime-avibactam, la colistine et/ou la tigécycline chez les entérobactéries ; la colistine et/ou l'association ceftolozane-tazobactam chez Pseudomonas aeruginosa. Si nécessaire, des données patients anonymisées pourront être demandées aux microbiologistes du réseau afin de compléter et recouper les informations épidémiologiques dont disposent les CNR.

Une activité de surveillance épidémiologique des phénotypes rares de résistance

Afin d'estimer la prévalence nationale de certains phénotypes rares, les laboratoires du réseau seront invités à établir la fréquence de ces phénotypes au sein de l'espèce concernée à partir des données de leurs systèmes informatiques (SIL), sur des périodes pouvant aller de 3 à 12 mois. Seuls les laboratoires détectant en routine ces phénotypes (dont la liste est donnée dans le questionnaire joint) et qui les enregistrent dans leur SIL pourront participer à cette surveillance. Ces données permettront de mieux cerner les tendances évolutives des phénotypes en question.

Enquêtes ciblées

Les CNR souhaitent pouvoir s'adresser à des laboratoires partenaires pour des enquêtes ponctuelles ciblant des problématiques spécifiques (par exemple, la résistance aux oxazolidinones chez les staphylocoques et les entérocoques). Ces enquêtes dont la durée est limitée dans le temps (de 3 à 6 mois) nécessiteront un recueil de souches et parfois de données cliniques anonymisées.

Autres éléments de collaboration

Il sera proposé aux laboratoires du réseau de participer à l'évaluation de nouveaux réactifs (antibiotiques, dispositifs de mesure de la CMI, tests immunologiques pour le dépistage des protéines support de la résistance, milieux sélectifs de culture et trousses PCR pour le criblage de mécanismes de résistance...).

Les techniques de diagnostic développées par les CNR pourront être transférées aux laboratoires intéressés et évaluées dans les conditions habituelles de fonctionnement d'un laboratoire de biologie médicale, afin de mieux cerner l'intérêt et les limites de ces méthodes.

Les personnels médicaux et techniques des laboratoires partenaires pourront, s'ils le désirent et dans la limite des possibilités des CNR, être formés aux méthodes utilisées pour la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Des souches de référence leur seront fournies afin d'aider à la mise en place de la démarche qualité au sein de leurs structures respectives.

Rétro-information, publications

Les CNR s'engagent à communiquer à l'ensemble des membres du réseau les résultats des enquêtes et des analyses effectuées dans le cadre du partenariat. Les collaborations avec les CNR seront nommément reconnues dans toute communication orale et/ou publication écrite. En retour, les laboratoires partenaires s'engageront à ne pas divulguer à des tiers les résultats d'enquêtes en cours, avant leur présentation sous forme orale ou écrite.

Ce réseau est en cours de constitution. L'objectif est de démarrer son activité de recueil à l'automne 2018

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 en 2018 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 au glycopeptides, à la daptomycine et aux oxazolinidones
Cf chapitre 8.3.1

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 *mec*C 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 utlisant 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.

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.

1. 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 n° 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 PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle-Ranc PA-IAI	E-mail : anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr

3. Secteur sérologie

Frédéric Laurent – directeur adjoint PH - IAI PU - Faculté de Pharmacie de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux PHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux@chu-lyon.fr

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

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

Cadre Aline Billoud	
Techniciennes Nadia Boulegroun Caroline Bouveyron Christine Gardon Emelyne Jeanne Charline Vuillot	
Secrétaire 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 a 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 m^2 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 20). 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 20- 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 DNAthèque 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 sous réserve de signature d'un accord de transfert de matériel entre les parties (les HCL et le laboratoire demandeur- Annexe 4).
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 utilisé 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 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. 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 21).

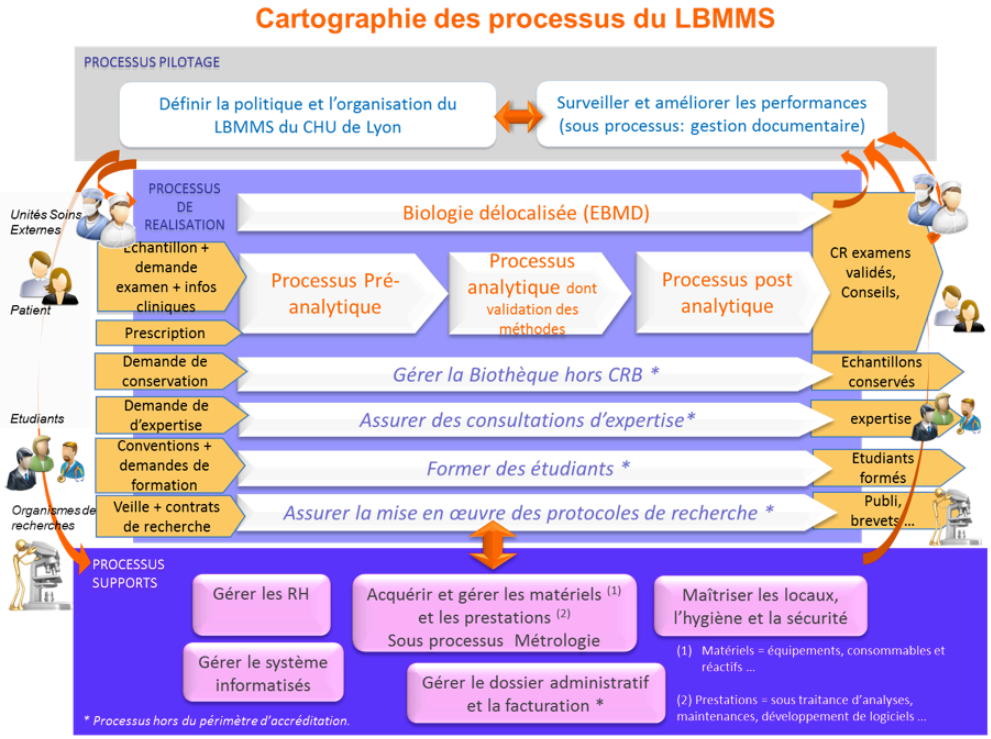


Figure 21- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03)

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 l'ingénieure qualité affectée au CNR. La Figure 22 représente l'organigramme qualité de l'IAI (valide en avril 2017).

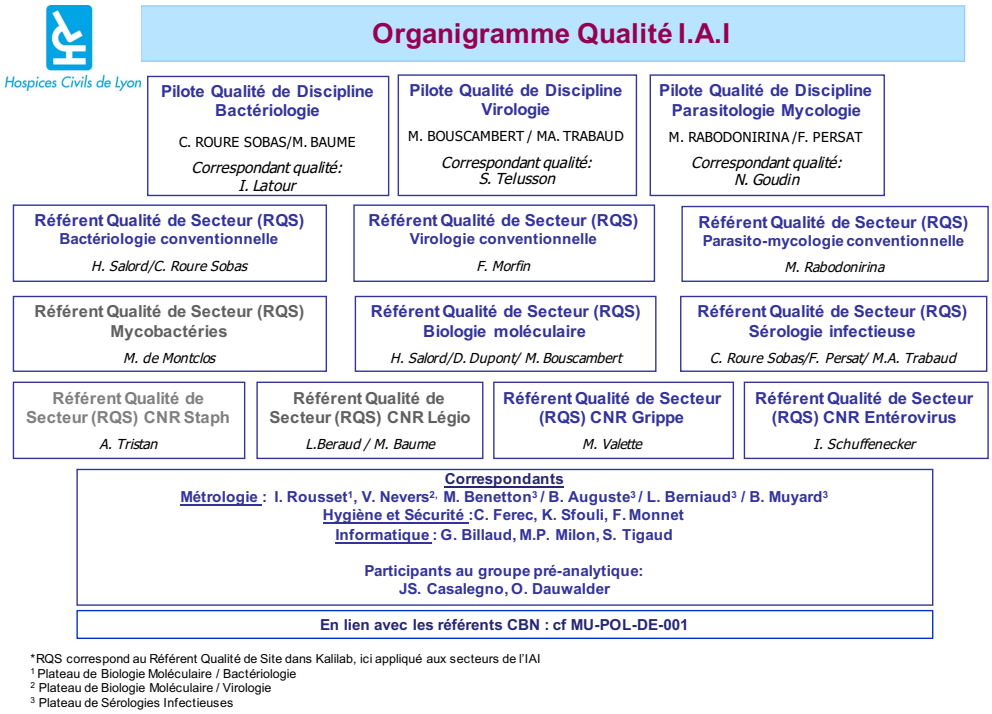


Figure 22- Organigramme qualité 2017 de l'IAI

Un manuel qualité est disponible qui détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale. Il est complété par la documentation spécifique du CNR des staphylocoques (Annexe 5).

1.5.3. 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.

1.5.4. 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 évènements 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 puces à ADN, les PCR (*mec*A/B/C, *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 que pour 2019.

1.5.6. 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

Au cours du 24e congrès de l'ESCMID à Barcelone en mai 2014, le groupe ESGS (ESCMID Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections) dirigé par le Professeur François Vandenesch a décidé d'organiser un contrôle de qualité externe (CQE) destiné principalement aux Centres Nationaux de Référence d'Europe qui sont confrontés à l'analyse et 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 souches de S. aureus 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 (*mec*A, *mec*C et *mup*A), 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 *arc*A, détection des gènes *etd* et *seh* ainsi que le typage de la cassette SCC*mec*.
Onze laboratoires incluant 9 pays européens ont participé au premier CQE organisé par le laboratoire de référence de Belgique (Bruxelles – Pr Olivier Denis) en 2014 : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n =1), France (n=1), Allemagne (n= 2), Grèce (n=1), Pologne (n=1), Portugal (n= 1) et Pays-Bas (n=1).
Pour le 2e CQE organisé également par le CNR belge en 2016, 6 souches de staphylocoques (*aureus* et non *aureus*) ont été adressées aux 11 participants représentant 10 pays européens : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n =1), France (n=1), Allemagne (n= 1), Grèce (n=1), Irlande (1), Pologne (n=1), Pays-Bas (n=1) et Roumanie (n= 1).
Les résultats soumis par le CNR français ont été conformes aux résultats attendus.
Le 3° CQE a été organisé par le CNR français en 2017, 6 souches de staphylocoques (*aureus* et non *aureus*) ont été adressées aux 13 participants représentant 10 pays européens. Le CNR bien qu'organisant le CQE 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'un contrôle de qualité français

Nous avions 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. Il est prévu de l'ouvrir aux laboratoires français qui souhaitent adopter la même démarche.

2. Annexe 2- Capacités techniques du CNR

2.1. Liste des techniques de référence

Lister ici les techniques (diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux, …) utilisées par le CNR, ***en mentionnant explicitement lesquelles sont accréditées à échéance de l'année N****.*

2.1.1. Diagnostic/identification

2.1.1.1. Techniques d'identification

PCR *agr* (dossier accréditation prêt) : 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 diagnostic 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, *hsp*60, *sod*A, *rpo*B, *gap*, comme méthode d'identification des espèces de staphylocoques non *aureus* pour son bon pouvoir discriminant[18]. 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 Malditof 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, carnosus, condimenti, epidermidis, haemolyticus, hominis, hyicus, intermedius, lugdunensis, pettenkoferi, pseudintermedius, saprophyticus, schleiferi, sciuri, warneri, et xylosus*.

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[19], est assimilée au groupe

---

[18] 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

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 Malditof selon les bases de données actuellement commercialisées. Seules les techniques de séquençage (génome complet 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 cette espèce ; cependant lors de l'alignement de la séquence du gène *tuf* de nos souches de *S. argenteus* dans Genebank, 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 Afrique[2]. Aucune souche appartenant à cette espèce n'a été reçue au CNR depuis sa description.

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*, SCC*mec*,…). 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*, *sae*R/S, *vra*R/S, *sar*A).
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.

[19] 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

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 : 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)
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-toxiniques », 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 toxiniques 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 récidive de MTSS en cas de persistance d'une séronégativité.
La sérologie PVL présente un intérêt tout particulier 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 récidive et conduit donc à conseiller aux femmes concernées de s'abstenir d'utiliser des tampons vaginaux.
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*
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 emboitée 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 *mec*A) pour toutes les souches lors de leur arrivée au CNR.

Caractérisation de la Cassette SCC*mec*
L'élément génétique mobile portant le gène *mec*A 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 *mec*A, des éléments de régulation *mec*I et *mec*R1. Des variations ont été détectées, notamment des délétions ou des insertions partielles dans les gènes de régulation de *mec*A, 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 : *ccr*AB1, *ccr*AB2, *ccr*AB3, *ccr*AB4, *ccr*C1, *ccr*C2. 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 *orf*X et *mec*, contenant de nombreux gènes et pseudogènes) permet de définir à ce jour 11 types de cassettes SCC*mec* différentes, chaque clone de MRSA portant une cassette spécifique unique.

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 méticilline, un outil permettant de caractériser rapidement la nature des cassettes SCC*mec* insérées au sein du gène *orf*X 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 (enchainement 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 méticilline.

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 méticilline. 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. Evaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

Détection des gènes *mec*A/*mec*C de résistance à la méticilline (dossier accréditation prêt)

Les gènes *mec*A/*mec*C 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/CA-SFM, 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 2ème 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 teiocoplanine). 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 ≥ 2mg /L
- Staphylocoque coagulase négative : vancomycine ≥2mg/L et teicoplanine ≥4mg /L.

En cas de résultats nécessitant des études complémentaires, le CNR dispose aussi le cas échéant des techniques E-test® CMI vancomycine et teicoplanine avec inoculum classique (0.5 McFarland) sur Muller Hinton ou avec inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cervelle selon les recommandations 2017 du Comité de l'Antibiotique de la Société Française de Microbiologie-EUCAST (CA-SFM EUCAST).

Le CNR dispose aussi des outils pour réaliser la seconde technique proposée par le CA-SFM EUCAST avec ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton (MH) additionnée de 5 mg/L de teicoplanine, puis dépôt de 10 µL d'une suspension de 6.108 UFC/mL (2McFarland), incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures à la recherche de La présence d'au moins 4 colonies permettant de suspecter très fortement le caractère hétéro-VISA. La confirmation définitive se fait par la technique de référence d'analyse de population. Un témoin négatif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et un témoin positif (*Staphylococcus haemolyticus* CIP 107204) sont utilisés. Néanmoins dans notre expérience, cette seconde technique manque de sensibilité et de spécificité et la technique préférentielle est au sein du CNR celle des CMI E-Test.

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

- sans induction sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.
- après induction 48h en bouillon cœur cervelle contenant 2 mg/L de vancomycine puis inoculation sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine. Le dépôt sur les géloses cœur cervelle 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 *van*A/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 *van*A, *van*B, et *van*Z. 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 (*msr*A) et enzymes (*lin*A) 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 (*van*A, *van*B, *van*Z, potentiellement transférables chez *S. aureus* comme cela a été décrit sporadiquement) sont notamment inclus. Au total, la caractérisation moléculaire de la cassette SCC*mec* 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)

*bla*Z	*mpb*BM	*sat*	*fex*A
*bla*I	*vat*A	*dfr*A	*fos*B
*bla*R	*vat*B	*far*1	*qac*A
*erm*A	*vga*	*mup*R	*qac*C
*erm*B	*vga*A	*tet*K	*van*A
*erm*C	*vgb*	*tet*M	*van*B
*lin*A	*aac*A-*aph*D	*tet*Efflux	*van*Z
*msr*A	*aad*D	*cat*	
*mef*A	*aph*A-3	*cfr*	

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 *cfr*A*,* le locus *cfr*B (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 *cfr*A 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 adressé, puisque la puce à ADN utilisée dispose d'un spot spécifique pour la détection du gène *cfr*A.

. une PCR spécifique ciblant le locus *optr*A (décrit en 2015) en position plasmidique qui code pour un 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 a 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 aux glycopeptides qui est retranscrite ci-dessous.

« Ces dernières années, le CNR a été très fréquemment sollicité afin de répondre aux interrogations des laboratoires sur la détermination de la sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides et a pu ainsi recueillir les difficultés rencontrées par les laboratoires français.
L'expérience du CNR sur les performances des différentes techniques permettant de déterminer ou dépister la sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides montre que la mesure de CMI en milieu liquide (UMIC) ou en bandelette Etest présente la meilleure balance sensibilité/spécificité, notamment vs. les techniques de dépistage proposées ces dernières années par le CA-SFM (le test Teico 5 montrant une faible spécificité et le test en macro-bandelette, une trop faible sensibilité). De plus, le CNR a eu de nombreux appels de biologistes témoignant de difficultés à mettre en place ces techniques au sein de leur laboratoire, notamment par la nécessité d'acheter des milieux spécifiques pour cette recherche alors qu'ils ont peu de souches de *S. aureus* rentrant dans les critères CMI>1 mg/L.

Dans ce cadre, le CNR a testé différentes techniques sur une collection de souches reçues dans le contexte de suspicion de sensibilité diminuée et les résultats ont été présentés en communication orale au congrès de la RICAI 2016 (Dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides chez *S. aureus*. C Dupieux, L Delouere, C Bouveyron, A Martra, M Bes, A Tristan, F Vandenesch, F Laurent, O Dumitrescu). Le protocole et les résultats de cette étude sont les suivants :

<u>Matériel et méthodes</u>
Une collection de 108 souches de *S. aureus* adressées au CNR dans la période janvier 2010 à mars 2016 a été caractérisée pour la sensibilité aux glycopeptides par la technique de référence APOP. Cinq techniques de dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été évaluées : la détermination des CMI par bandelette avec gradient de concentration (E-test), la réalisation de CMI pas microdilution en barrette prête à l'emploi (MIC Strip Biocentric), le test de la macro-bandelette (E-test avec un inoculum 2McF sur gélose cœur-cervelle), le test Teico 5 (ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 mg/L de teicoplanine, par dépôt

en spot de 10 µl d'une suspension 2 McF) et le test de la bandelette en gradient enrichie pour détection de la résistance aux glycopeptides GRD (Biomérieux).

Résultats

Les performances des différents tests sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau- Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des différentes méthodes de dépistage des souches GISA et GSSA.

Méthode		***E-test 0,5 McF***	***MIC strip***	***E-Test 2 McF***	***GRD***	***Teico 5***
Critères GISA		VA ou TP >2	VA ou TP >2	VA et TP≥8 ou TP seule≥12	VA ou TP ≥ 8	≥ 4 col
Souches GISA*	VP	41	43	30	44	35
	FN	14	12	25	11	20
Souches GSSA*	VN	48	47	30	44	42
	FP	5	6	9	9	11
Sensibilité		74,5%	78,2%	54,5%	80,0%	63,6%
Spécificité		90,6%	88,7%	76,9%	83,0%	79,2%

*déterminé par APOP ; VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif ; FP : faux positif.

Conclusion

Les deux techniques de détermination des CMI, E-test et MIC Strip ont conduit à des résultats très similaires. Les performances du screening par bandelette GRD ont été supérieures à celles des tests de dépistage actuellement recommandés par le CA-SFM. Cette méthode étant moins fastidieuse et plus rapide que l'APOP, elle représente la meilleure alternative pour le dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides de *S. aureus*.

Au final, la bandelette GRD n'étant plus commercialisée, l'avis du CNR serait de proposer une simplification de la recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides en raison de sensibilité/spécificité peu satisfaisantes pour les 2 techniques de dépistage actuellement recommandées et des difficultés des laboratoires à les mettre en oeuvre. Puisque la majorité des souches confirmées GISA/hGISA par analyse de population ont une CMI vancomycine ou teicoplanine > 2mg/L les faisant catégoriser résistantes à un glycopeptide, il serait probablement plus simple et tout aussi sensible et spécifique, voire plus, de se limiter à une mesure correcte de CMI, par la technique de référence (microdilution). Le CNR a cependant conscience qu'à l'heure actuelle, peu de réactifs commerciaux sont disponibles pour cela (mais c'est aussi le cas pour les tests de dépistage actuellement proposés).

De plus, les éléments bibliographiques décrivant les facteurs de risque d'échec d'un traitement par vancomycine ou la probabilité de succès se sont principalement basés sur des mesures de CMI et pas toujours sur le caractère GISA ou hGISA démontré par analyse de population. Quelques références ci-dessous :

- Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, Alamo D, Ortega M, Lopez J, Mensa J. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46(2):193-200. doi: 10.1086/524667.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan;23(1):99-139. doi: 10.1128/CMR.00042-09.

- Patel N, Pai MP, Rodvold KA, Lomaestro B, Drusano GL, Lodise TP. Vancomycin: we can't get there from here. Clin Infect Dis. 2011 Apr 15;52(8):969-74. doi: 10.1093/cid/cir078.
- Wang JL, Lai CH, Lin HH, Chen WF, Shih YC, Hung CH. High vancomycin minimum inhibitory concentrations with heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in meticillin-resistant *S. aureus* bacteraemia patients. Int J Antimicrob Agents. 2013 Nov;42(5):390-4. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.010. Epub 2013 Aug 23.

Plusieurs de ces études ont montré le plus mauvais pronostic d'une CMI vancomycine ≥ 1,5 mg/L, que cela soit en termes de mortalité ou en termes de persistance de la bactériémie sous antibiothérapie. Une stratégie consistant à mesurer la CMI de la vancomycine et à déconseiller son utilisation lorsque celle-ci est strictement > 1mg/L permettrait i) aux laboratoires de répondre rapidement aux cliniciens un résultat pour les glycopeptides (et non d'attendre parfois la confirmation par APOP du CNR pour donner une réponse à leurs cliniciens), et ii) aux cliniciens d'envisager rapidement un changement d'antibiothérapie lors d'une bactériémie à SARM.

La proposition du CNR serait de modifier la page concernant la détermination de la sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides ainsi :

Staphylococcus aureus

Pour les utilisateurs d'automates :

Une souche de *S. aureus* vis à vis de laquelle la CMI de la teicoplanine ET de la vancomycine est ≤1mg/L peut être catégorisée sensible aux glycopeptides.

Il est recommandé de vérifier la CMI d'une souche de *S. aureus* vis avis de laquelle la CMI mesurée par un automate est > 1 mg/L pour la teicoplanine OU pour la vancomycine par la technique de référence (microdilution). Si la CMI est confirmée > 1mg/L, rendre le commentaire « Dans le cadre des bactériémies à SARM, une CMI vancomycine >1 mg/L est associée à un risque plus élevé d'échecs thérapeutiques (mortalité, persistance de la bactériémie), que la souche ait été confirmée comme GISA/hGISA ou non ». L'utilisation thérapeutique des glycopeptides est déconseillée. La souche peut être adressée dans un centre référent pour confirmation et catégorisation définitive.

Pour les utilisateurs de la méthode par diffusion en milieu gélosé :

La détermination de la sensibilité aux glycopeptides ne peut pas être réalisée par diffusion en milieu gélosé. En cas d'utilisation thérapeutique, une autre technique (microdilution) est nécessaire.

Staphylococcus non aureus

La CMI pourra être mesurée par la méthode de référence par microdilution en milieu liquide et interprétée selon les concentrations critiques définies. »

3. Annexe 3- Autres informations

Voir document joint

4. Annexe 4- 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 reconnait 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 du 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 du la personne :
Organisation :
Adresse :

Signature
Date

5. Annexe 5- 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-001-04 Version : 04 Applicable le : 01-09-2017

Hospices Civils de Lyon

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 ■

Sommaire

SOMMAIRE 2
ABREVIATIONS 4
INTRODUCTION 6
PRESENTATION DU LABORATOIRE 7
ORGANISATION DU LABORATOIRE 10
A / DEFINIR LA POLITIQUE ET L'ORGANISATION DU LBMMS (POL) 11
A1. Politique qualité et engagement de la direction 11
A2. Organisation des responsabilités 11
A3. Organisation de la qualité au LBMMS 13
A4. Communication et éthique 14
A4.1 Communication interne 14
A4.2 Communication avec les professionnels de santé 15
A4.3 Communication avec les patients 16
A4.4 Ethique 17
B / SURVEILLER ET AMELIORER LES PERFORMANCES (SMQ) 17
B1. Sous processus gestion documentaire 17
B2. Vigilances 19
B3. Satisfaction des utilisateurs 19
B4. Suivi des indicateurs 20
B5. Gestion des audits internes 20
B6. Maîtrise des non-conformités 21
B7. Gestion des actions correctives et préventives 22
C / PRE-ANALYTIQUE (PreA) 24
C1. Sous-traitance 25
D / ANALYTIQUE (ANA) 26
E / POST-ANALYTIQUE (PostA) 28
F / BIOLOGIE DELOCALISEE (EBMD) 30
G / GERER LES RESSOURCES HUMAINES (RH) 30
H / GERER LES SYSTEMES INFORMATISES (SI) 31
I / ACQUERIR ET GERER LES MATERIELS ET LES PRESTATIONS 32
I1. Maîtrise des achats 33
I2. Maîtrise des matériels, réactifs et prestations 33
I3. Sous processus Métrologie : Maîtrise des matériels, suivi métrologique 34
J / MAITRISER LES LOCAUX, L'HYGIENE, ET LA SECURITE 35
K / PROCESSUS HORS PERIMETRE D'ACCREDITATION 36
K1. Gérer le dossier administratif et la facturation 36
K2. Assurer la mise en œuvre des protocoles de recherche 36
K3. Gérer la Biothèque hors Centre de Ressources Biologiques des HCL 37
K4. Assurer des consultations d'expertises 37
K5. Former des étudiants 37
ANNEXE 1- POLITIQUE QUALITE DU LBMMS DU CHU DE LYON 38
ANNEXE 2- Corrélation NF EN ISO 15189 et Manuel Qualité 40

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-04)

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
Motif de révision : Mise à jour des processus : création d'un processus « Gestion de la métrologie » distinct du processus « Acquérir et gérer les matériels et prestations » et rattachement de la partie « Gestion documentaire » au processus « surveiller et améliorer les performances » plutôt que « Gestion des systèmes d'information » – Suppression des logigrammes de chaque processus déplacés dans les Cartes identité des processus – Introduction d'icônes pour repérer les liens vers des ressources documentaires ou outils du LBMMS	
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	

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-04)