

Rapport annuel d'activité

2021

**Centre national de référence des
Staphylocoques**

Directeur : Pr F. Vandenesch

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



**Année d'exercice
2020**

1	MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	8
2	ACTIVITES D'EXPERTISE.....	10
2.1	ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES	10
2.2	TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES.....	11
2.3	TECHNIQUES TRANSFERÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	11
2.4	COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE	11
2.5	ACTIVITES D'EXPERTISE	12
2.6	ACTIVITES DE SEQUENÇAGE	13
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE	15
3.1	DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES.....	15
3.2	SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	16
3.2.1	<i>Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique</i>	16
3.2.2	<i>Infections suppuratives à S. aureus PVL+</i>	19
3.2.3	<i>Furonculoses familiales</i>	21
3.2.4	<i>Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine</i>	21
3.2.5	<i>Intoxications alimentaires individuelles et collectives</i>	23
3.2.6	<i>Ostéites et infections ostéo-articulaires</i>	24
3.2.7	<i>Sérologies PVL et TSST-1</i>	24
3.3	SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	26
3.3.1	<i>Définition de l'échantillon de souches testées</i>	26
3.3.2	<i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	28
3.3.3	<i>Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances</i>	28
3.3.3.1	Résistance aux bêta-lactamines	28
3.3.3.2	Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides	30
3.3.3.3	Détection de la résistance au linézolide	31
3.3.3.4	Détection de la résistance à la daptomycine.....	33
3.3.3.5	Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux	34
3.3.4	<i>Analyse des tendances</i>	35
3.4	INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	35
3.5	ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	36
4	ALERTE.....	37
4.1	LA PROCEDURE D'ALERTE DE SANTE PUBLIQUE FRANCE ET DE LA DGS EN CAS DE DETECTION DE PHENOMENE ANORMAL, LES EVENEMENTS AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE AU COURS DE L'ANNEE	37
4.2	DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	37
4.2.1	<i>Épidémies de S. aureus dans plusieurs services de néonatalogie en France</i>	37
4.2.2	<i>Recherches de lien de clonalité</i>	41
4.2.3	<i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu</i>	42
4.3	ANALYSER DES TENDANCES ET LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME LORS DE L'ALERTE	42
5	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	43
5.1	CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE	43
5.1.1	<i>Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé, Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques</i>	43
5.1.2	<i>Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)</i>	43
5.1.3	<i>Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :</i>	43
5.1.4	<i>Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles),</i>	44
5.2	CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	44
5.3	CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC ...)	46
6	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	46
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	46

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.....	50
7	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	54
8	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES	54
8.1	ACTIVITES D'EXPERTISE	54
8.1.1	<i>Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer</i>	<i>54</i>
8.1.2	<i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu.....</i>	<i>54</i>
8.1.3	<i>Les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés.....</i>	<i>55</i>
8.1.4	<i>Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.....</i>	<i>55</i>
8.2	ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION.....	55
8.2.1	<i>Les projets de formation envisagés</i>	<i>55</i>
8.2.2	<i>Les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR (p.ex. création, développement d'un site internet dédié)</i>	<i>55</i>
8.2.3	<i>Les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales.....</i>	<i>55</i>
8.3	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	56
8.3.1	<i>Les projets de constitution, développement, animation de réseaux de partenaires</i>	<i>56</i>
8.3.2	<i>La contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels ..</i>	<i>56</i>
8.3.3	<i>La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux.....</i>	<i>56</i>
8.3.4	<i>Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance.....</i>	<i>56</i>
8.4	CONTRIBUTION A L'ALERTE	57
	ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	58
	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....	66
	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS (NON DESTINEES A ETRE RENDUES PUBLIQUES)	73
	ANNEXE 4 : LETTRE D'AGREMENT POUR TRANSFERT DE MATERIEL DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES STAPHYLOCOQUES.....	74
	ANNEXE 5 : SOMMAIRE DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES DU CHU DE LYON	76

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 2020 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 avec 2109 souches analysées, 164 souches et ADN distribués, avec un nombre de correspondants toujours très élevé issus de 90 départements métropolitains ou des DROM COM

- **en matière de surveillance et d'alerte**, le CNR a été moteur dans la surveillance épidémiologique des staphylocoques et des infections staphylococciques sur les points sensibles que sont :

- la détection de cas groupés et l'affirmation ou l'infirmité de la transmission grâce à l'utilisation maintenant exclusive du NGS pour l'investigation de ces cas, avec 20 épisodes ou situations épidémiques investiguées en 2020; l'extrême résolution de l'analyse génomique ayant parfois permis de conclure formellement là où les méthodes conventionnelles ne l'auraient pas pu.

- un nombre important de signalements et d'investigation de cas groupés et d'épidémies dans les services de néonatalogie impliquant principalement des souches de SARM de différentes lignées en 2020 : S1 MRSA-IV ; ST5 MRSA-I *tst* Géraldine ; ST8 MRSA-V; ST5-MRSA-IV et d'autres ... Dans certains cas ces clones semblent établis de manière endémique au sein des services et sont à l'origine de résurgence épidémiques itératives. Ce phénomène est peut-être en lien avec l'augmentation de la prématurité, les pratiques favorisant les liens physique parents-nouveau nés (peau-à-peau, banalisation des téléphone portables dans l'environnement des couveuses) et des tensions en matière de ressources en personnel dans les services de néonatalogie.

- la détection croissante de souches de staphylocoques résistantes au linézolide, particulièrement chez les staphylocoques non-*aureus*, mais avec une fréquence en augmentation chez *S. aureus*, ainsi que l'augmentation du nombre de souches résistantes à la daptomycine, à la fois chez *S. aureus* et les staphylocoques non-*aureus*,

- la surveillance de l'évolution des clones de SASM et de SARM en France où l'on note une relative décroissance des clones de SARM communautaires historiques (ST80, 12% des infections suppuratives en 2020 vs 17% en 2019 ; USA300, 8% des infections suppuratives en 2020 vs 10% en 2019) au profit d'autres clones internationaux comme le Southwest Pacific clone (19% des infections suppuratives en 2020 comme en 2019) ou de nouvelles lignées tel le CC152 PVL+ incluant des SARM et des SASM. Au sujet de cette lignée CC152-MSSA PVL, on notera qu'elle est responsable de 42% des infections de la peau et tissus mous et 36% des pneumonies à *S. aureus* PVL positive adressées au CNR en 2020. Par comparaison, cette lignée représentait seulement 20% des souches de *S. aureus* PVL-positive collectées dans le PHRC pneumonie du CNR entre 2011 et 2016. Il s'agit donc peut-être d'un pathovar émergent.

- **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 la poursuite en 2021 de l'organisation d'un contrôle de qualité à destination des CNR Européens.
- par l'organisation en 2020 d'un exercice européen d'analyse de données NGS sur la base d'un jeu de reads distribué aux participants et qu'ils avaient pour mission de traiter et d'interpréter dans le cadre d'une investigation de cas groupés

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

Contexte COVID 19. Les connaissances acquises par le CNR sur les pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de LPV survenant fréquemment dans les suites d'une infection respiratoire virale, faisaient craindre une recrudescence de ces tableaux gravissimes chez les patients atteints de SARS COV2. De manière inattendue, les surinfections à *S. aureus* PVL sont restées marginales (en 2020 30 souches reçues étiquetées COVID dont 1 PVL+ en 2020) et les surinfections documentées à *S. aureus* l'ont été dans des contextes classiques de pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez des sujets de réanimation.

Analytic Summary

Expertise, surveillance, alert, information, training and advice are the key words of the CNR missions. On this basis, the main results and highlights of the year 2020 of the CNR of staphylococci are the following

- **in terms of expertise**, the CNR has continued its expertise activity at a very steady pace with 2109 strains analyzed, 164 strains and DNA distributed, with a still very high number of correspondents from 90 metropolitan departments or DROM COM

- **in terms of surveillance and alert**, the CNR has been a driving force in the epidemiological surveillance of staphylococci and staphylococcal infections in the following sensitive areas

- the detection of clustered cases and the confirmation or denial of transmission thanks to the now exclusive use of NGS for the investigation of these cases, with 20 episodes or epidemic situations investigated in 2020; the extreme resolution of genomic analysis has sometimes allowed formal conclusions to be drawn where conventional methods could not.

- A significant number of reports and investigations of clustered cases and epidemics in neonatal wards involving mainly MRSA strains of different lineages in 2020: S1 MRSA-IV; ST5 MRSA-I *tst* Géraldine; ST8 MRSA-V; ST5-MRSA-IV and others ... In some cases, these clones seem to be endemically established within the wards and are the cause of iterative epidemic resurgence. This phenomenon may be related to the increase in prematurity, practices favoring physical links between parents and newborns (skin-to-skin contact, commonplace use of mobile telephones in the incubator environment) and tensions in terms of personnel resources in neonatology departments.

- the increasing detection of linezolid-resistant strains of staphylococci, particularly in non-*aureus* staphylococci, but with an increasing frequency in *S. aureus*, as well as the increase in the number of daptomycin-resistant strains in both *S. aureus* and non-*aureus* staphylococci

- monitoring of the evolution of MRSA clones in France, where we note a relative decrease in historical community MRSA clones (ST80, 12% of suppurative infections in 2020 vs. 17% in 2019; USA300, 8% of suppurative infections in 2020 vs. 10% in 2019) to the benefit of other international clones such as the Southwest Pacific clone (19% of suppurative infections in 2020 as in 2019) or new lineages such as CC152 PVL+ including MRSA and MRSA. Regarding this CC152-MSSA PVL lineage, it should be noted that it is responsible for 42% of skin and soft tissue infections and 36% of PVL-positive *S. aureus* pneumonia referred to the CNR in 2020. By comparison, this lineage represented only 20% of the PVL-positive *S. aureus* strains collected in the CNR's pneumonia PHRC between 2011 and 2016. It may therefore be an emerging pathovar.

- **In terms of advice, training, information and scientific animation**, in addition to their participation in various epidemic management cells, the CNR has continued its knowledge dissemination activity:

- by the continuation in 2021 of the organization of a quality control for the European NCRCs.
- by the organization in 2020 of a European NGS data analysis exercise based on a set of reads distributed to the participants and which they had to process and interpret in the context of a cluster case investigation

- Finally, the CNR is participating in an integrated "**bed to bench & bench to bed**" research associated with our INSERM research team on staphylococci. A significant number of scientific articles directly related to the CNR activity have been published, as well as more fundamental articles with potential spin-offs in Health.

COVID 19 context. The knowledge acquired by the CNR on necrotizing pneumonia caused by PVL-producing *S. aureus*, which frequently occurs after a viral respiratory infection, led to fears of a resurgence of these extremely serious cases in patients with COV2 SARS. Unexpectedly, *S. aureus* PVL superinfections remained marginal (in 2020, 30 strains were received labeled COVID, including 1 PVL+ in 2020) and the documented *S. aureus* superinfections were in classic contexts of pneumonia acquired under mechanical ventilation in resuscitation subjects.

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).

Contexte COVID-19 : la crise du COVID a mobilisé l'ensemble des acteurs de la biologie, incluant ceux du CNR. Ainsi, Frédéric Laurent a été responsable en 2020-21 de la mise en place et fonctionnement du centre de prélèvements à visée diagnostic COVID organisé par la ville et les Hôpitaux de Lyon. Par ailleurs, les techniciens du CNR ont participé à la prise en charge des prélèvements Covid sur la période de mars à septembre 2020, du lundi au dimanche de 7h30 à 20h45 jusqu'à 20% de participation par mois. Ils ont occupé les postes d'enregistrement au sein du RTE et les postes de prétraitement des prélèvements COVID (Dépistage analytique rapide et préparation/traitement du prélèvement avant la réalisation du test PCR) avec les équipes de virologie. A noter aussi leur implication à hauteur de 5 jours par mois en août et septembre 2020 dans la réalisation des tests nasopharyngés auprès de la population dans les centres de prélèvements des HCL. A ce jour, occasionnellement, en période de sous-effectif, le CNR continue d'aider à la réalisation des tests nasopharyngés

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
Camille Kolenda AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : camille.kolenda@chu-lyon.fr
Michèle Bes Biologiste contractuel-IAI	E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Gérard Lina PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr
Jérôme Etienne PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : jerome.etienne@univ-lyon1.fr

2. Secteur résistance

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

3. Secteur sérologie

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

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

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

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

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

Le CNR est désormais accrédité pour la recherche des gènes codant les facteurs de virulence et de certains gènes de résistance (*mec*).

L'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici fin 2021 et notamment le NGS.

Cf Annexe 1.

2 Activités d'expertise

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

Les souches de *S. aureus* reçues au CNR pour recherche de toxines ont actuellement expertisées avec une technique de puces à ADN. A partir de 2020, la recherche de toxines est effectuée par PCR multiplex avec assignement à un complexe clonal grâce au *spa-typing* et au séquençage plus systématique des souches d'intérêt.

Pour les recherches de liens de clonalité, en fonction des espèces de staphylocoques, l'expertise est effectuée avec 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 en 2020 d'un automate permettant de disposer de résultats de CMI vraies (Plaques Sensititre® (Thermo Scientific™)). Cette technique avec lecture automatisée a fait l'objet d'une évaluation favorable en 2017-2018.

Éléments clés en termes de production d'expertise :

- 2109 souches reçues
- 90 départements métropolitains ou DROM COM,
- Expertise virulence -> PCR multiplex, séquençage
- Expertise clonalité -> séquençage
- Expertise résistance -> Antibiogramme par diffusion +/- sensititre +/- 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)

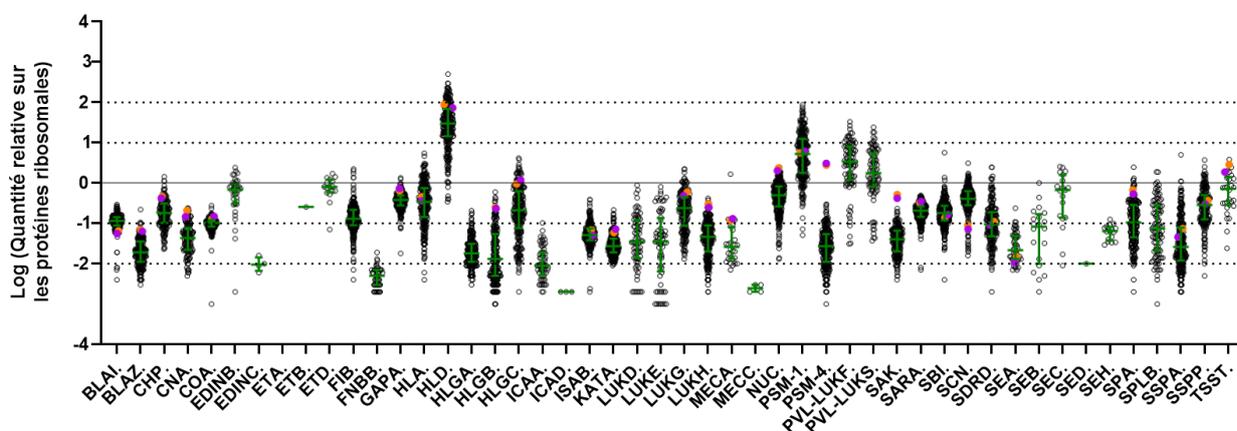
Cette activité en plein développement est détaillée au chapitre 2.6.

Protéomique

Dans le cadre du RHU-IDBIORIV porté par F.Vandenesch en collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon UMR CNRS 5280 (Jérôme Lemoine), le CNR développe actuellement une méthode de protéomique haut débit¹ ciblant les principaux facteurs de virulence et régulateurs globaux en vue de déterminer l'expression de ces facteurs dans les souches cliniques. A terme, cette approche permettra de sélectionner de nouveaux biomarqueurs et de développer éventuellement des tests rapides d'identification des pathovars. Les premiers résultats issus de l'analyse de 300 souches de bactériémies et de pneumonies communautaires révèlent une très grande variabilité des niveaux d'expression des facteurs de virulence, aussi bien ceux du génome cœur que ceux codés dans le génome accessoire. Ainsi, par exemple, les phenol soluble modulines, la delta toxine, l'hémolysine alpha, la PVL et les autres toxines à deux composants, présentent une variabilité d'expression au moins d'un facteur

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

100 selon les souches. La technique devrait être transposée dans l'analyse des souches de routine du CNR au cours de l'année 2021-22.



Détermination de la résistance aux antibiotiques (Sensititre®)

Conformément aux recommandations des comités de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et européenne (EUCAST), le CNR adapte ses méthodes de détermination de la sensibilité des Staphylocoques aux antibiotiques en complétant les méthodes actuellement utilisées (Vitek2®, diffusion et e-tests®) par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide. Dans cette perspective, le CNR a évalué depuis plusieurs années le système Sensititre® (Thermo Scientific™) comprenant des plaques de 96 puits contenant des gammes d'antibiotiques lyophilisés, un enseigneur automatisé, un lecteur optique (Sensititre™ Vizion™), et un système informatique d'interprétation et gestion des résultats. Au vu des résultats de cette évaluation, des panels d'antibiotiques disponibles et de leurs tarifs, ainsi que de l'évolution des recommandations du CA-SFM/EUCAST, le CNR a développé courant 2020 avec Thermo Scientific une plaque designée à façon pour l'activité d'expertise du CNR. Il basculera vers ce système de réalisation des antibiogrammes au cours du deuxième trimestre 2021. En raison d'un coût unitaire plus élevé que l'antibiogramme actuellement réalisé, la détermination des CMI par ce système sera ciblée sur un nombre plus limité de souches (celles reçues pour expertise de la résistance aux antibiotiques uniquement) et non sur l'ensemble des souches reçues comme actuellement.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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 2019, nous avons notamment transmis à plusieurs laboratoires les protocoles PCR et les souches contrôles permettant l'identification des souches de SARM portant le gène *mecC* et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine.

2.4 Collections de matériel biologique

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

En 2020, le CNR a reçu **2109** souches pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles (Cf paragraphe 2.5) et **164** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

En 2020, nous avons envoyé 321 souches ou ADN à nos correspondants en France et à l'étranger.

Cf *Annexe 1*.

2.5 Activités d'expertise

Entre 2006 et 2020, le CNR a reçu **33184** souches de staphylocoques pour expertise (Figure 1) avec une augmentation constante du nombre de souches reçues pour expertise. (A noter les pics en 2011 et 2015 qui correspondent aux nombreuses souches reçues au CNR dans le cadre de différents protocoles).



Figure 1- Évolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2020.

En 2020, le CNR a reçu **2109** souches pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles. Ces souches provenaient de **90** départements métropolitains ou des DROM COM. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 28 % (Auvergne Rhône-Alpes), 18 % (Ile de France), 9 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (cf. Figure 2). Cinq pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco.

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 PCR multiplex/*spa*-typing ou par séquençage.

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

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

En 2020, nous avons reçu **164** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

2.6 Activités de séquençage

Au cours de l'année de 2020, 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.

L'augmentation de l'activité de NGS s'est manifestée par une évolution de séquençage de manière ponctuelle (investigation d'épidémies, analyse de phénotypes particuliers de virulence ou de résistance) à un séquençage systématique depuis janvier 2020 des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline ou productrices de toxine PVL. Le but était de constituer une base de données de génomes pertinente pour le CNR, en vue d'un changement de technique (actuellement PCR multiplex) et de l'accréditation du NGS pour le rendu de la caractérisation des facteurs de virulence de *S. aureus*.

Cette montée en puissance de notre activité est organisée par une ingénieure hospitalière bio-informaticienne du CNR en coordination avec l'équipe de biologistes.

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

- Si OUI :

Type d'accès (interne ou externe au CNR) : plateforme NGS interne des Hospices Civils de Lyon

Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : séquenceurs Illumina Miseq et NextSeq, pipeteur/distributeur SPTLabtech Mosquito

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

- Si OUI :

Type d'accès (interne ou externe au CNR) : interne

Outils utilisés pour l'analyse des séquences : le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines.

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

- Si OUI, pour quelles activités :

Investigations d'épidémies : OUI (Cf paragraphe alerte 4)

Surveillance : OUI (Cf paragraphe surveillance 3)

- 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 analyses bio-informatiques comprennent les étapes suivantes :

Concernant les analyses bio-informatiques, le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines maison.

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

- Assignement des souches séquencées à un profil MLST (les systèmes MLST publiques des espèces : *S. aureus*, *S. epidermidis* en utilisant le logiciel Abricate⁴ et les bases MLST publiques à jour (<http://www.pubmlst.org>),

- Recherche de variants et construction d'arbres phylogénétiques en utilisant une souche de référence adaptée

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

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

⁴ Seemann T, *Abricate*, [Github](https://github.com/tseemann/abricate) <https://github.com/tseemann/abricate> with the Resfinder – [doi:10.1093/jac/dks261](https://doi.org/10.1093/jac/dks261) database.

au complexe clonal étudié et les logiciels Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>), fasttree (reconstruction de phylogénies)⁵, et gubbins (détection d'événements de recombinaison)⁶, IGV⁷.

- Détermination in silico des profils de résistance (DB Refinder⁸), virulence (DBs internes : typage agr, typage entérotoxines, typage leukocidines (inclus la PVL), typage capsule et typage d'autres gènes associé à la virulence comme scn, chp, scn, hlb, etc) en utilisant le logiciel Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>);

- Analyses de génomique comparative en utilisant un workflow d'assemblage : SPAdes v3.14⁹ et Quast v4.5¹⁰, suivi des alignements multiples de génomes¹¹

- 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 (ref 12 = ancienne ref 5) et IGV.

- **Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies** : nombre de séquences réalisées dans l'année. En 2020, 138 souches ont été séquencées dans le cas d'investigation d'épidémies ou de cas groupés. (Cf paragraphe 4.2.1)

- **Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance** : nombre de séquences réalisées dans l'année et modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées.

Nous avons séquencé de manière systématique toutes les souches de *S. aureus* productrices de toxine PVL et/ou résistantes à la méticilline (n=615 souches).

Par ailleurs, dans le cadre de la pandémie COVID-19, nous avons séquencé les souches isolées de prélèvements respiratoires de patients infectés par le SARS-CoV-2 (n= 30 souches) (cf paragraphe 3.2.4).

- **Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files)** :

- Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales) : Oui en première intention

- Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans métadonnées associées. Les séquences deviennent publiques, via des bases de données publiques (ENA ou NCBI), quand elles sont associées à la publication d'articles scientifiques. Dans ces cas, des métadonnées utilisées dans les articles sont aussi associées aux séquences.

⁵ Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. PLOS ONE 5(3): e9490.

⁶ Croucher N. J., Page A. J., Connor T. R., Delaney A. J., Keane J. A., Bentley S. D., Parkhill J., Harris S.R. "Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins". doi:10.1093/nar/gku1196, Nucleic Acids Research, 2014.

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

⁸ Zankari E et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67, 2640–2644.

⁹ 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.

¹⁰ Alexey G et al. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, Bioinformatics, 29 (8), 1072-1075.

¹¹ Darling AE et al. (2010). progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS one 5 (6), e11147.

3 Activités de surveillance

Éléments clefs en termes de surveillance :

- Stabilité du nombre de souches d'infections suppuratives avec un fort taux de PVL (>70%, 97.2% dans les infections primitives)
- Poursuite de l'émergence des CC152 MSSA PVL.
- Stabilité du nombre élevé de souches de staphylocoques résistantes au linézolide reçues
- Stabilité du nombre élevé de demande de détermination de la sensibilité à la daptomycine et la dalbavancine

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 2019 notamment pour l'expertise résistance.

En 2020, le CNR a reçu **2109 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 **90 départements métropolitains ou des DROM-COM**. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 28 % (Auvergne Rhône-Alpes), 18 % (Ile de France), 9 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (cf. Figure 2). Cinq pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco.

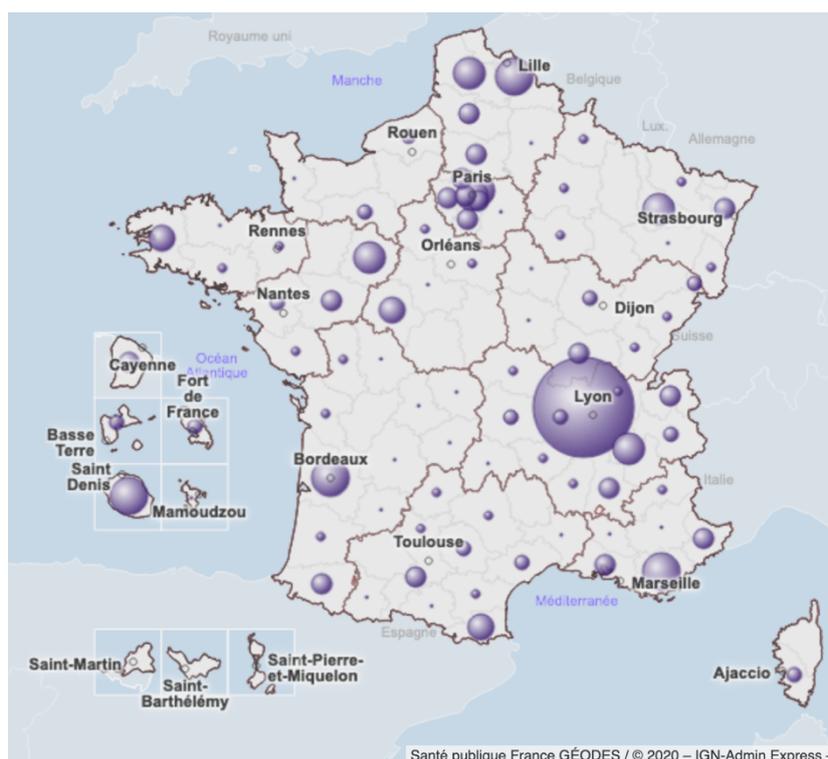


Figure 2- Répartition géographique des souches reçues en 2020 pour expertise (identification, recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques)

Nous avons reçu **164 souches** pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé 923 souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et 60 souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

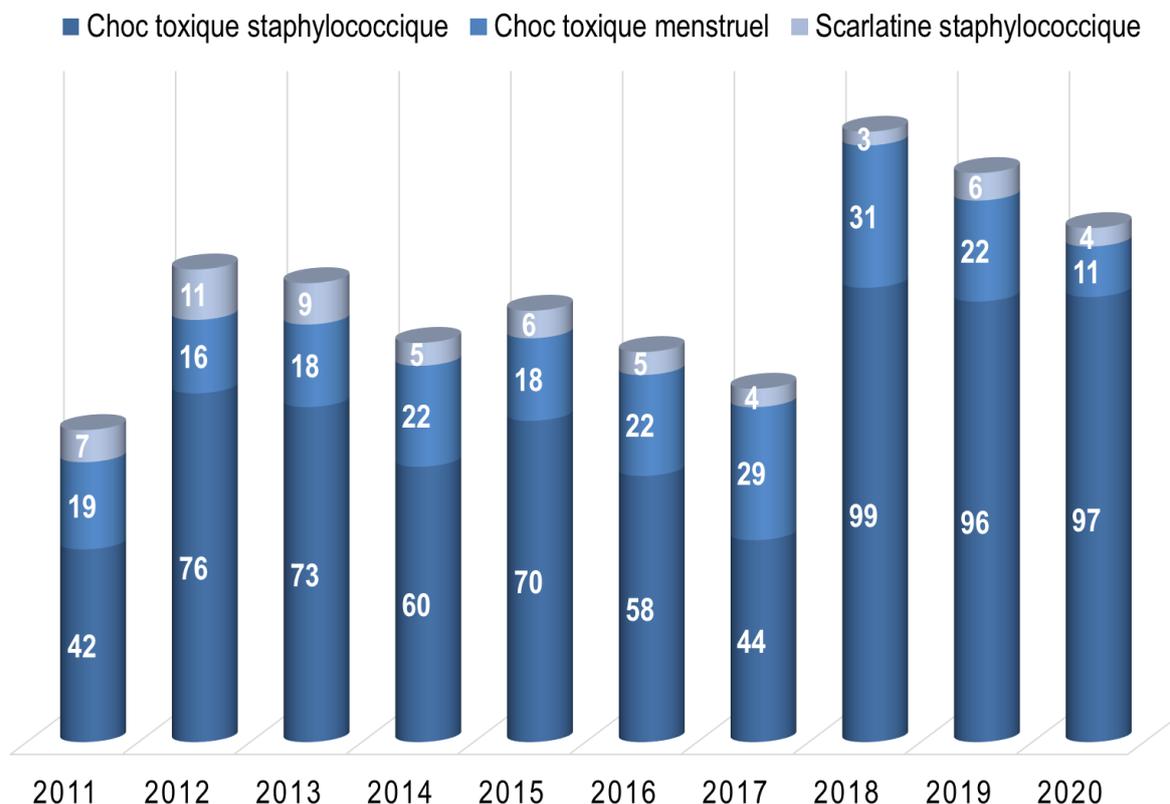


Figure 3- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2011 et 2020.

En 2020, 108 souches ont été reçues au CNR dans le cadre de CTS ont été rapportés, dont 11 cas de CTS menstruels.

Concernant les cas de **chocs toxiques menstruels**, 11 souches ont été reçues au CNR en 2020. L'âge des patientes s'étend de 13 à 42 ans avec une médiane de 24 ans. La totalité de ces souches possédaient la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Le complexe clonal CC30-MSSA a été majoritairement retrouvé (10/11 souches soit 91%), clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. L'unique souche restante appartenait au complexe clonal CC22-MSSA. Aucune souche de SARM n'est retrouvée.

Lors de la transmission des résultats à ses prescripteurs, le CNR œuvre pour rappeler les données épidémiologiques à sa disposition, ainsi que les éléments de prévention, y compris par la réalisation de sérologie anti-TSST-1 visant à évaluer le risque de récurrence. Sur 6 sérologies anti-TSST-1 réalisées dans le cadre d'un CTS menstruel, 5 (83%) révélaient l'absence d'anticorps anti-TSST-1. Il a été rappelé aux prescripteurs que cette absence de séroconversion est associée à un risque accru de récurrence de CTS menstruel et doit conduire à la contre-indication du port de tampons ou coupelles périodiques.

En France, la surveillance des CTS repose sur les données recueillies par le CNR des staphylocoques. Tous les cas de CTS recensés au CNR sont le fait de déclarations spontanées des cliniciens ou des microbiologistes à des fins diagnostiques ou épidémiologiques. Ainsi, depuis que le CNR des staphylocoques recense ces cas, on note une

stabilisation du nombre de cas à une vingtaine par an mais en l'absence de déclaration obligatoire il n'est pas possible de connaître la véritable prévalence de cette pathologie en France (Figure 4). On note cependant une légère diminution du nombre de souches reçues au CNR en 2020. Cependant dans le contexte pandémique particulier de l'année 2020, cette diminution peut être liée à un manque d'envoi des souches au CNR plutôt que d'une vraie diminution de la prévalence de cette pathologie.

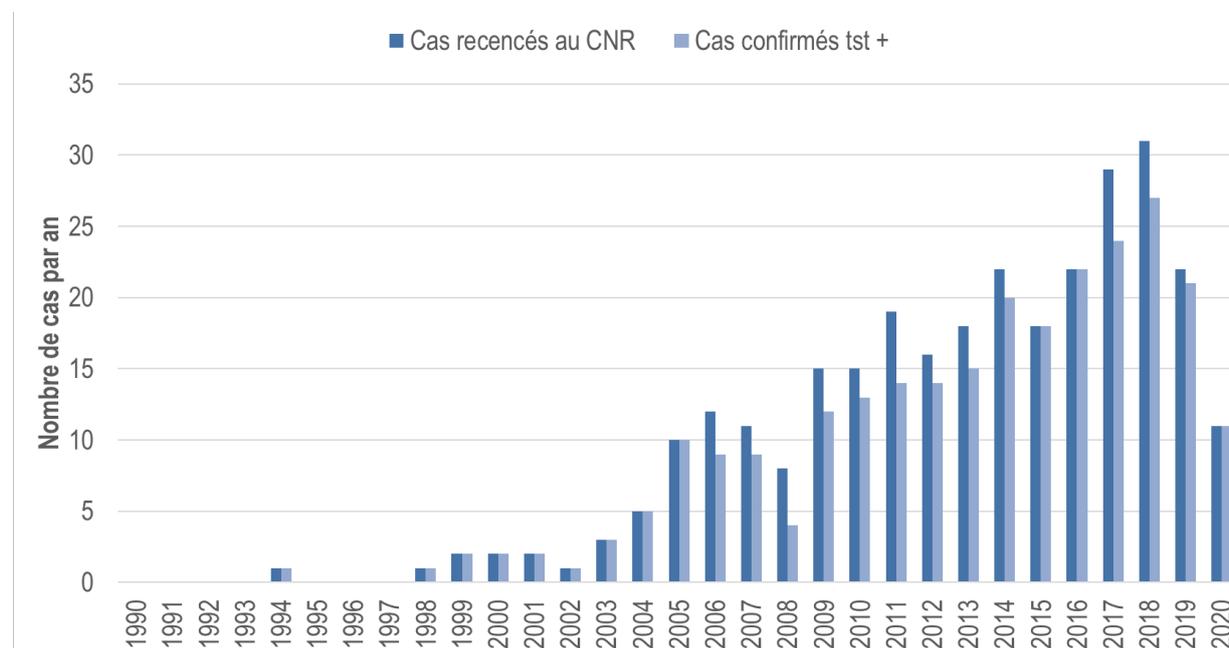


Figure 4- Évolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle (CTS menstruel) entre 1990 et 2020. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tst-1*.

Concernant les **chocs toxiques non menstruels**, le CNR a reçu 97 souches durant l'année 2020, toutes associées à des chocs 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 85 ans avec une médiane d'âge de 38 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1,6. Parmi ces 97 souches, 2 souches se sont avérées être des souches de *Staphylococcus argenteus* (expertisée pour la même patiente) et ne possédaient pas la toxine TSST-1 mais la PVL. Une souche de *S. pasteurii* a également été expertisée dans le cadre d'un choc septique gravissime mais sans qu'aucun facteur de virulence imputable ne soit détecté.

Sur l'ensemble des 96 souches de *S. aureus* et *S. argenteus*, l'analyse de l'équipement toxinique a mis en évidence :

- 39,6% (n = 38) de souches possédant au moins le gène codant la TSST-1 ;
- 28,1% (n = 27) de souches négatives pour le gène codant la TSST-1 mais possédant au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB, SEC ou SEP) ;
- 31,3% (n = 30) de souches ne possédant aucun superantigène majeur ;
- 9,4% (n = 9) de souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine.

La majorité des souches étaient sensibles à la méticilline (90%). Parmi les clones retrouvés parmi les souches de SASM, le complexe CC30-MSSA reste majoritaire (31% des souches) suivi des clones CC8, CC45 et CC398.

Les 10 souches de SARM appartenaient aux clones suivants : clone « Lyon » (CC8-MRSA-IV; clone nosocomial diffusant en France), clone « Géraldine » (CC5-MRSA), clones CC22, CC152, CC45, CC30, CC59 ou ST72, sans clone dominant.

En 2020, 4 cas (ou suspicion) de **scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients, était compris entre 2 et 20 ans avec une médiane à 2 ans. Toutes ces souches possédaient au moins un gène codant un superantigène (TSST-1, SEA, SEB, SEC). Une souche possédait également le gène codant la leucocidine de Panton-Valentine. Parmi ces souches on compte 1 CC5-MRSA clone « Géraldine », 1 CC45-MSSA, 1 CC15 et 1 CC22-MSSA.

4. Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé au total **627 souches** isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **196 cas de maladie exfoliante généralisée** (*staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) ou de *mild* SSSS et **432 cas d'impétigo bulleux** (Figure 5).

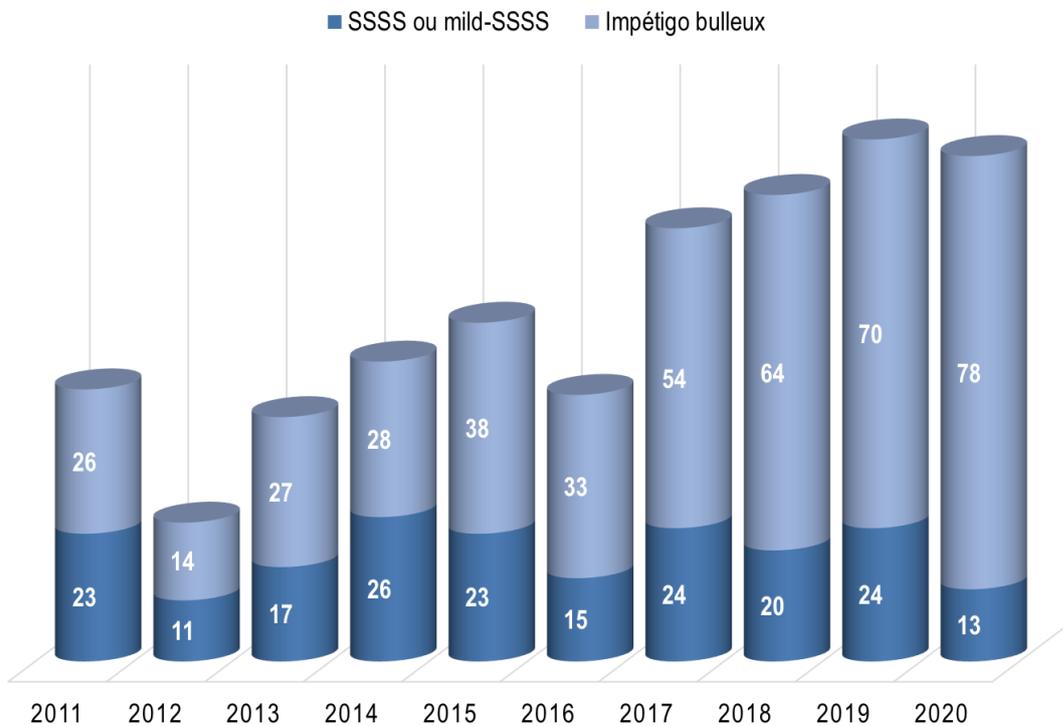


Figure 5- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2011 et 2020.

En 2020, le CNR a analysé 114 souches de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont 13 cas de maladie exfoliante généralisée, 78 cas d'impétigo bulleux et 23 souches de portage dans le cadre d'une épidémie de SSSS au sein d'un service de réanimation. On constate donc encore une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR dans le cadre d'impétigo bulleux par rapport à l'année précédente ; tandis que le nombre de souches associés aux syndromes d'exfoliation généralisée diminue légèrement.

En 2020, pour les 13 cas de patients ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique classique, l'âge s'étend de zéro à 94 ans avec une médiane à 1 an tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 0,83. Les profils toxiques révélèrent :

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

Trois cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes (âgés de 23 à 94 ans).

Parmi les 13 souches associées aux cas de maladie exfoliante généralisée, aucun SARM n'a été retrouvé.

En 2020, l'âge des 78 patients ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de 0 à 93 ans avec une médiane de 8 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 0,93. L'analyse du profil toxinique de ces 78 souches a permis de révéler :

- 12 souches possédant les gènes codant ETA et ETB,
- 20 souches pourvues de l'ETA seule,
- 3 souches possédant l'ETB seule.

Parmi les 78 souches associées aux cas d'impétigo bulleux, 6 souches de SARM ont été retrouvées.

A noter, l'expertise du CNR a été requise dans deux suspicions d'épidémies de syndrome d'exfoliation.

La première épidémie concernait 5 patients d'une unité de réanimation néonatale ayant présenté des impétigos bulleux localisé. L'analyse des souches par séquençage du génome complet a permis de montrer que 4 d'entre elles présentaient un lien de clonalité, suggérant une transmission croisée entre ces 4 enfants. La dernière souche ne présentait aucun lien de clonalité avec les 4 autres.

La deuxième épidémie concernant une suspicion d'épidémie de SSSS au sein d'une maternité. L'analyse a porté sur 24 souches dont 23 étant des souches de portage du personnel soignant de la maternité et une seule souche provenant d'un prélèvement cutané d'un enfant avait pu être recueillie. La souche d'infection possédait bien les gènes codant l'exfoliatine A. Cependant aucune souche isolée du personnel soignant ne possédait les exfoliatines A et B. Devant l'absence d'autres souches d'infection des enfants atteints de staphylococcie bulleuse, il ne nous a pas été possible de conclure sur le lien épidémiologique des souches impliquées dans la pathologie observée au sein de la maternité.

3.2.2 Infections suppuratives à *S. aureus* PVL+

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

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

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

Nous recevons, depuis 2011, de nombreuses souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 6). En 2020, on constate une **stabilisation** du nombre de souches reçues en raison de l'efficacité de notre prestation de conseil sur l'intérêt des prescriptions. En effet, **le CNR ne préconise pas** de lui faire parvenir des souches de surinfection ou de colonisation d'escarre-ulcère car l'habillage toxinique de ces souches est généralement non contributif et n'entraîne pas de modification de la prise en charge des patients en l'absence d'autres signes cliniques associés.

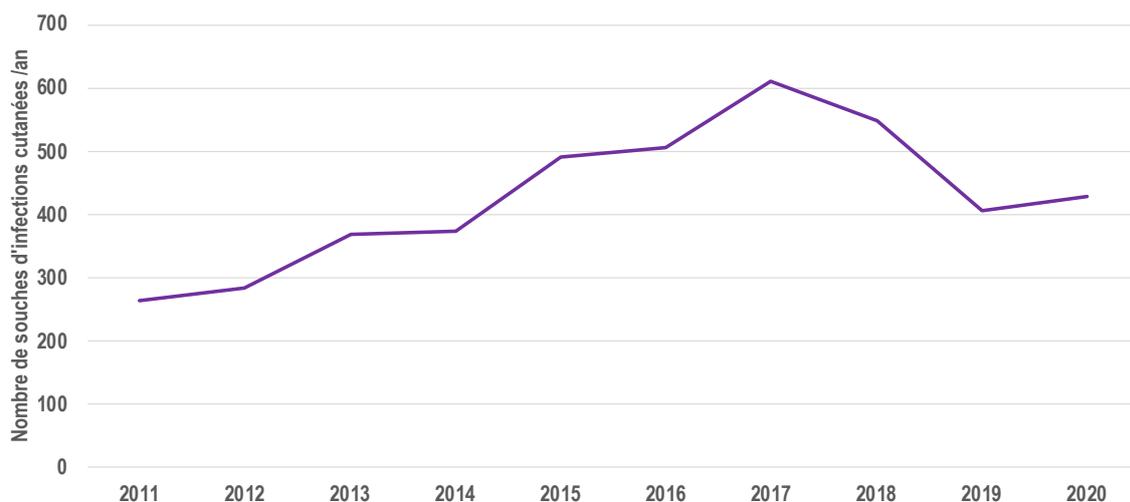


Figure 6- Évolution du nombre de souches reçues dans le cadre d'infections suppuratives (hors épidémies).

Ainsi en 2020, nous avons expertisé **429 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, dermo-hypodermite...) hors épidémies. La **proportion de souches PVL+** est de **76%** au total mais de **97,2%** lorsque l'on ne considère que les infections primitives (Figure 7).

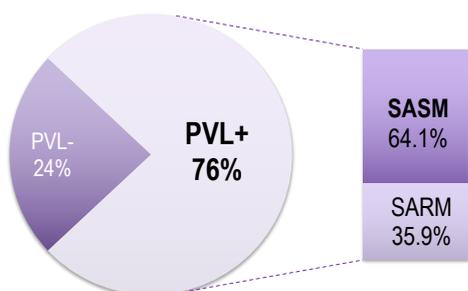


Figure 7- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2020 (n=429).

Parmi les souches PVL+ :

(i) **64,1 % sont des SASM** (Figure 7). On note une grande diversité des clones de SASM PVL. Le clone majoritaire est le **clone CC152-MSSA** (Figure 8a). Nous observons depuis 2013 une augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal. Il n'était qu'en quatrième position en 2013 et représentait moins de 11% des souches de SASM PVL+ alors qu'en 2019, il est en première position et représente 42% des souches de SASM PVL+ responsables d'infections suppuratives.

(ii) **35,9 % sont des SARM** (Figure 7). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés. En 2020, comme en 2019, le clone ST80 (*agr3*, PVL+, *mecA*+) n'est plus le clone de SARM PVL+ le plus prévalent en France. Il représente 12% en 2019 des SARM PVL+ isolés d'infections suppuratives contre 19% en 2019 et 25% en 2018. Nous observons toujours des cas d'infections avec le clone d'origine Nord-américaine et à diffusion mondiale : le clone USA300 (*agr1*, PVL+, *mecA*+) mais sa prévalence tend à diminuer (Figure 8b). Ces observations de terrain sont en accord avec les modèles bayésiens qui prédisent une stabilité, voire une diminution de la démographie de ces deux clones (Stegger, Mbio 2014, Glaser Mbio 2016).

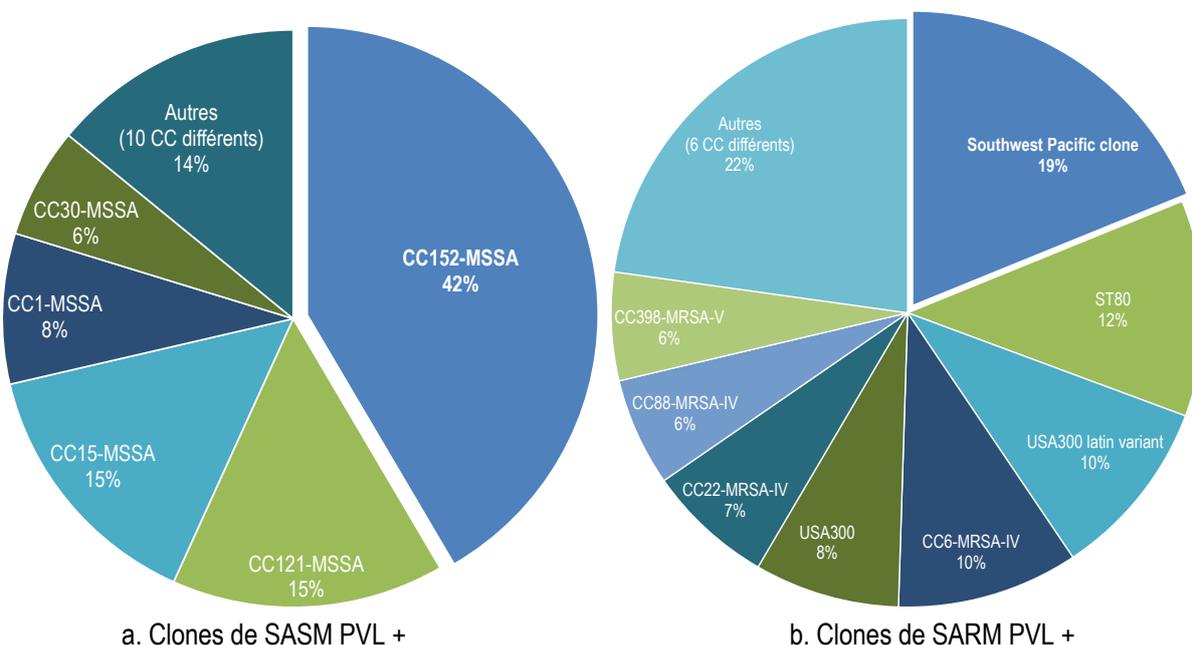


Figure 8- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ (SASM et SARM) responsables d'infections suppuratives en 2020

La proportion relativement faible (8%) du clone USA 300 au sein des souches de SARM isolées d'infections cutanées suppuratives est en accord avec les observations de l'étude Européenne initiée par le CNR français établissant la prévalence des SARM et notamment celle des clones communautaires dans les infections cutanées sévères des patients admis dans les services d'urgence (Bouchiat, JAC 2017) .

Il convient de poursuivre la **surveillance du clone CC152-MSSA PVL+**. En effet, ce complexe clonal reste le plus prévalent en 2020, 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 épidémiologie.

3.2.3 Furonculoses familiales

En 2020, 15 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)), 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 2020.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu 50 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.

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

Sur l'année 2020, 197 souches de *S. aureus* ont été envoyées au CNR dans des contextes de pneumopathies et/ou d'abcès pulmonaires. Parmi ces souches, 33 (16,7%) étaient sécrétrices de PVL contrairement aux 26,3% de 2019 tandis que la majorité des souches ne produisaient pas ce facteur de virulence. Contrairement aux années précédentes, il n'y a pas eu d'épidémie de grippe cet hiver.

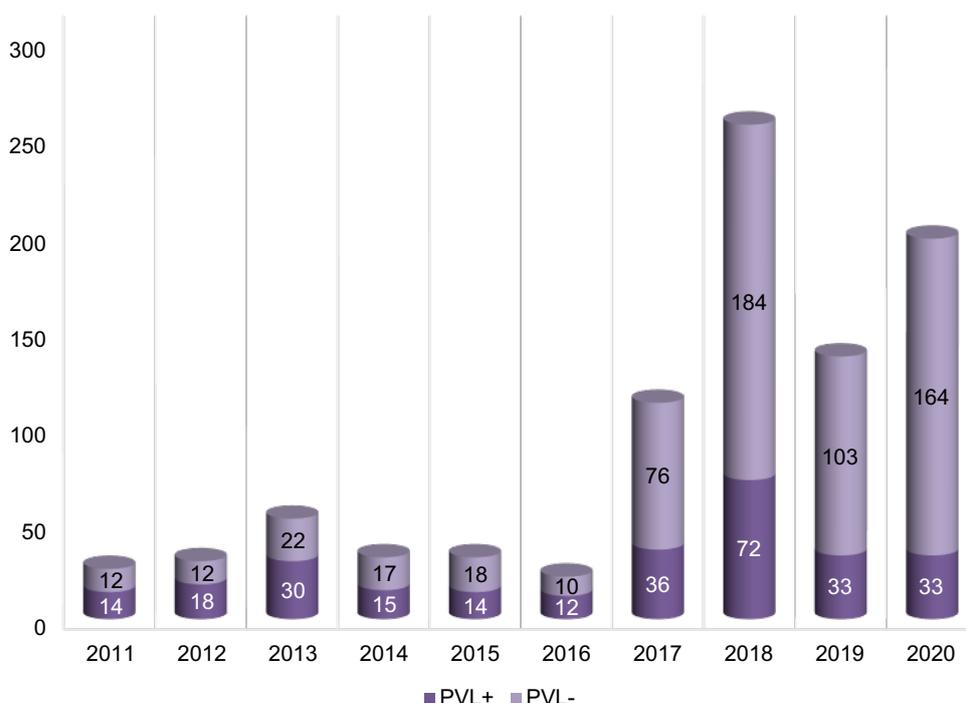


Figure 9- Nombre de cas de pneumonies à *S. aureus* produisant ou non la PVL confirmés pendant la période 2016-2020.

La proportion de SARM est plus élevée chez les souches produisant la PVL (24,2%) par rapport à celles ne la produisant pas (17,1%) (Figure 10).

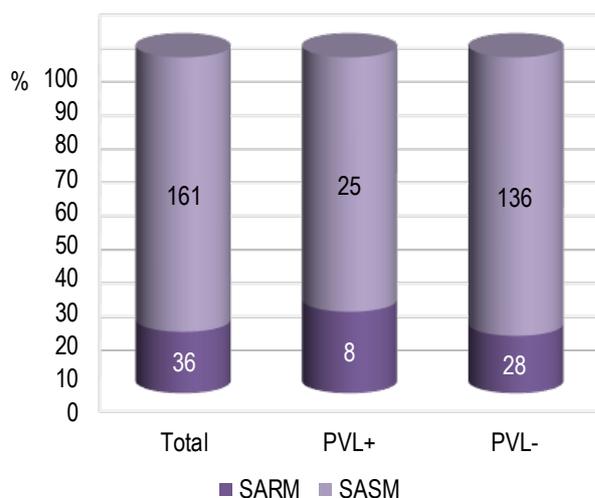


Figure 10- Proportion de SARM et de SASM au sein des souches sécrétrices ou non de la leucocidine de Pantone Valentine, parmi les souches isolées dans un contexte de pneumonie en 2020.

Concernant les clones de *S. aureus* impliqués dans les pathologies PVL+, le clone de SASM 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). Concernant les clones de SARM produisant la leucocidine de Pantone Valentine, les clones diffusants actuellement sont retrouvés tels que le clone USA300 et son variant (spanish ou latin variant). Il faut noter qu'il n'y a eu que 8 souches de SARM PVL+ responsables de pneumonies reçues en 2020 au CNR.

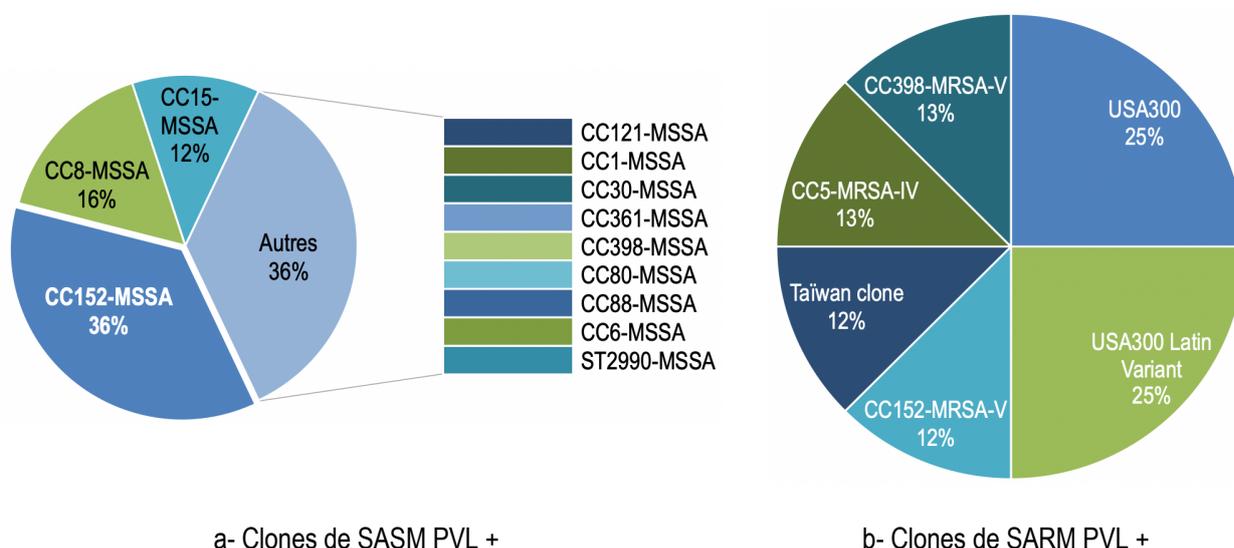


Figure 11- Caractéristiques des clones de SASM et SARM PVL + responsables de pneumonies en 2020.

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, CC30 pour les SASM et les grands clones nosocomiaux diffusant en France pour les SARM comme le clone Lyon (Figure 12).

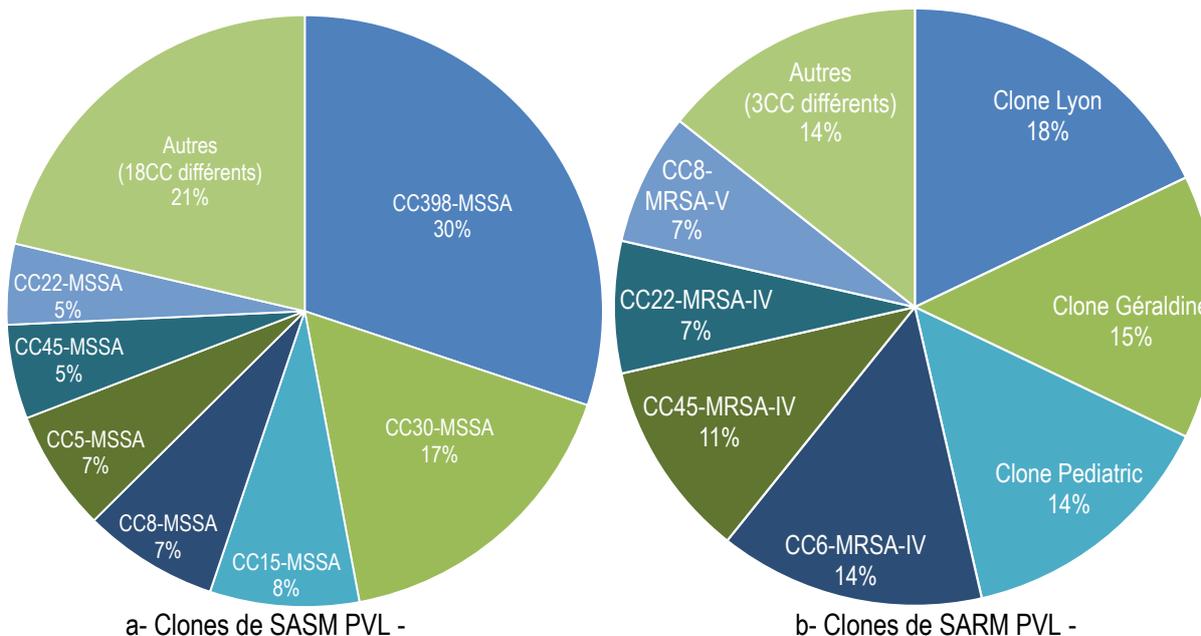


Figure 12- Caractéristiques des clones de SASM et SARM ne produisant pas la PVL et responsables de pneumonies en 2020.

Contexte COVID 19. Les connaissances acquises par le CNR sur les pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de PVL survenant fréquemment dans les suites d'une infection respiratoire virale, faisaient craindre une recrudescence de ces tableaux gravissimes chez les patients atteints de SARS-CoV-2. De manière inattendue, les surinfections à *S. aureus* PVL sont restées marginales et les surinfections documentées à *S. aureus* l'ont été dans des contextes classiques de pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez des sujets de réanimation. En effet, dans ce contexte, le CNR a reçu en 2020, 30 souches de *S. aureus* isolées de prélèvements respiratoires de patients infectés par le SARS-CoV2. Ces souches ont été séquencées en parallèle de la recherche de toxine PVL pour analyser la répartition des différents fonds génétiques.

Les analyses ont permis d'identifier :

- 25 souches de SASM et 5 souches SARM avec une grande diversité des complexes clonaux identifiés. En effet, les complexes clonaux les plus fréquemment identifiés correspondent à des clones de SASM très fréquemment retrouvés en portage ou dans d'autres types d'infections dans la population générale (CC398-MSSA, n=7; CC15-MSSA, n=6 ; CC8-MSSA, n=3). De même, les souches de SARM appartenaient à des complexes clonaux différents (CC5-MRSA-IV, CC5-MRSA-VI, CC6-MRSA-IV, CC8-MRSA-IV, CC398-MRSA-V)
- 1 seule souche productrice de toxine PVL (CC398-MRSA-V)

Ces résultats suggèrent que la production de PVL ne semble pas associée à la gravité des infections par le SARS-CoV2 en cas de co-infection par *S. aureus* et que ces co-infections ne sont pas associées à certains clones particuliers de *S. aureus*.

3.2.5 Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Dans le cadre de ses missions, le CNR participe à l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives. En 2020, le CNR n'a pas été contacté dans le cadre de TIAC.

3.2.6 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2011, nous avons expertisé **824 souches d'infections** ostéo-articulaires (exclus les « pieds diabétiques » sans ostéite). En 2020, nous n'avons reçu que 90 souches de *S. aureus* et 3 souches de *S. argenteus*, isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire (Figure 13) pour recherche de facteurs de virulence.

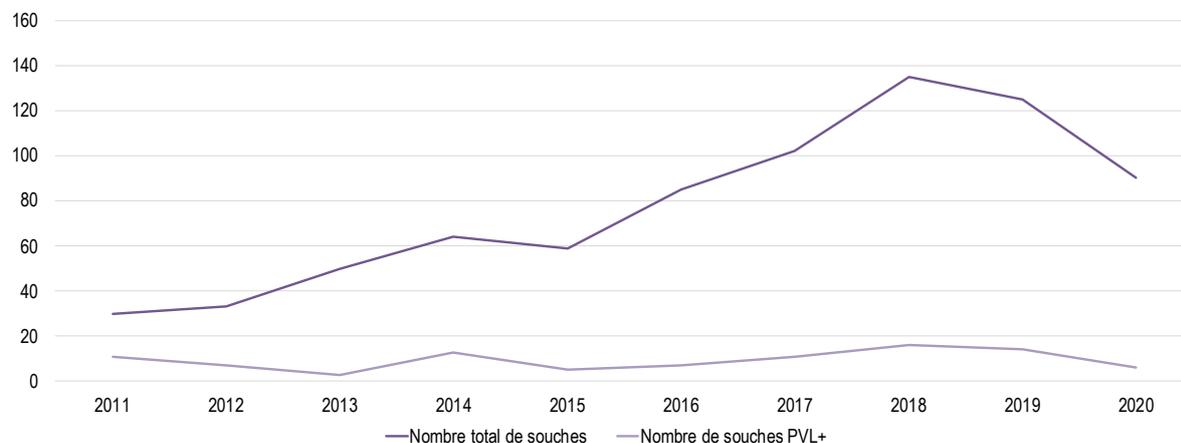


Figure 13- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour infections ostéo-articulaires entre 2011 et 2020.

Les patients étant âgés de 0,07 à 89,5 ans (médiane d'âge 51 ans) avec un sexe ratio ♂/♀ de 2,4. Parmi les souches de *S. aureus*, sept seulement étaient des SARM (Figure 14).

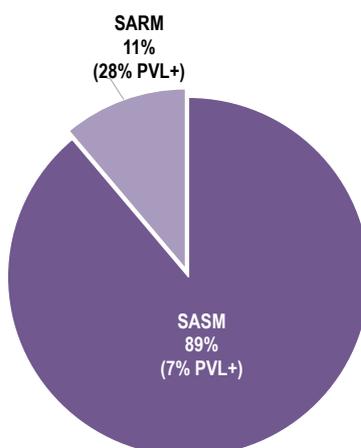


Figure 14- Caractéristiques des *S. aureus* responsables d'infections ostéo-articulaires en 2020 (n=90).

Les tableaux cliniques incluent des ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèses de genou, de hanche... Parmi ces infections diverses, la part des souches porteuses de la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) s'élevait à 6,7% (n = 6) (Quatre SARM et deux SARM).

Nous avons également reçu 3 souches de *S. argenteus* dont une souche PVL positive dans un contexte d'ostéomyélite du tibia chez une enfant de 13 ans.

3.2.7 Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année **2020**, **28 sérums** ont été adressés au CNR pour sérologie anti-PVL (leucocidine de Pantone-Valentine) et/ou anti-TSST-1 (toxine du choc staphylococcique), versus 30 en 2019. Ce chiffre est assez faible mais stable. Cela reflète les indications assez restreintes de ces sérologies mais également probablement un manque d'informations des biologistes et des cliniciens, et une activité médicale perturbée par la pandémie du SARS-CoV-2

en 2020. Pour améliorer l'information des prescripteurs, le site Internet du CNR a été enrichi courant juillet 2020 d'une page précisant les indications et l'intérêt de ces sérologies dans le diagnostic et le suivi des infections staphylococciques à composante toxinique.

Quinze demandes, en provenance de cinq hôpitaux ou laboratoires différents, concernaient une **sérologie PVL**. Ces 15 demandes concernaient 10 patients : 4 présentant une pneumonie avec des signes de nécrose pulmonaire ou des indices pouvant être évocateurs de PVL, 3 présentant une endocardite infectieuse liée à une souche de *S. aureus* productrice de PVL, 2 présentant un choc septique et/ou toxique sans diagnostic étiologique et un présentant une dégradation du bilan hépatique au décours d'une bactériémie à *S. aureus*. La souche de *S. aureus* n'avait été isolée et reçue au CNR que pour les 3 patients atteints d'endocardite : leurs souches étaient PVL-positives. Ces 3 patients ont présenté une séroconversion dans le mois suivant le début des symptômes puis leur taux d'anticorps a diminué au cours du suivi après traitement. Pour les 7 autres patients, aucune souche de *S. aureus* PVL-positif n'avait pu être mise en évidence par les cultures bactériologiques et la sérologie était également négative à l'exception d'une patiente. Cette patiente était hospitalisée en réanimation pour une suspicion de pneumonie nécrosante : elle présentait un taux d'anticorps anti-PVL supérieur à 68000 UA/mL, ce qui était en faveur d'une infection invasive à souche PVL-positif. Concernant les 6 autres sérologies négatives, il s'agissait dans 5 cas de sérums prélevés précocement après le début des symptômes, ce qui ne permet pas d'interpréter la sérologie puisque le délai était trop court pour qu'une séroconversion ait pu avoir lieu. Cependant, les tableaux cliniques de ces patients étaient au final peu en faveur d'une infection toxinique liée à la PVL, ce qui a conduit les médecins à écarter ce diagnostic et ne pas prélever de sérum tardif.

Au total, la sérologie PVL a été contributive au diagnostic pour un patient sur les 10 testés, patiente chez qui elle a permis de faire le diagnostic d'une probable pneumopathie à *S. aureus* PVL-positif. Pour les autres patients, la souche de *S. aureus* avait été isolée et identifiée comme PVL-positif pour 3 d'entre eux et, pour les 6 autres patients, la sérologie n'a pas permis d'aider au diagnostic. Cependant il faut rappeler que le diagnostic des infections liées à la PVL repose avant tout sur l'isolement de la souche infectante de *S. aureus* et la recherche des gènes codant la PVL. Lorsque la souche n'a pu être isolée, la sérologie PVL peut permettre d'obtenir un diagnostic rétrospectif mais dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une **sérologie précoce** et une plus **tardive** (à au moins 3-4 semaines d'intervalle) afin d'objectiver une **séroconversion**.

Dix-sept sérologies TSST-1 ont été effectuées pour 9 prescripteurs différents. Elles concernaient 12 patients (dont 11 femmes) et étaient négatives dans 59% des cas (n=10). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) pour 5 patientes (42%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) pour 7 patients (58%).

Les sérums en contexte de **MTSS** (reçus pour 5 patientes) étaient séronégatifs pour la TSST-1 dans 6 cas sur 8, et faiblement positif dans un cas (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 88% des cas au total. Concernant le résultat faiblement positif, la patiente était séronégative au moment du choc mais le sérum prélevé 7 semaines plus tard présentait un taux d'anticorps de 483 UA/mL, ce qui est faible par rapport à la moyenne dans la population générale (1000 à 1300 UA/mL). Le sérum positif en contexte de MTSS concernait une patiente ayant développé un choc toxique en période menstruelle début 2020, chez laquelle une souche de *S. aureus* productrice de TSST-1 avait été retrouvée au niveau vaginal, et qui présentait une sérologie négative au moment du choc mais positive à 1890 UA/mL 5 mois plus tard. Ceci montre que certaines patientes présentant un MTSS peuvent développer des anticorps après le choc toxique même si ces cas sont peu fréquents, la grande majorité des patientes restant séronégatives après l'épisode de choc. La technique de sérologie ELISA utilisée au CNR ne permet cependant pas de savoir si ces anticorps détectés sont neutralisants et protecteurs ou non.

Les sérums en contexte de **NMTSS** concernaient 7 patients. Nous n'avons reçu un sérum précoce et un sérum tardif que pour 2 patients : pour un, il a été objectivé une séroconversion (contexte d'endocardite infectieuse, dans laquelle la souche avait pu être isolée et était TSST-1-positif) alors que pour l'autre, il n'a pas été objectivé de séroconversion anti-TSST-1, la patiente était séronégative au début de l'infection et l'est restée après. Il s'agissait d'un

contexte de NMTSS associé à un foyer cutané (abcès cutané sur toxicomanie intraveineuse) pour lequel a été isolée une souche de *S. aureus* productrice de TSST-1 qui a permis de confirmer le diagnostic de NMTSS. Il semble donc que cette patiente, tout comme les patientes développant des chocs toxiques menstruels, n'est pas capable de synthétiser des anticorps anti-TSST-1. Pour les 5 autres patients, nous n'avons reçu qu'un sérum. Dans un cas, seul un sérum tardif a été reçu et ne présentait aucun anticorps anti-TSST-1, cette absence de séroconversion ne permettant pas d'affirmer ou infirmer le diagnostic de choc toxique. Dans 4 cas, seul un sérum précoce a été reçu : pour 3 sur 4, la sérologie était positive avec des taux similaires à ceux de la population générale, le dernier étant séronégatif. A noter qu'un enfant présentant une suspicion de NMTSS associé à un foyer infectieux pulmonaire avait en fait une souche PVL-positive, probablement responsable de la gravité du tableau clinique. L'absence de souche de *S. aureus* isolée dans la majorité des cas et l'absence de sérum tardif permettant d'objectiver une séroconversion anti-TSST-1 ne permettent donc pas de conclure sur la possibilité d'un choc toxique non menstruel chez ces patients. Dans ces cas, une sérologie isolée anti-TSST-1 est souvent non contributive pour le diagnostic d'une toxémie à TSST-1. Comme pour la sérologie anti-PVL, un diagnostic rétrospectif peut être obtenu grâce à la sérologie anti-TSST-1 mais pour qu'elle soit contributive, il est nécessaire de réaliser une **sérologie précoce** et une plus **tardive** afin d'objectiver une **séroconversion**.

L'ensemble des **32 demandes de sérologie PVL et TSST-1** émanait de **11 prescripteurs** différents seulement. Ce nombre de prescripteurs assez limité s'explique en partie par l'épidémie de COVID-19 qui a fortement perturbé l'activité médicale en 2020, mais cela nous incite à mieux communiquer et diffuser l'information autour de ces sérologies et notamment leurs indications et leurs apports en termes de prise en charge du patient. Le site internet du CNR a ainsi été implémenté sur les sérologies à destination des prescripteurs courant 2020.

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

3.3.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Au total, **429 souches** ont été adressées au CNR en 2020 pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques, en provenance de 119 laboratoires et/ou prescripteurs différents. Ceci représente une **diminution de 18% par rapport à l'année 2019** (525 souches) (Figure 15). Cette diminution peut être expliquée par deux raisons principales :

- la pandémie de la COVID-19 qui a profondément perturbé les activités médicales en 2020,
- le fait que le CNR a modifié ses conditions de réalisation des CMI des glycopeptides en microdilution à partir du 1^{er} mai 2019 afin que les laboratoires expéditeurs limitent leurs envois aux souches de *S. aureus*, les seules pour lesquelles le CNR peut réellement apporter une expertise complémentaire, et n'adressent plus au CNR les souches de staphylocoques à coagulase négative, ce qui représentait 26 souches reçues en 2019 (cf paragraphe 3.3.3.2.).

Pour les familles d'antibiotiques autres que les glycopeptides, nous observons un nombre de demandes en diminution pour la résistance aux bêta-lactamines, stable pour la résistance au linézolide, à la daptomycine et tendant à augmenter pour la dalbavancine. Ce besoin de vérifier la sensibilité à ces antibiotiques reflète l'augmentation du nombre de souches de staphylocoques multirésistantes offrant des options thérapeutiques réduites et est également lié à la mise sur le marché récente de certaines molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole, le tédizolide ou la dalbavancine pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des techniques permettant de tester la sensibilité des souches de staphylocoques.

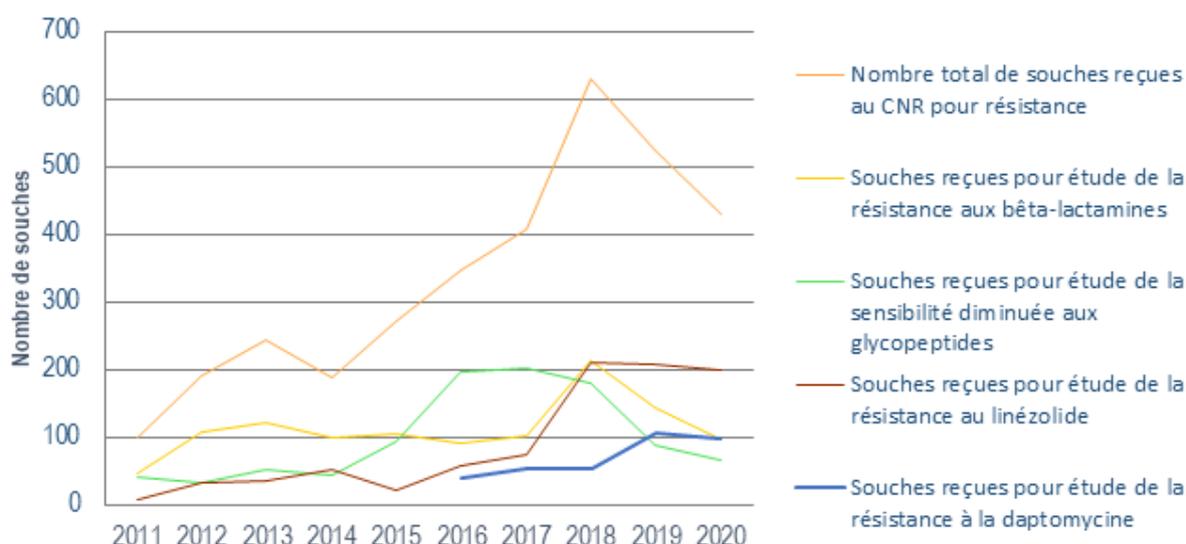


Figure 15 – Souches reçues au CNR pour expertise de la **résistance aux antibiotiques** entre 2011 et 2020.

En 2020, les souches expertisées au CNR pour la résistance comprenaient 375 demandes extérieures et 54 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon. La répartition de ces souches par espèce est décrite dans le tableau 1 : *S. epidermidis* et *S. aureus* sont toujours les deux espèces les plus reçues, en lien avec leur implication majeure dans les infections humaines. *S. epidermidis* a cependant dépassé pour la première fois *S. aureus* en nombre de souches reçues, ce qui reflète la fréquente multirésistance des isolats de cette espèce.

Tableau 1– Répartition selon l'espèce des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques en 2020.

Espèce	Nombre de souches reçues	Pourcentage des souches reçues (%)
<i>S. epidermidis</i>	213	49,7
<i>S. aureus</i>	161	37,5
<i>S. capitis</i>	16	3,7
<i>S. haemolyticus</i>	11	2,6
<i>S. pettenkoferi</i>	9	2,1
<i>S. lugdunensis</i>	6	1,4
<i>S. saprophyticus</i>	5	1,2
<i>S. hominis</i>	3	0,7
<i>S. warneri</i>	2	0,5
<i>S. cohnii</i>	2	0,5
<i>S. caprae</i>	1	0,2
Total	429	100

En plus de ces demandes, toutes les souches de SARM ou de *S. aureus* présentant une croissance difficile isolées chez des patients mucoviscidosiques aux Hospices Civils de Lyon sont conservées au CNR pour vérification de la sensibilité aux glycopeptides pour les SARM et réalisation de l'antibiogramme lorsque les souches montrent une croissance difficile (106 souches pour l'année 2020).

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 2019 (CA-SFM/EUCAST). Par homogénéité avec le laboratoire de bactériologie des Hospices Civils de Lyon auquel est adossé le CNR, le CNR n'applique pas encore les modifications liées à la version 2020 du CA-SFM/EUCAST pour les staphylocoques (touchant principalement les fluoroquinolones).

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

Les techniques utilisées au CNR sont détaillées en Annexe 2.

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

3.3.3.1 Résistance aux bêta-lactamines

Les PCR *mecA* et *mecC* sont réalisées systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR. Le CNR est en outre spécifiquement sollicité pour des problèmes concernant la détection/confirmation de la résistance aux bêta-lactamines, principalement la résistance à la méticilline. En 2020, **97 souches** ont été étudiées dans ce contexte : 85 souches pour une demande de confirmation de sensibilité/résistance à la méticilline, 1 souche pour typage de la bêta-lactamase/pénicillinase et 11 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).

Typage de la pénicillinase staphylococcique

La souche reçue pour typage de la pénicillinase était une souche de **S. aureus** isolée d'une hémoculture. La demande avait été faite dans un contexte de bactériémie associée à un anévrysme mycotique d'une artère fémorale. La souche était négative pour les gènes *mecA/C* et était phénotypiquement sensible à la méticilline. Le typage de la bêta-lactamase, réalisée grâce à l'analyse de la souche par NGS, a révélé une bêta-lactamase de type C. Des études ont montré que certaines souches de SASM pouvaient présenter un effet inoculum vis-à-vis de la céfazoline *in vitro* (c'est-à-dire une augmentation franche des CMI lorsque l'inoculum bactérien est élevé), mais le plus souvent associé à une bêta-lactamase de type A. Cependant, le lien entre effet inoculum *in vitro* et échecs cliniques *in vivo* n'a pas été clairement démontré (Chong *et al.*, EJCMID 2015 ; Song *et al.*, EJCMID 2017).

Résistance à la méticilline

Les 85 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient **62 souches de S. aureus** et **23 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.

	<i>S. aureus</i>	SCN
Souche <i>mecA</i> +	16	7
Souche <i>mecC</i> +	6	0
Souche sensible à la méticilline	40	16
Total	62	23

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

- **48 souches** de *S. aureus* pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence ou absence de gène *mec*. Il s'agissait en général de confirmation i) de la méticillino-résistance pour des souches exprimant la résistance à l'oxacilline de manière hétérogène ou, ii) de la sensibilité à la méticilline pour des souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la CMI oxacilline ou le diamètre de la céfoxitine était proche des valeurs critiques, ou iii) du phénotype 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) du phénotype pour des souches avec des résultats discordants entre deux techniques (antibiogramme en milieu liquide vs en diffusion, antibiogramme vs méthodes moléculaires ou méthodes immunochromatographiques) ou entre le test céfoxitine et la CMI oxacilline en automate Vitek2®. Sur ces 48 souches, seules 14 possédaient le gène *mecA* et les 34 autres ne possédaient aucun gène *mec*.

- **9 souches** de *S. aureus* adressées au CNR pour recherche du gène *mecC*. Cette demande était motivée par deux raisons : i) le plus souvent des souches résistantes à la méticilline sur l'antibiogramme mais avec une recherche de PLP2a ou de gène *mecA* négative et/ou ii) une alerte du système expert d'analyse des antibiogrammes qui incitait à rechercher la présence du gène *mecC* devant un antibiogramme pouvant faire suspecter ce type de souche (notamment des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline mais multisensibles aux autres classes d'antibiotiques). **Six** de ces souches se sont révélées porteuses du **gène *mecC***. Sur les 3 autres souches, 2 étaient en fait porteuses du gène *mecA*, et une s'est avérée sensible à la méticilline. Les 6 souches *mecC*-positives ont été isolées à Toulon, Niort (n=2), Paris, Besançon et Brest. Cinq de ces souches appartenaient au complexe clonal CC130 qui est le clone *mecC*+ le plus courant en Europe ; la dernière souche appartenait au complexes clonal CC49.

- **5 souches** de *S. aureus* présentant une **discordance** dans le laboratoire expéditeur entre les résultats **phénotypiques** et une technique de **biologie moléculaire**.

Pour 4 cas, en provenance de 3 laboratoires, il s'agissait d'une discordance entre la technique multiplex FilmArray (Biofire) qui avait détecté un SARM sur un prélèvement respiratoire alors que la culture n'avait retrouvé que des *S. aureus* sensibles à la méticilline. Les 4 souches ont été confirmées comme phénotypiquement sensibles à la méticilline et négatives pour les gènes *mecA/mecC*. Elles ont ensuite été analysées par puce à ADN ou par NGS à la recherche d'un élément *SCCmec* complet ou tronqué qui pourrait expliquer le résultat faux-positif du FilmArray pour le SARM. Pour 3 de ces souches, aucun fragment de cassette *SCCmec* n'a été détecté. Pour la dernière souche, l'analyse par NGS a montré l'absence de recombinaisons associées aux éléments *SCC* (*mec* ou non-*mec*) ; néanmoins, a été détectée l'insertion d'un élément mobile (d'environ 12kb) entre le gène *rlmH* et le gène *dus* (site d'insertion des cassettes *SCC*) : cet élément mobile présentait 10 gènes retrouvés dans d'autres séquences de *S. aureus* publiées, mais pas dans des cassettes *SCCmec*. Il ne s'agissait donc pas d'un *SCCmec* drop-out (excision partielle d'un élément *SCCmec*).

La 5^{ème} souche concernait une discordance entre technique GeneXpert MRSA (Cepheid) et l'antibiogramme phénotypique. La souche avait été détectée *mec+* *spa+* mais *SCC-* par le GeneXpert et PLP2a faiblement positive en immunochromatographie. Au CNR, elle était bien sensible à la méticilline à la fois phénotypiquement et au niveau moléculaire. Les résultats faux-positifs étaient a priori liés à une contamination de la souche par un staphylocoque à coagulase négative *mecA*-positif présent dans le même prélèvement.

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

- **8 souches** de *S. saprophyticus* (n=2) et *S. lugdunensis* (n=6). Les souches appartenant à ces deux espèces présentent fréquemment des CMI élevées ou limites pour l'oxacilline et la céfoxitine car ces espèces ont naturellement des CMI pour les bêta-lactamines plus élevées que les autres espèces de staphylocoques. Néanmoins les souches véritablement résistantes à la méticilline avec présence du gène *mecA* sont rares. Lorsque les diamètres ou les CMI céfoxitine ou oxacilline rendent un résultat douteux ou discordant pour ces espèces, il est nécessaire de confirmer la présence d'une PLP additionnelle ou d'un gène *mec*. C'est dans ce contexte que nous avons reçu ces souches : 3 souches étaient positives en PCR *mecA* (2/2 *S. saprophyticus*, 1/6 *S. lugdunensis*), et les 5 autres étaient négatives pour *mecA* et *mecC* et étaient sensibles à la céfoxitine en diffusion alors qu'elles apparaissaient résistantes en automate Vitek2®.

- **15 souches** de SCN appartenant à d'autres espèces (*S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pettenkoferi*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : 4 possédaient le gène *mecA* et étaient donc résistantes à la méticilline. Les 9 autres souches étaient négatives pour les gènes *mecA/mecC* et étaient donc sensibles à la méticilline à l'exception des 3 souches de *S. pettenkoferi* qui présentaient une CMI oxacilline à 0,5 ou 0,75 mg/L et une souche de *S. haemolyticus* qui présentait une CMI oxacilline à 2 mg/L, les catégorisant d'après le CA-SFM comme résistantes à l'oxacilline.

Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole

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

En 2020, la détermination de la CMI **ceftaroline** ou la confirmation d'une résistance détectée par le laboratoire expéditeur ont été demandées pour **11 souches** dont 10 résistantes à la méticilline (la souche sensible à la méticilline a été testée pour la ceftaroline car en coinfection avec une souche résistante à la méticilline) :

- **5 souches de *S. aureus*** : elles étaient toutes les 5 sensibles à la ceftaroline, avec des CMI entre 0,19 et 1 mg/L. Deux de ces souches étaient résistantes à la daptomycine et deux présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides.
- **6 souches de staphylocoques à coagulase négative** : **4 souches de *S. epidermidis*** (sensibles à la ceftaroline avec une CMI entre 0,19 et 1 mg/L), **1 souche de *S. haemolyticus*** (sensible avec une CMI à 1 mg/L), et **1 souche de *S. pettenkoferi*** (sensible avec une CMI à 0,064 mg/L).
- A noter cependant que la valeur de 1 mg/L en CMI est en zone d'incertitude technique pour la ceftaroline.

Sept souches de staphylocoques ont été envoyées pour vérification ou détermination de la CMI du **ceftobiprole** :

- **5 souches de *S. aureus*** : 4 étaient sensibles avec une CMI entre 0,75 et 1,5 mg/L, et une était résistante avec une CMI à 4 mg/L. La souche résistante était résistante à la daptomycine et présentait une sensibilité diminuée aux glycopeptides, elle présentait une CMI ceftaroline à 1 mg/L ;
- **une souche de *S. haemolyticus*** résistante au ceftobiprole avec une CMI à 6 mg/L (ayant également une CMI élevée à 1 mg/L pour la ceftaroline) et une souche de *S. epidermidis* sensible avec une CMI à 1,5 mg/L.

3.3.3.2 Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

En 2020, l'étude de la sensibilité aux glycopeptides a été effectuée pour **66 souches de staphylocoques** provenant de laboratoires extérieurs (53 *S. aureus* et 13 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié le plus souvent par des CMI élevées aux glycopeptides (> 1mg/L). Depuis 2015, les recommandations du CA-SFM/EUCAST ont abaissé les CMI à partir desquelles une susceptibilité diminuée doit être recherchée chez *S. aureus* et ont indiqué la nécessité de déterminer les CMI des glycopeptides par la technique de microdilution, ce qui a été à l'origine d'une augmentation du nombre de demandes reçues par le CNR. Par conséquent, devant l'afflux massif de souches pour cette demande, le CNR a pris la décision au 1^{er} mai 2019 de ne plus réaliser les CMI des glycopeptides en microdilution pour les staphylocoques à coagulase négative, ceci après information des laboratoires par courrier et par le site Internet du CNR dans les deux mois précédents. En effet, plusieurs réactifs commercialisés sont à disposition des laboratoires depuis plusieurs années et pour les souches de staphylocoques non-*aureus*, aucune technique de confirmation (type APOP) n'est recommandée et validée, le CNR n'apporte donc aucune expertise particulière sur ce type de souche.

Sur les **53 souches de *S. aureus*** reçues dans ce contexte, 5 souches (9,4% ; 3 SARM et 2 SASM) 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, avec un ratio d'AUC par rapport à la souche Mu3 > 0,9). Deux de ces 5 souches hGISA étaient également résistantes à la daptomycine. Pour 2 autres souches, le test de dépistage des hGISA (test en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un inoculum lourd de 2 McF) et l'analyse de population étaient négatifs ; cependant elles ne pouvaient être rendues sensibles aux glycopeptides car elles présentaient une CMI > 2 mg/L pour la teicoplanine, ce qui conduit à les catégoriser résistantes aux glycopeptides en dépit du fait qu'elles ne répondent pas aux critères retenus par le CA-SFM et la littérature pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type hGISA.

Quarante-six souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage. Parmi elles, 9 présentaient une CMI vancomycine à 2 mg/L (catégorisée sensible) mais il est décrit dans la littérature que le risque d'échec thérapeutique est plus élevé lorsque la CMI vancomycine est > 1 mg/L. Dans ce contexte, il convient de déconseiller l'utilisation de glycopeptides sur ces souches même si elles ne répondent pas aux critères retenus pour définir les GISA ou hGISA.

Concernant les **staphylocoques à coagulase négative**, **13 souches** ont été étudiées au CNR en 2020 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides : 5 souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides (CMI > 4 mg/L pour la teicoplanine et/ou CMI > 2 mg/L pour la vancomycine). Ces souches appartenaient aux espèces *S. epidermidis* (n=2) et *S. haemolyticus* (n=3) ; 2 de ces souches étaient résistantes 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 *cfrA* ou *B*** (chloramphenicol-florfenicol resistance) qui codent des méthyltransférases de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S, méthylations qui masquent la cible du linézolide sur le ribosome,
- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *optrA* et *poxtA*** qui codent des protéines ABC dont le mécanisme est incomplètement connu mais agissant probablement par un mécanisme de protection ribosomale,
- à des **mutations du gène codant l'ARNr 23S** entraînant un changement de conformation du ribosome bactérien et une perte d'affinité des oxazolidinones,
- 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 2020, le CNR a expertisé **199 souches de staphylocoques** pour lesquelles le laboratoire expéditeur avait identifié une CMI augmentée pour le linézolide. **Cent-soixante-quatorze souches**, dont **5 *S. aureus* et 158 *S. epidermidis***, ont été confirmées **résistantes au linézolide** (CMI > 4 mg/L). Le nombre de souches détectées résistantes au linézolide est stable par rapport aux années précédentes (195 en 2019), mais nous observons une baisse du nombre de souches de *S. aureus* résistantes reçues au CNR par rapport à 2019 (24 souches) (Figure 16).

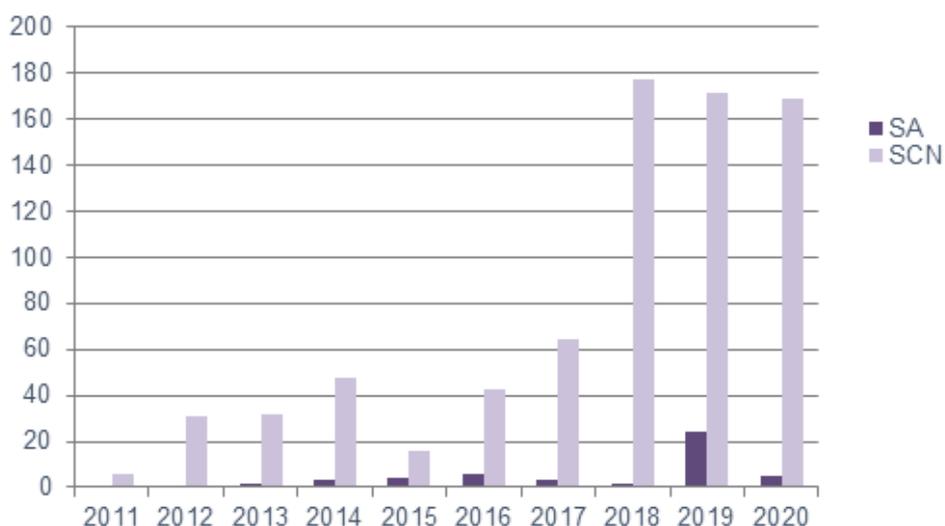


Figure 16. Nombre de souches de staphylocoques **résistantes au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2020.

SA = *S. aureus*, SCN = staphylocoques à coagulase négative.

S. aureus

Sur les 20 souches de *S. aureus* reçues pour suspicion de résistance au linézolide, seules 5 ont été confirmées résistantes avec des CMI entre 6 et > 256 mg/L. Parmi ces 5 souches :

- Une présentait le gène de résistance plasmidique *cfr* sans mutation ribosomale associée : il s'agissait d'une souche de SASM isolée d'hémoculture, provenant du CHU de Saint-Etienne ; aucune autre souche porteuse du gène *cfr* n'a été détectée dans ce CHU en 2020. La CMI du linézolide pour cette souche était à 8 mg/L.
- Les 4 autres souches, dont 2 étaient résistantes à la méticilline, ne possédaient pas le gène *cfr* mais présentaient des mutations ribosomales : 3 présentaient la mutation de l'ARNr 23S G2576T (avec des CMI entre 12 et > 256 mg/L), et une ne présentait pas de mutation dans l'ARNr 23S mais présentait des mutations non synonymes dans les gènes des protéines ribosomales L3 et L4 (CMI 6 mg/L). Ces 4 souches provenaient de villes différentes et avaient été isolées de prélèvements respiratoires, dont deux chez des patients mucoviscidosiques.

Staphylocoques à coagulase négative

Sur les 179 souches de SCN reçues pour suspicion de résistance au linézolide, 169 ont été confirmées comme résistantes. A noter que 2 souches phénotypiquement sensibles au linézolide (*S. capitis* et *S. epidermidis*, CMI à 2 et 4 mg/L) possédaient le gène de résistance plasmidique *cfr*, ce qui illustre le faible niveau de résistance conférée par ce gène et donc la possibilité de ne pas mettre en évidence cette résistance par l'antibiogramme.

Les **169 souches** de SCN résistantes au linézolide appartenaient à 2 espèces : *S. epidermidis* (n=158), et *S. capitis* (n=11), et étaient résistantes à la méticilline pour 168 d'entre elles.

Parmi les 158 souches de ***S. epidermidis*** résistantes au linézolide, 8 possédaient le gène plasmidique *cfr* ; dans 6 de ces 8 souches, le gène *cfr* était associé à la mutation G2576T de l'ARNr 23S. Parmi les 150 souches de *S. epidermidis* ne possédant pas le gène *cfr*, 145 possédaient la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S. Une souche possédait la mutation T2504A au niveau de l'ARNr23S, et les 4 dernières souches ne présentant pas de mutation de l'ARNr 23S possédaient par contre des mutations au niveau des protéines ribosomales L3 et/ou L4.

Parmi les 11 souches de ***S. capitis*** résistantes au linézolide, 3 possédaient le gène plasmidique *cfr*, associé à la mutation T2319C de l'ARNr 23S. Elles provenaient toutes d'hémocultures de patients hospitalisés à l'hôpital Lyon Sud. Parmi les souches *cfr*-négatives, 4 souches présentaient une double mutation de l'ARNr 23S (T2319C + G2576T), 3 souches possédaient la mutation G2576T seule et la dernière présentait la mutation T2319C de l'ARNr 23S associée à des mutations non synonymes au niveau des protéines ribosomales L3 et L4.

Ces données confirment que la mutation majeure associée à la résistance au linézolide retrouvée en France est toujours la mutation G2576T (retrouvée chez 161/174 souches résistantes, 92,5 %). Cette mutation est fréquemment sélectionnée sous pression de sélection antibiotique et peut donner lieu à des clusters de patients colonisés et/ou infectés avec des souches résistantes dans un même service en cas d'utilisation abusive de linézolide.

Au total, 14 souches porteuses du gène *cfr* ont été mises en évidence en 2020, ce qui est légèrement inférieur à 2019 (3 détectées en 2015, 8 en 2016, 19 en 2017, 9 en 2018, 20 en 2019). Ces souches *cfr*-positives ont été détectées dans trois hôpitaux :

- Une souche de *S. aureus* au CHU de Saint-Etienne,
- Six souches (*S. capitis*, n=4, et *S. epidermidis*, n=2) aux Hospices Civils de Lyon,
- Sept souches de *S. epidermidis* au CHRU de Nancy, dans lesquelles le gène *cfr* était associé ou non à 1 ou 2 mutations de l'ARNr 23S, indiquant qu'il s'agit probablement de souches différentes.

Ceci indique le potentiel épidémiogène des plasmides porteurs de *cfr* et les capacités de transfert horizontal entre souches de la même espèce ou d'espèces différentes. Le CNR est en cours de mise en place du séquençage hybride ONT Minion/Illumina afin de d'étudier l'environnement génétique du gène *cfr* dans ces souches et leur fond génétique/leur lien épidémiologique.

L'ensemble de ces données concernant la résistance au linézolide semblent montrer que i) le gène *cfr* reste assez rare mais est présent en France, dans différentes espèces de staphylocoques, y compris *S. aureus*, et ii) que l'accumulation de mutations de résistance lors de mésusage de linézolide dans certains services reste le principal mécanisme d'émergence de souches résistantes à cet antibiotique.

La prévalence de la résistance au linézolide a longtemps été faible en France mais l'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes (Figure 16). On peut noter une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR depuis 2018. Cependant, les résistances plasmidiques sont probablement sous-diagnostiquées car elles confèrent un bas niveau de résistance qui peut poser des problèmes de détection, et les souches résistantes au linézolide ne sont pas systématiquement adressées au CNR. D'après les données du CNR, les résistances au linézolide sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations sur l'ARNr 23S et ces souches peuvent être responsables d'épidémies intra- ou inter-hospitalières puisque plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières ont déjà été décrites. De façon plus inquiétante, il est également retrouvé des résistances plasmidiques au linézolide, telles que celle médiée par le gène *cfr*. Cette résistance plasmidique à fort potentiel de transmission et de dissémination incite donc à renforcer la surveillance du niveau de sensibilité au linézolide et plus généralement aux molécules de la famille des oxazolidinones. La prévalence réelle des souches de *S. aureus* et de SCN résistantes au linézolide en France reste à ce jour inconnue. Une étude de prévalence de la résistance aux oxazolidinones au niveau national apparaît nécessaire et faisait partie des projets du CNR pour l'année 2020 ; elle a dû être repoussée à cause de l'épidémie de SARS-CoV-2. Cette étude s'avère d'autant plus nécessaire que, depuis quelques années, une nouvelle molécule est commercialisée au sein de la famille des oxazolidinones, le tédzolide, et la forme IV du linézolide a été génériquée induisant une chute du prix, ce qui conduit à une augmentation de sa 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 pour identification du mécanisme de résistance.

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 sa bonne diffusion 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. Ces demandes ont fortement augmenté en 2019 puis sont restées stables en 2020, liée à l'utilisation de plus en plus fréquente de la daptomycine au détriment des glycopeptides.

En 2020, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **98 souches de staphylocoques** (34 *S. aureus* et 64 staphylocoques à coagulase négative) vs **106 souches en 2019**, 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 34 souches de *S. aureus* reçues pour cette demande, 17 souches étaient bien résistantes à la daptomycine avec des CMI comprises entre 1,5 et 64 mg/L. Onze de ces souches étaient des SARM ; 9 provenaient d'hémocultures et 4 de prélèvements ostéo-articulaires. A noter une souche qui présentait une discordance entre la CMI en bandelette Etest à 1 mg/L et la CMI en microdilution (UMIC) à 64 mg/L.

Sur les 64 souches de SCN testées, 14 étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 3 mg/L : 5 *S. capitis*, 3 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus*, et 5 *S. pettenkoferi*. Onze de ces souches étaient résistantes à la méticilline et 10 provenaient d'hémocultures.

Jusque début 2018, le CNR réalisait le séquençage du gène *mprf* sur les souches de *S. aureus* résistantes à la daptomycine. En effet, le gène *mprf* code une lysyl-phosphotidylglycérol synthase qui assure le transfert de la lysine chargée positivement sur le phosphotidylglycérol de la membrane cellulaire. La délétion de ce gène ou l'apparition de mutations sur ce gène réduit les charges positives de la membrane bactérienne et ainsi diminue la sensibilité de la bactérie à la daptomycine qui est une molécule anionique et doit venir s'insérer au sein de la membrane bactérienne pour être active. Néanmoins le rôle causal de ces mutations sur *mprf* dans la résistance est encore mal connu et la résistance à la daptomycine est probablement un mécanisme multifactoriel, lié à des mutations de plusieurs gènes, rendant complexe la confirmation moléculaire de la résistance. Le séquençage du gène *mprf* a donc été arrêté par le CNR courant 2018 car jugé peu contributif. Cependant, afin d'explorer les mécanismes de résistance à la daptomycine, le CNR a commencé à recueillir des couples de souches isolées chez le même patient avec une souche initiale daptomycine-sensible et une souche devenue résistante au cours du traitement par daptomycine afin de pouvoir investiguer les modifications génétiques retrouvées chez les souches devenues résistantes par rapport aux souches parentales par NGS.

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. Le CNR dispose pour ces demandes de l'ensemble du panel de bandelettes en gradient de concentration permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococciques utilisés en thérapeutique et peut explorer les mécanismes de résistance d'intérêt par NGS.

- **Trois souches** de *S. aureus* ont été reçues car elles présentaient une **croissance difficile** et l'antibiogramme n'était pas réalisable dans les conditions usuelles (notamment par méthode automatisée). Ils ont été réalisés au CNR par diffusion sur milieu Mueller Hinton pour deux souches, et pour une souche qui ne poussait pas sur milieu MH, sur gélose contenant du sang afin de faciliter la croissance de cette souche déficiente.
- **Quatre souches** (dont 2 *S. aureus*) ont été reçues pour **confirmation du profil d'antibiogramme** car elles présentaient un profil jugé atypique par les laboratoires expéditeurs.
- **Neuf souches** de *S. aureus* ont été reçues pour vérification de la CMI de la **mupirocine** (principalement après échec de décolonisation nasale) : 8 souches étaient sensibles à cet antibiotique et une présentait une CMI à 8 mg/L (catégorisation intermédiaire selon le CA-SFM/EUCAST 2020).

- **Vingt-six souches** (17 *S. epidermidis*, 5 *S. aureus*, 3 *S. haemolyticus* et 1 *S. pettenkoferi*) ont été reçues pour détermination de la sensibilité à la **dalbavancine**. Le CNR réalise dans ce contexte une mesure de CMI pour la vancomycine en microdilution (une souche sensible à la vancomycine étant sensible à la dalbavancine) et une CMI par bandelette Etest pour la dalbavancine. Le CA-SFM recommande de tester cet antibiotique en microdilution mais le CNR ne dispose pour l'instant pas de technique en microdilution (mais en disposera en mai 2021). Sur ces 26 souches, 23 se sont avérées sensibles à la dalbavancine et 3 souches, appartenant aux espèces *S. aureus* (n=2) et *S. haemolyticus* (n=1), se sont avérées résistantes avec une CMI à 0,19 mg/L. Ces souches avaient une CMI élevée pour la vancomycine (2 mg/L) et deux d'entre elles étaient de sensibilité diminuée aux glycopeptides (résistante à la teicoplanine ou profil hétéroGISA).
- **Quatre souches** ont été reçues pour vérification de la sensibilité aux **synergistines** (pristinamycine et quinupristine-dalfopristine). Trois d'entre elles étaient résistantes aux synergistines avec des CMI entre 3 et > 32 mg/L pour la quinupristine-dalfopristine et une souche intermédiaire avec une CMI à 2 mg/L.
- **Quatre souches** de *S. epidermidis* ont été reçues pour détermination de la CMI du **tédizolide**. Deux d'entre elles étaient résistantes au linézolide (CMI > 256 mg/L ; présence de la mutation G2576T dans l'ARNr 23S) et se sont révélées également résistantes au tédizolide (CMI égale à 32 et > 32 mg/L), les mutations ribosomales étant responsables d'une résistance croisée à tous les oxazolidinones. Les deux autres souches étaient sensibles au linézolide et, comme attendu, étaient également sensibles au tédizolide avec des CMI à 0,38 et 0,5 mg/L.
- **Une souche** de *S. aureus* a été reçue pour confirmation de la résistance à la rifampicine (souche isolée d'une infection ostéo-articulaire). La souche était bien résistante à la rifampicine avec une CMI > 32 mg/L alors qu'elle était multisensible (sensible à tous les antibiotiques hormis la pénicilline G).
- Deux souches (*S. epidermidis* et *S. caprae*) ont été reçues pour détermination de la CMI de la **doxycycline** et se sont révélées l'une sensible et l'autre intermédiaire à cet antibiotique. Une souche de *S. aureus* résistante à la tétracycline a été reçue pour détermination de la CMI de la **tigécycline** et s'est révélée résistante à cet antibiotique avec une CMI à 2 mg/L. De telles souches résistantes à la tigécycline restent rares et doivent être confirmées par une mesure de CMI.

3.3.4 Analyse des tendances

Globalement, nous observons les mêmes tendances qu'en 2019 :

- Un nombre toujours élevé de souches reçues pour confirmation et étude de la résistance au linézolide. Ceci démontre une sensibilisation des laboratoires à la problématique de l'émergence de cette résistance. La surveillance des déterminants responsables de cette résistance, notamment de la prévalence des gènes transférables comme *cfrr*, est un enjeu majeur pour les prochaines années.
- Un nombre assez élevé de souches détectées résistantes à la daptomycine, associée à l'utilisation de plus en plus large de cet antibiotique.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Se reporter au chapitre 4. «Alerte » pour SPF

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

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

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

Certaines de ces collaborations s'inscrivent dans la volonté du CNR d'établir des échanges et transfert de technologie avec des laboratoires de pays tiers. Elles permettent de confronter les expériences et approches choisies dans les différents pays. Plus encore, l'évolution de l'épidémiologie des SARM étant liée à des disséminations clonales, ces collaborations permettent de disposer d'un système de veille concernant l'épidémiologie globale et les clones circulants dans des pays tiers qui pour des raisons géographiques, de flux touristique ou migratoires pourraient constituer des réservoirs de nouveaux clones susceptibles d'être introduits et de disséminer en France. Ces collaborations constituent selon nous des éléments importants du dispositif d'alerte et de surveillance épidémiologique dont nous devons disposer (Cf 5.2 Activités d'expertise auprès de structures européennes (ECDC, ...)).

Aucune étude spécifique n'a pu être réalisée au cours de l'année 2020, les activités et les financements de l'ECDC étant actuellement surtout focalisés sur les entérobactéries et les acinetobacters produisant des carbapénèmases.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Pour chacune de ces études, décrire en une page maximum : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication.

4 Alerte

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

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

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

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

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

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

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

Depuis 2011, le CNR participe en lien avec Santé Publique France a participé à l'investigation d'infections à SASM ou SARM dans différents services de néonatalogie en France. Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2020 (Lens, Angers, Lyon). Par ailleurs, le CNR a investigué en 2020 1 nouvelle épidémie dans le service de néonatalogie de Grenoble (Figure 17). Au cours de ces épisodes épidémiques, si des infections ont été identifiées, la majorité des souches analysées correspondent à des souches de portage. Contrairement aux épidémies investiguées en 2019, en 2020 les épidémies investiguées étaient causées par des clones de SARM. Il est cependant important de rappeler l'importance du dépistage de SA (aussi bien pour les SARM que les SASM) dans les services de néonatalogie et d'être vigilant au cas d'infections groupés à SASM moins facilement détectables en raison de leur plus forte prévalence.

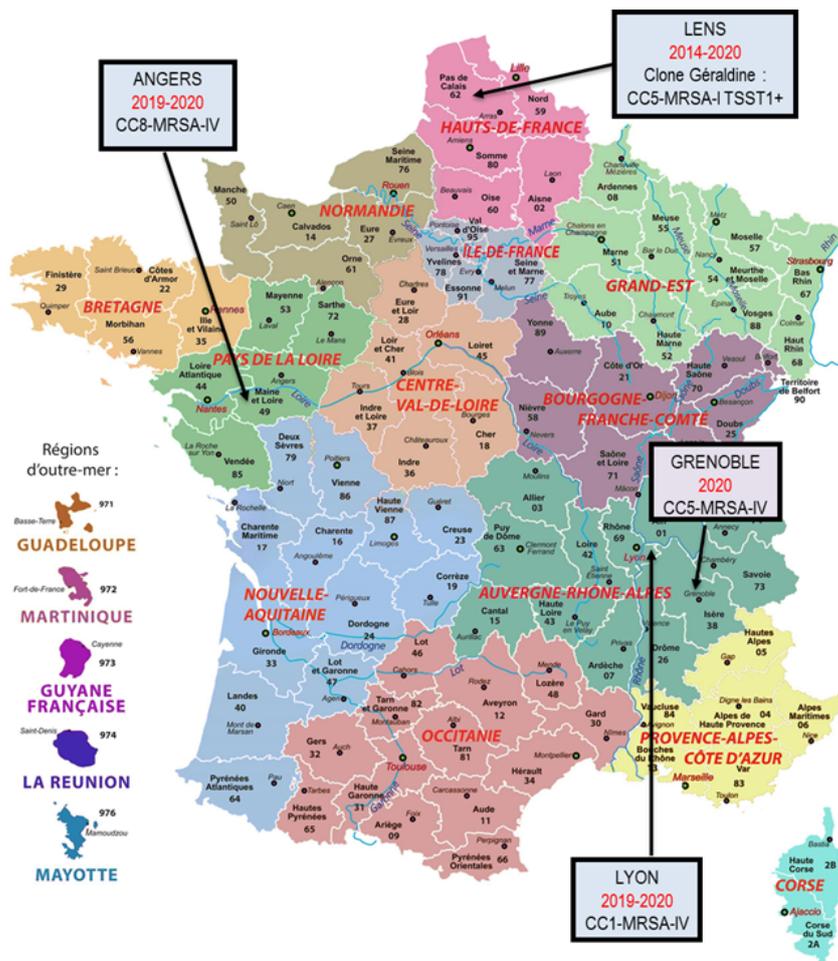


Figure 17. Épidémies d'infections à *S. aureus* dans les services de néonatalogie en France en 2020.

Clone Géraldine (ST5-MRSA-I).

Depuis 2015, le CNR poursuit l'investigation d'une épidémie toujours en cours dans le service de néonatalogie de Lens. Ainsi, en 2020, nous avons à nouveau reçu 8 souches isolées de prélèvements de surveillance de colonisation dans le service de néonatalogie du CH de Lens que nous avons analysées par séquençage pour déterminer s'il s'agissait toujours de la même population bactérienne. Ces souches ont été comparées à : (i) des souches du clone Géraldine isolées dans le même service depuis 2015, (ii) des souches du même clone Géraldine isolées des épisodes épidémiques dans d'autres services et (iii) des souches du clone Géraldine isolées hors cas d'épidémies et de différents départements.

Le génome de la souche la plus ancienne de l'épidémie du clone Géraldine, dans le service de réanimation néonatale au CH de Lens (ST20150021, isolée en novembre 2014), a été utilisée comme référence pour construire un arbre phylogénétique basé sur les positions polymorphiques conservées (SNP dans le core-génome). La comparaison génomique a montré la structure fortement clonale des différentes souches isolées à Lens depuis le premier épisode épidémique (2015-2016). Ainsi, le nombre maximum de SNP entre les souches phylogénétiquement les plus éloignées au sein du groupe Lens n'est que de 34 SNP (Figure 18). Ces résultats corroborent l'endémie de cette souche Géraldine au sein du service de Néonatalogie de Lens.

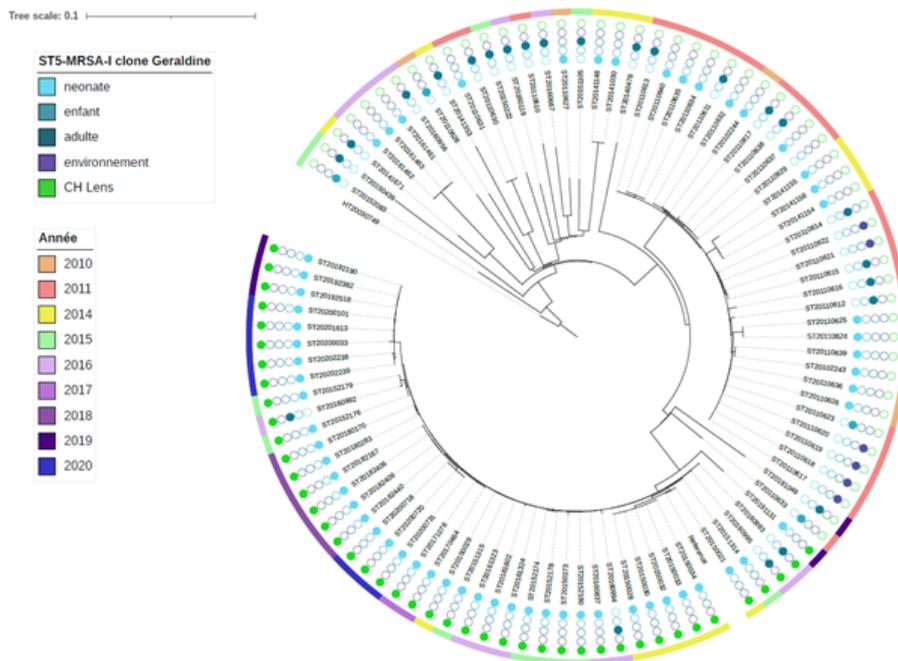


Figure 18. Phylogénie basée sur 1376 SNP du core-génome des souches ST5-MRSA-I, clone Géraldine.

ST8-MRSA-V.

En 2020, le CNR a poursuivi l'investigation d'une épidémie à SARM (ST8 MRSA-V SEKQ+ PVL-) dans le service de Néonatalogie de Angers débutée en 2019. Nous avons séquencé en 2020 dans ce contexte 4 nouvelles souches isolées de prélèvements de surveillance de colonisation. Une de ces souches appartenait à un clone différent (ST8 MRSA-IV) et a donc été exclue de l'analyse. La comparaison génomique à des souches du même clone précédemment isolées dans le même service ou de cas non épidémiologiquement non reliés a montré que ces 3 nouvelles souches appartenaient à la même population clonale précédemment décrite dans ce service avec un maximum de 20 SNPs d'écart entre elles (Figure 19).

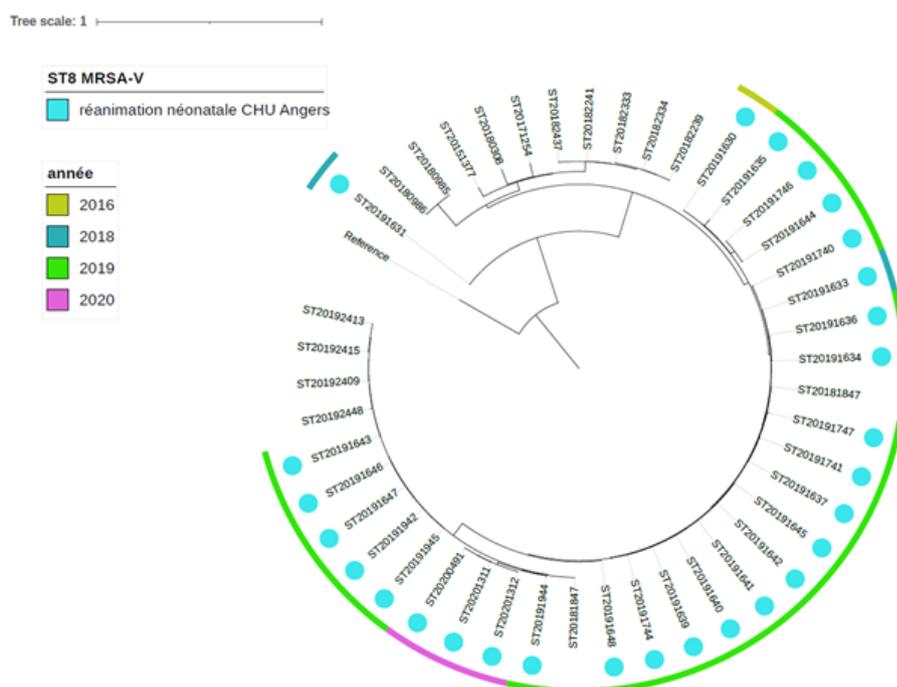


Figure 19. Phylogénie basée sur 689 SNP du core-génome des souches ST8-MRSA-V.

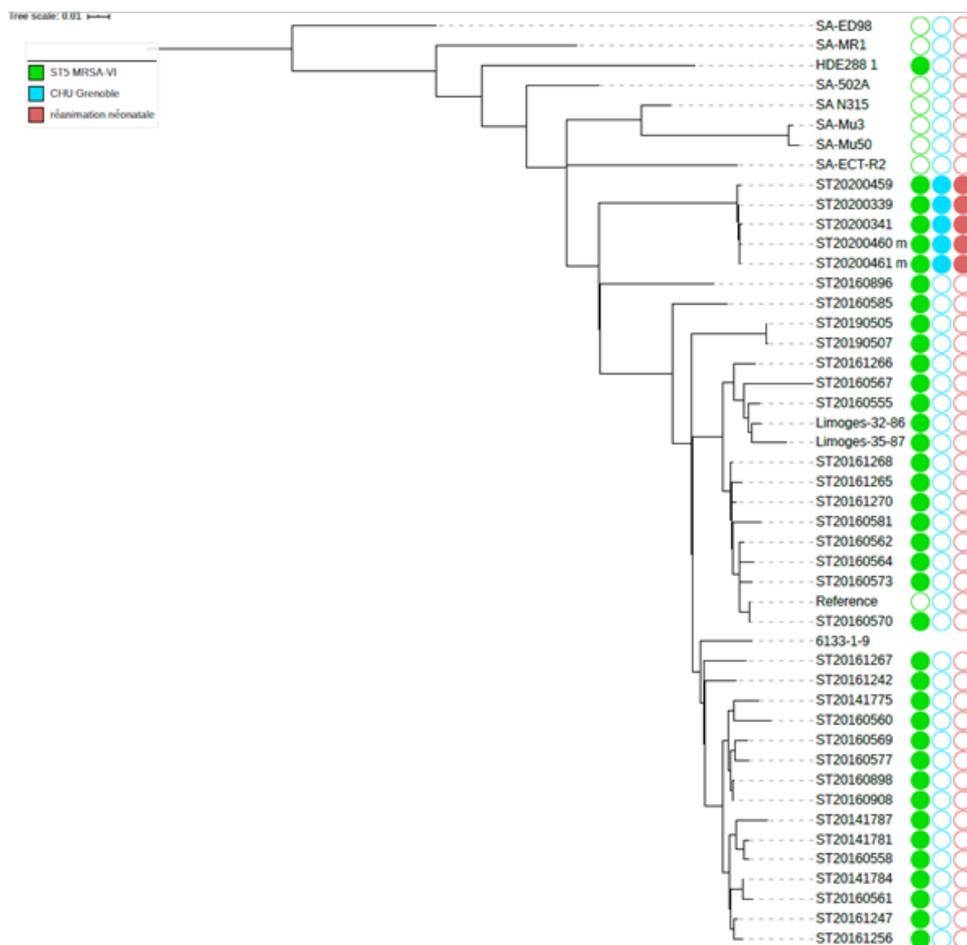


Figure 21. Phylogénie basée sur 2276 SNP du core-génome des souches ST5-MRSA-IV.+

4.2.2 Recherches de lien de clonalité

En parallèle des investigations d'épidémies dans les services de réanimation néonatale, le CNR a réalisé en 2020 15 demandes de recherche de lien de clonalité concernant des souches de *S. aureus* (SARM ou SASM) mais également des souches de staphylocoques non *aureus* (SCN) isolées chez un même patient (confirmation d'une récurrence d'infection sévère) ou lors d'investigations de cas groupés au sein d'un même service ou hôpital (exemple : 2 épidémies dans des services de maternité liés à des souches productrices d'exfoliatines).

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 21).

Le développement du NGS nous permet d'affiner l'interprétation des résultats dans ces contextes, notamment dans le cas de souches de *S. aureus* appartenant à des clones de SASM ou de SARM fréquemment isolés dans les hôpitaux ou dans la communauté. En effet, il est alors nécessaire de réaliser une comparaison avec une résolution importante (identification du nombre de points de mutations ou SNPs entre les souches) pour pouvoir affirmer ou exclure l'appartenance à une même population clonale.

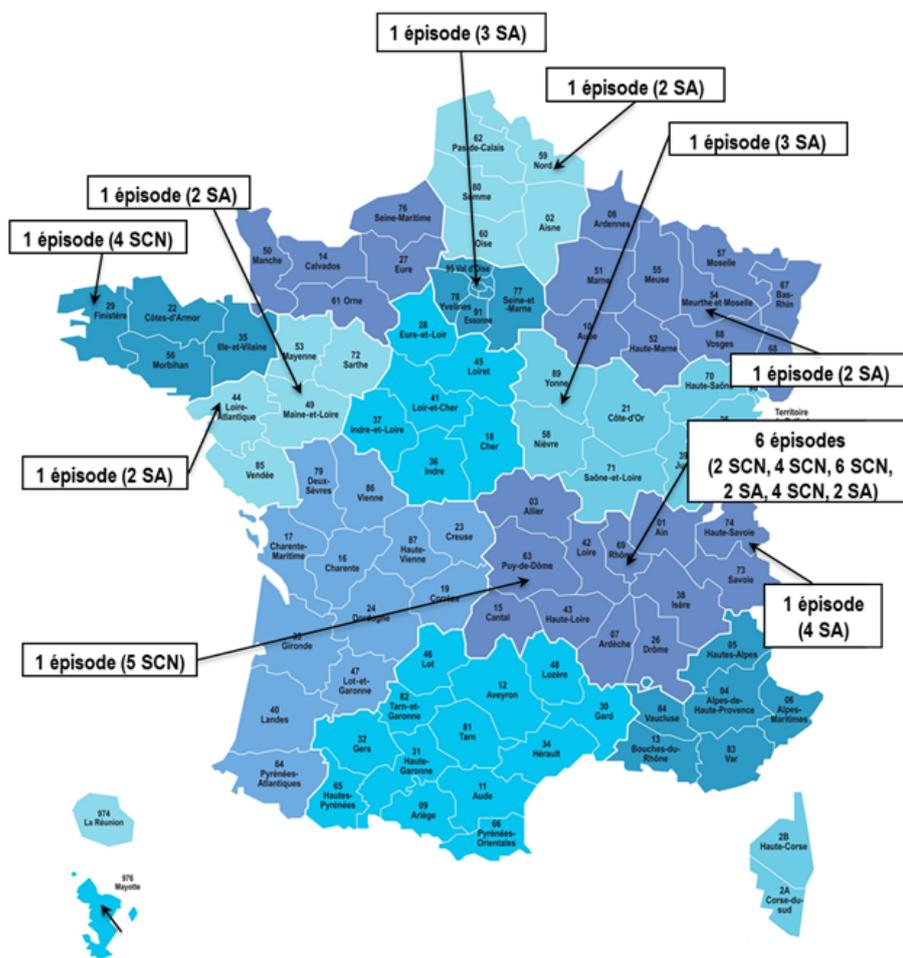


Figure 21- Recherches de lien de clonalité effectuées au CNR en 2020 (hors services de néonatalogie)

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

Le CNR poursuit la transition vers le séquençage systématique complet des génomes des souches de *S. aureus* adressées pour expertise des mécanismes de virulence. L'objectif principal est de remplacer la technique actuelle de détection des facteurs de virulence fastidieuse (PCR multiplex, technique implémentée en 2020 à l'arrêt de fabrication des puces à ADN utilisées depuis une dizaine d'années au CNR pour ces analyses). Ce séquençage systématique permettra également une surveillance épidémiologique plus résolutive.

Ce développement sera associé à l'implémentation des modules d'analyses bioinformatiques de la suite informatique Bionumerics déjà utilisée au CNR pour la gestion de la base de données dans le but de simplifier les pipelines maison actuellement en place et de rendre le traitement des données de séquençage accessible à l'ensemble des biologistes et techniciens.

Ce développement sera également accompagné d'un dépôt de dossier d'accréditation de la technique d'ici fin 2021.

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

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

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

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

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

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

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 demi-journée consacrée aux Staphylocoques)

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

. Atelier FMC Mérieux Université « Microbiologie des Infections ostéo-articulaires »

Exceptionnellement, ces formations ont été annulées en 2020 à cause du contexte sanitaire lié à l'épidémie de COVID-19, mais reprendront normalement en 2021 dès que le contexte sanitaire le permettra.

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

En 2020, le CNR n'a pas élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

Gérard Lina a participé à l'élaboration des CA-SFM EUCAST 2020, et EUCAST 2020 (<http://www.eucast.org/>)

Francois Vandenesch est co-chair (avec H. Chambers, C. Liu, et W. Kern) du groupe de travail de l'ESCMID et de l'IDSA pour la rédaction de recommandations de prise en charge des bactériémies à *S. aureus*.

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

mis à jour régulièrement sur le site. En raison du changement de serveur du site internet, une refonte du site du CNR a été finalisée en 2020.

Interventions en séminaires FMC et Congrès

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

Publications didactiques en français

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

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

Les différentes demandes adressées au CNR sont gérées à travers un colloque hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce colloque permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel et de faire une revue des demandes parvenues au CNR et des réponses adressées aux correspondants. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais en interne et /ou en lien avec les demandeurs et/ou leur(s) tutelle(s) (CPias, ARS, CIRE, Santé Publique France). Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique directement sur le compte-rendu ce qui permet un accès direct aux laboratoires connectés à Hybrid® (environ 2000 courriers en 2020). En fonction du contexte et de la nature des résultats obtenus, des contacts téléphoniques sont établis avec les cliniciens et/ou microbiologistes ayant adressé la demande. L'analyse des cas groupés fait l'objet d'un rapport présentant les résultats obtenus et les conseils du CNR afin d'assurer au mieux la gestion de ces épisodes.

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

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Santé Publique France

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

ANSM

Cf paragraphe 4.2.5

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, 2018, 2019 et 2020 pour **14 laboratoires** participants de **11 pays d'Europe**. En 2020, en sus des souches transmises pour caractérisation phénotypique et moléculaire dans le cadre de l'accréditation, des **fichiers FastQ de génomes** de *S. aureus* ont été fournis pour analyse bio-informatique et interprétation en termes de détection ou non d'un phénomène épidémique. Par cet **exercice in silico** Il s'agissait, en s'affranchissant de la phase (et du coût) de la réalisation technique du séquençage, de tester la capacité des laboratoires d'experts à exploiter cet outil et répondre aux objectifs de caractérisation des souches qui nous sont adressées (résistance, virulence, lien de clonalité...). Cet exercice « in silico » a fait l'objet le 2 mars 2021 d'un colloque-débat de retour d'expérience associant la grande majorité des participants.

EUCAST

Le CNR est un des laboratoires de référence auxquels fait appel l'EUCAST lorsqu'une étude concernant la sensibilité des staphylocoques à un antibiotique est nécessaire, notamment pour élaborer les nouvelles recommandations européennes sur l'antibiogramme et déterminer des diamètres ou concentrations critiques pour des antibiotiques n'en disposant pas encore.

Actuellement, il n'existe pas de concentration critique pour la ceftaroline et le ceftobiprole vis-à-vis des staphylocoques à coagulase négative. Dans ce contexte, le CNR a participé en 2020 à une étude multicentrique organisée par l'EUCAST portant sur la détermination des CMI de la ceftaroline et du ceftobiprole en microdilution sur une collection de souches de staphylocoques à coagulase négative considérées sauvages afin que l'EUCAST puisse déterminer les cut-offs épidémiologiques et ainsi des concentrations critiques pour ces antibiotiques vis-à-vis des SCN. Le CNR a ainsi testé 30 souches des 7 espèces de SCN les plus fréquentes dans les infections humaines (dont au moins la moitié *mecA*-négatifs). Les résultats des différents laboratoires ayant participé à cette étude ont été compilés et sont en cours d'analyse avant publication.

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

Poursuite de la communication dans les médias grand public sur le choc menstruel par Gérard Lina.

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 au printemps 2020 par l'HCERES, l'INSERM et le CNRS lors de la vague A a été recréée au 1^{er} janvier 2021 par les différentes tutelles. Elle 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 23 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (<http://ciri.inserm.fr/en/>). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un **axe d'épidémiologie-clinique**, un **axe physiopathologique** et un **axe fondamental** centré sur les mécanismes de régulation de la virulence et les petits ARN. L'axe clinique porte sur l'épidémiologie (y compris dans ses approches génomiques et phylodynamiques), 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 2020, 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.

Les résultats de la cohorte Française Pneumonie communautaire à *Staphylococcus aureus* publiés dans European Respiratory Journal. Ils confortent le rôle de la PVL indépendamment des autres facteurs de virulence de *S.aureus*.

Gillet Y, Tristan A, Rasigade JP, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, Dumitrescu O, Leloire M, Dupieux C, Laurent F, Lina G, Etienne J, Vanhems P, Argaud L, Vandenesch F; PVL pneumonia study group. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. Eur Respir J. 2021 Apr 8:2004445.

Abstract.

Purpose: *Staphylococcus aureus* causes severe forms of community-acquired pneumonia (CAP), namely staphylococcal pleuropneumonia in young children and staphylococcal necrotising pneumonia in older patients. Methicillin resistance, the Panton-Valentine leukocidin (PVL) toxin, as well as less specific factors have been associated with poor outcome in severe CAP, but their respective roles are unclear.

Methods: A prospective multicentre cohort study of severe staphylococcal CAP was conducted in 77 paediatric and adult intensive care units in France between January 2011 and December 2016. After age-clustering, risk factors for mortality, including pre-existing conditions, clinical presentation, laboratory features, strain genetic lineage, PVL, other virulence factors, and methicillin resistance were assessed using univariate and multivariable Cox and LASSO regressions.

Results: Of 163 included patients, aged one month to 87 years, 85 (52.1%) had PVL-positive CAP; there were 20 (12.3%) patients aged <3 years (hereafter "toddlers"), among whom 19 (95%) had PVL-positive CAP. The features of PVL-positive CAP in toddlers matched with the historical description of staphylococcal pleuropneumonia, with a lower mortality (n=3/19, 15%) compared to PVL-positive CAP in older patients (n=31/66, 47%). Mortality in older patients

was independently predicted by PVL-positivity (hazard ratio 1.81, 95% CI, 1.03 to 3.17) and methicillin resistance (2.37, 95% CI 1.29 to 4.34) independently from *S. aureus* lineages and the presence of other virulence determinants.

Conclusion: PVL was associated with staphylococcal pleuropneumonia in toddlers and was a risk factor for mortality in older patients with severe CAP, independently of methicillin resistance, *S. aureus* genetic background and other virulence factors.

Une histoire évolutive des clones de *Staphylococcus capitis* en réanimation néonatale

Wirth T, Bergot M, Rasigade JP, Pichon B, Barbier M, Martins-Simoes P, Jacob L, Pike R, Tissieres P, Picaud JC, Kearns A, Supply P, Butin M, Laurent F; International Consortium for Staphylococcus capitis neonatal sepsis; ESGS Study Group of ESCMID. Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. Nat Microbiol. 2020;5(5):735-745. doi:10.1038/s41564-020-0676-2

Abstract.

The multidrug-resistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone is responsible for sepsis in preterm infants in neonatal intensive care units (NICUs) worldwide. Here, to retrace the spread of this clone and to identify drivers of its specific success, we investigated a representative collection of 250 *S. capitis* isolates from adults and newborns. Bayesian analyses confirmed the spread of the NRCS-A clone and enabled us to date its emergence in the late 1960s and its expansion during the 1980s, coinciding with the establishment of NICUs and the increasing use of vancomycin in these units, respectively. This dynamic was accompanied by the acquisition of mutations in antimicrobial resistance- and bacteriocin-encoding genes. Furthermore, combined statistical tools and a genome-wide association study convergently point to vancomycin resistance as a major driver of NRCS-A success. We also identified another *S. capitis* subclade (alpha clade) that emerged independently, showing parallel evolution towards NICU specialization and non-susceptibility to vancomycin, indicating convergent evolution in NICU-associated pathogens. These findings illustrate how the broad use of antibiotics can repeatedly lead initially commensal drug-susceptible bacteria to evolve into multidrug-resistant clones that are able to successfully spread worldwide and become pathogenic for highly vulnerable patients.

Evaluation de surinfections bactériennes chez les patients COVID à l'aide du panel FilmArray pneumonie: faible incidence de *S. aureus*.

Kolenda C, Ranc AG, Boisset S, Caspar Y, Carricajo A, Souche A, Dauwalder O, Verhoeven PO, Vandenesch F, Laurent F. Assessment of Respiratory Bacterial Coinfections Among Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Positive Patients Hospitalized in Intensive Care Units Using Conventional Culture and BioFire, FilmArray Pneumonia Panel Plus Assay. Open Forum Infect Dis. 2020 Oct 22;7(11):ofaa484.

Abstract.

Background: Approximately 15% of patients infected by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) present with severe forms of the disease and require hospitalization in intensive care units, which has been associated with high mortality rates. The prevalence of bacterial infections in these patients is not well established, and more data are needed to guide empiric antibiotic therapy and improve patient outcomes.

Methods: In this prospective multicenter study, we assessed bacterial coinfections identified in culture from 99 French patients infected by SARS-Cov-2 and hospitalized in intensive care units. We concomitantly evaluated an innovative molecular diagnostic technology technique, the BioFire, FilmArray Pneumonia Panel plus (FA-pneumo) assay, to identify these coinfections at an early stage, and its concordance with conventional culture.

Results: We showed that a bacterial coinfection was detected in 15% of patients based on conventional culture. *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* were the most prevalent pathogens. The sensitivity of FA-pneumo

compared with culture was 100%. In contrast, the specificity varied between 88.4% and 100% according to the pathogen, and our results highlighted that 60.5% of bacterial targets reported using this assay were not recovered by culture; 76.9% of discordant results corresponded to bacteria belonging to commensal oral flora and/or reported with ≤ 105 copies/mL bacterial nucleic acids.

Conclusions: Based on its excellent sensitivity, the FA-pneumo assay is useful to rule out bacterial coinfections in the context of severe SARS-CoV-2 infection and avoid the inappropriate prescription of antibiotics. However, positive tests should be interpreted carefully, taking into consideration deoxyribonucleic acid bacterial load and all clinical and biological signs.

Origine et evolution d'un nouveau clone européen de SARM Communautaire PVL-positif CC152.

Baig S, Rhod Larsen A, Martins Simões P, Laurent F, Johannesen TB, Lilje B, Tristan A, Schaumburg F, Egyir B, Cirkovic I, Nimmo GR, Spiliopoulou I, Blanc DS, Mernelius S, Moen AEF, David MZ, Andersen PS, Stegger M. Evolution and Population Dynamics of Clonal Complex 152 Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. mSphere. 2020 Jul 1;5(4):e00226-20.

Abstract.

Since the late 1990s, changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were recognized with the emergence of community-associated MRSA (CA-MRSA). CA-MRSA belonging to clonal complex 152 (CC152), carrying the small staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type V and encoding the Panton-Valentine leukocidin (PVL), has been observed in Europe. The aim of this study was to investigate its origin, evolution, and dissemination. Whole-genome sequencing was performed on a global collection of 149 CC152 isolates spanning 20 years (93 methicillin-susceptible *S. aureus* [MSSA] and 56 MRSA isolates). Core genome phylogeny, Bayesian inference, in silico resistance analyses, and genomic characterization were applied. Phylogenetic analysis revealed two major distinct clades, one dominated by MSSA and the other populated only by MRSA. The MSSA isolates were predominately from sub-Saharan Africa, whereas MRSA was almost exclusively from Europe. The European MRSA isolates all harbored an SCC*mec* type V (5C2&5) element, whereas other SCC*mec* elements were sporadically detected in MRSA from the otherwise MSSA-dominated clade, including SCC*mec* types IV (2B), V (5C2), and XIII (9A). In total, 93% of the studied CC152 isolates were PVL positive. Bayesian coalescent inference suggests an emergence of the European CC152-MRSA in the 1990s, while the CC152 lineage dates back to the 1970s. The CA-MRSA CC152 clone mimics the European CC80 CA-MRSA lineage by its emergence from a PVL-positive MSSA ancestor from North Africa or Europe. The CC152 lineage has acquired SCC*mec* several times, but acquisition of SCC*mec* type V (5C2&5) seems associated with expansion of MRSA CC152 in Europe. **IMPORTANCE** Understanding the evolution of CA-MRSA is important in light of the increasing importance of this reservoir in the dissemination of MRSA. Here, we highlight the story of the CA-MRSA CC152 lineage using whole-genome sequencing on an international collection of CC152. We show that the evolution of this lineage is novel, and that antibiotic usage may have the potential to select for the phage-encoded Panton-Valentine leukocidin. The diversity of the strains correlated highly to geography, with higher level of resistance observed among the European MRSA isolates. The mobility of the SCC*mec* element is mandatory for the emergence of novel MRSA lineages, and we show here distinct acquisitions, one of which is linked to the successful clone found throughout Europe today.

Quantification du risque de choc toxique staphylococcique menstruel associé à une l'utilisation inadéquate des tampons périodiques.

Billon A, Gustin MP, Tristan A, Bénet T, Berthiller J, Gustave CA, Vanhems P, Lina G. Association of characteristics of tampon use with menstrual toxic shock syndrome in France. EClinicalMedicine. 2020 Mar 10;21:

Abstract.

Background: Menstrual tampons are widely used in western countries. Indirect evidence suggests that tampon misuse could be associated with an increased risk of menstrual toxic shock syndrome (MTSS). The aim of this study was to determine what characteristics of tampon use are associated with increased risk of menstrual toxic shock syndrome (MTSS).

Methods: A nationwide, case-control study in France, was conducted with women that use tampons with MTSS diagnoses according to the CDC diagnostic criteria (n = 55, from January 2011 to December 2017) and a control group of women with no MTSS history (n = 126, from February to December 2017). Information regarding tampon use during a 6-month period was collected. Associations between tampon use and MTSS were assessed using logistic regression models stratified by residential area.

Findings: Compared to controls, women diagnosed with MTSS more frequently reported maximum tampon wear of >6 h (62% vs. 41%; P = 0.02), overnight tampon use (77% vs. 54%; P = 0.006), and neither read nor followed tampon instructions in case of reading (65% vs. 42%; P = 0.006). In univariate analysis, MTSS risk was two-fold higher with tampon use for >6 consecutive hours (odds ratio, 2.3 [95% CI, 1.2-4.5]), and three-fold higher with tampon use during sleep for >8 h (odds ratio, 3.2 [95% CI, 1.4-7.7]). In multivariate logistic regression analysis, only maximum tampon use for >6 h (odds ratio, 2.03 [95% CI, 1.04-3.98]), and neither read nor followed the tampon instructions in case of reading (odds ratio, 2.25 [95% CI, 1.15-4.39]) were independently associated with MTSS.

Interpretation: Our study suggests that the risk of MTSS was associated with using tampons for more than 6 h, overnight tampon use during sleep, and neither read nor followed tampon insertion instructions in case of reading.

Les bactériophages sont actifs contre les staphylocoques incorporés dans le biofilm.

Kolenda C, Josse J, Medina M, Fevre C, Lustig S, Ferry T, Laurent F. Evaluation of the Activity of a Combination of Three Bacteriophages Alone or in Association with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Embedded in Biofilm or Internalized in Osteoblasts. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e02231-19.

Abstract.

Staphylococcus aureus is responsible for difficult-to-treat bone and joint infections (BJIs). This is related to its ability to form biofilm and to be internalized and persist inside osteoblasts. Recently, bacteriophage therapy has emerged as a promising option to improve treatment of such infections, but data on its activity against the specific bacterial lifestyles presented above remain scarce. We evaluated the activity of a combination of three bacteriophages, recently used for compassionate treatment in France, against *S. aureus* HG001 in a model of staphylococcal biofilm and a model of osteoblasts infection, alone or in association with vancomycin or rifampin. The activity of bacteriophages against biofilm-embedded *S. aureus* was dose dependent. In addition, synergistic effects were observed when bacteriophages were combined with antibiotics used at the lowest concentrations. Phage penetration into osteoblasts was observed only when the cells were infected, suggesting a *S. aureus*-dependent Trojan horse mechanism for internalization. The intracellular bacterial count of bacteria in infected osteoblasts treated with bacteriophages as well as with vancomycin was significantly higher than in cells treated with lysostaphin, used as a control condition, owing to the absence of intracellular activity and the rapid killing of bacteria released after the death of infected cells. These results suggest that bacteriophages are both inactive in the intracellular compartment after being internalized in infected osteoblasts and present a delayed killing effect on bacteria released after cell lysis into the extracellular compartment, which avoids preventing them from infecting other osteoblasts. The combination of bacteriophages tested was highly active against *S. aureus* embedded in biofilm but showed no activity against intracellular bacteria in the cell model used.

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

6.2.1 Publications nationales et Publications internationales

Reductive evolution of virulence repertoire to drive the divergence between community- and hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of the ST1 lineage.

Côrtes MF, Botelho AMN, Bandeira PT, Mouton W, Badiou C, Bes M, Lima NCB, Soares AER, Souza RC, Almeida LGP, Martins-Simoes P, Vasconcelos ATR, Nicolás MF, Laurent F, Planet PJ, Figueiredo AMS. Virulence. 2021 Dec;12(1):951-967.

Characterisation of *S. aureus*/MRSA CC1153 and review of mobile genetic elements carrying the fusidic acid resistance gene 50olo.

Monecke S, Müller E, Braun SD, Armengol-Porta M, Bes M, Boswihi S, El-Ashker M, Engelmann I, Gawlik D, Gwida M, Hotzel H, Nassar R, Reissig A, Ruppelt-Lorz A, Senok A, Somily AM, Udo EE, Ehricht R. Sci Rep. 2021 Apr 14;11(1):8128.

Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France.

Gillet Y, Tristan A, Rasigade JP, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, Dumitrescu O, Leloire M, Dupieux C, Laurent F, Lina G, Etienne J, Vanhems P, Argaud L, Vandenesch F; PVL pneumonia study group. Eur Respir J. 2021 Apr 8:2004445.

Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Dosage Individualization of Suppressive Beta-Lactam Therapy Administered by Subcutaneous Route in Patients With Prosthetic Joint Infection.

Goutelle S, Conrad A, Pouderoux C, Braun E, Laurent F, Gagnieu MC, Cohen S, Guitton J, Valour F, Ferry T. Front Med (Lausanne). 2021 Mar 31;8:583086.

Adaptation of *Staphylococcus aureus* in a Medium Mimicking a Diabetic Foot Environment.

Pouget C, Gustave CA, Ngba-Essebe C, Laurent F, Lemichez E, Tristan A, Sotto A, Dunyach-Rémy C, Lavigne JP. Toxins (Basel). 2021 Mar 22;13(3):230.

Experience With the Use of the MicroDTTect Device for the Diagnosis of Low-Grade Chronic Prosthetic Joint Infections in a Routine Setting.

Kolenda C, Josse J, Batailler C, Faure A, Monteix A, Lustig S, Ferry T, Laurent F, Dupieux C. Front Med (Lausanne). 2021 Mar 16;8:565555.

Antimicrobial activity of the new FabI inhibitor afabicin desphosphono against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*.

Dyon-Tafari V, Josse J, Dieppois G, Ferry T, Laurent F. Int J Antimicrob Agents. 2021 Mar 11 :106321.

How Bacterial Adaptation to Cystic Fibrosis Environment Shapes Interactions Between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Camus L, Briaud P, Vandenesch F, Moreau K. Front Microbiol. 2021 Mar 3;12:617784.

Persistent microbial contamination of incubators despite disinfection.

Chavignon M, Reboux M, Tasse J, Tristan A, Claris O, Laurent F, Butin M. Pediatr Res. 2021 Feb 24.

Antibiotics in Bone Cements Used for Prosthesis Fixation: An Efficient Way to Prevent *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Prosthetic Joint Infection.

Cara A, Ballet M, Hemery C, Ferry T, Laurent F, Josse J. Front Med (Lausanne). 2021 Jan 20;7:576231.

Characterization of cultivable airborne bacteria and their antimicrobial resistance pattern in French milking parlour.

Bayle S, Drapeau A, Rocher J, Laurent F, Métayer V, Haenni M, Madec JY, Valat C. Environ Sci Pollut Res Int. 2021 Mar ;28(9) :11689-11696.

Antibiotic resistance profile and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals in Kabul, Afghanistan.

Naimi HM, André C, Bes M, Tristan A, Gustave CA, Vandenesch F, Nazari QA, Laurent F, Dupieux C. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021 Jan 3.

Staphylococcal Panton-Valentine Leucocidin and Gamma Haemolysin Target and Lyse Mature Bone Marrow Leucocytes.

Hodille E, Plesa A, Bourrelly E, Belmont L, Badiou C, Lina G, Dumitrescu O. Toxins (Basel). 2020 Nov 20;12(11):725.

Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection.

Ferry T, Kolenda C, Batailler C, Gustave CA, Lustig S, Malatray M, Fevre C, Josse J, Petitjean C, Chidiac C, Leboucher G, Laurent F. Front Med (Lausanne). 2020 Nov 16;7:570572.

Trends in Antibiotic Consumption and Resistance in France Over 20 Years: Large and Continuous Efforts but Contrasting Results.

Carlet J, Jarlier V, Acar J, Debaere O, Dehaumont P, Grandbastien B, Le Coz P, Lina G, Pean Y, Rambaud C, Roblot F, Salomon J, Schlemmer B, Tattevin P, Vallet B. Open Forum Infect Dis. 2020 Nov 6;7(11):ofaa452.

Metapopulation ecology links antibiotic resistance, consumption, and patient transfers in a network of hospital wards.

Shapiro JT, Leboucher G, Myard-Dury AF, Girardo P, Luzzati A, Mary M, Sauzon JF, Lafay B, Dauwalder O, Laurent F, Lina G, Chidiac C, Couray-Targe S, Vandenesch F, Flandrois JP, Rasigade JP. Elife. 2020 Oct 27;9:e54795.

Assessment of Respiratory Bacterial Coinfections Among Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Positive Patients Hospitalized in Intensive Care Units Using Conventional Culture and BioFire, FilmArray Pneumonia Panel Plus Assay.

Kolenda C, Ranc AG, Boisset S, Caspar Y, Carricajo A, Souche A, Dauwalder O, Verhoeven PO, Vandenesch F, Laurent F. Open Forum Infect Dis. 2020 Oct 22;7(11):ofaa484.

Endogenous HLA-DQ8αβ programs superantigens (SEG/SEI) to silence toxicity and unleash a tumoricidal network with long-term melanoma survival.

Knopick P, Terman D, Riha N, Alvine T, Larson R, Badiou C, Lina G, Ballantyne J, Bradley D. J Immunother Cancer. 2020 Oct;8(2):e001493.

Clinical evaluation of three chromogenic media for the isolation of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples in patients with cystic fibrosis.

Dyon-Tafari V, Josse J, Safrani-Lahyani J, Assant-Trouillet S, Chiganne M, Vincent F, Montclos MP, Doleans-Jordheim A, Laurent F. Diagn Microbiol Infect Dis. 2021 Jan ;99(1) :115201.

Vaginal Tampon Colonization by *Staphylococcus aureus* in Healthy Women.

Chiaruzzi M, Barbry A, Muggeo A, Tristan A, Jacquemond I, Badiou C, Cluzeau L, Bourdeau S, Durand T, Engelmann A, Bosquet D, Bes M, Prigent-Combaret C, Thioulouse J, Muller D, Lina G. Appl Environ Microbiol. 2020 Sep 1;86(18):e01249-20.

Investigation of a *Staphylococcus argenteus* Strain Involved in a Chronic Prosthetic-Joint Infection.

Diot A, Dyon-Tafari V, Bergot M, Tasse J, Martins-Simões P, Josse J, Valour F, Laurent F. Int J Mol Sci. 2020 Aug 28 ;21(17) :6245.

Trophic cooperation promotes bacterial survival of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Camus L, Briaud P, Bastien S, Elsen S, Doléans-Jordheim A, Vandenesch F, Moreau K. ISME J. 2020 Dec;14(12):3093-3105.

Tolerance and microbiological efficacy of cefepime or piperacillin/tazobactam in combination with vancomycin as empirical antimicrobial therapy of prosthetic joint infection: a propensity-matched cohort study.

Triffault-Fillit C, Mabrut E, Corbin K, Braun E, Becker A, Goutelle S, Chaudier P, Fessy MH, Dupieux C, Laurent F, Gunst S, Lustig S, Chidiac C, Ferry T, Valour F. J Antimicrob Chemother. 2020 Aug 1;75(8):2299-2306.

The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring “Debridement Antibiotics and Implant Retention” and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy.

Ferry T, Batailler C, Petitjean C, Château J, Fevre C, Forestier E, Brosset S, Leboucher G, Kolenda C, Laurent F, Lustig S. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jul 31;7:342.

Performance of the Hologic Panther Fusion MRSA Assay for the nasal screening of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage.

Maurin E, Ranc AG, Abad L, Bes M, Gustave CA, Vandenesch F, Dupieux-Chabert C, Tristan A, Laurent F. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Nov;39(11):2169-2176.

Evolution and Population Dynamics of Clonal Complex 152 Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Baig S, Rhod Larsen A, Martins Simões P, Laurent F, Johannesen TB, Lilje B, Tristan A, Schaumburg F, Egyir B, Cirkovic I, Nimmo GR, Spiliopoulou I, Blanc DS, Mernelius S, Moen AEF, David MZ, Andersen PS, Stegger M. *mSphere*. 2020 Jul 1;5(4):e00226-20.

Impact of Coexistence Phenotype Between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates on Clinical Outcomes Among Cystic Fibrosis Patients.

Briaud P, Bastien S, Camus L, Boyadjian M, Reix P, Mainguy C, Vandenesch F, Doléans-Jordheim A, Moreau K. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jun 3;10:266.

Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin.

Abad L, Josse J, Tasse J, Lustig S, Ferry T, Diot A, Laurent F, Valour F. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jun 1;75(6):1466-1473.

Applied phyloepidemiology: Detecting drivers of pathogen transmission from genomic signatures using density measures.

Wirth T, Wong V, Vandenesch F, Rasigade JP. *Evol Appl*. 2020 May 22;13(6):1513-1525.

Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe.

Bartels MD, Worning P, Andersen LP, Bes M, Enger H, Ås CG, Hansen TA, Holzknicht BJ, Larssen KW, Laurent F, Mäkitalo B, Pichon B, Svartström O, Westh H. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Feb;27(2):284.e1-284.e5.

Hematogenous osteomyelitis in childhood can relapse many years later into adulthood: A retrospective multicentric cohort study in France.

Clerc A, Zeller V, Marmor S, Senneville E, Marchou B, Laurent F, Lucht F, Desplaces N, Lustig S, Chidiac C, Ferry T. *Medicine (Baltimore)*. 2020 May;99(20):e19617.

Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis.

Wirth T, Bergot M, Rasigade JP, Pichon B, Barbier M, Martins-Simoes P, Jacob L, Pike R, Tissieres P, Picaud JC, Kearns A, Supply P, Butin M, Laurent F; International Consortium for *Staphylococcus capitis* neonatal sepsis; ESGS Study Group of ESCMID. *Nat Microbiol*. 2020 May;5(5):735-745.

Identification and Characterization of *Staphylococcus delphini* Internalization Pathway in Nonprofessional Phagocytic Cells.

Maali Y, Diot A, Martins-Simões P, Bes M, Bouvard D, Vandenesch F, Verhoeven PO, Laurent F, Trouillet-Assant S. *Infect Immun*. 2020 Apr 20;88(5):e00002-20.

Association of characteristics of tampon use with menstrual toxic shock syndrome in France.

Billon A, Gustin MP, Tristan A, Bénet T, Berthiller J, Gustave CA, Vanhems P, Lina G. *EclinicalMedicine*. 2020 Mar 10;21:

Evaluation of the Activity of a Combination of Three Bacteriophages Alone or in Association with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Embedded in Biofilm or Internalized in Osteoblasts.

Kolenda C, Josse J, Medina M, Fevre C, Lustig S, Ferry T, Laurent F. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e02231-19.

Efficacy of Bacteriophages in a *Staphylococcus aureus* Nondiabetic or Diabetic Foot Infection Murine Model. Albac S, Medina M, Labrousse D, Hayez D, Bonnot D, Anzala N, Laurent F, Ferry T, Dublanchet A, Chavanet P, Fevre C, Croisier D. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Jan 27;64(2):e01870-19.

Medical innovations to maintain the function in patients with chronic PJI for whom explantation is not desirable: a pathophysiology-, multidisciplinary-, and experience-based approach. Ferry T, Batailler C, Brosset S, Kolenda C, Goutelle S, Sappey-Marinié E, Josse J, Laurent F, Lustig S; Lyon BJI Study Group. SICOT J. 2020;6:26.

No evident association of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* or its small-colony variants with cotrimoxazole use or ANCA-associated vasculitis relapses. Tan BK, Crabol Y, Tasse J, Laurent F, Nekkab N, Vinter C, Puéchal X, Guillevin L. Rheumatology (Oxford). 2020 Jan 1;59(1):77-83.

(II) Communications nationales et communications 53colonization53s

ORALES

An emerging methicillin resistance mechanism due to loss-of-function of the GdpP protein in mec gene negative staphylococci undetected by reference methods.

Durand G, Dupieux-Chabert C, Bes M, Gustave CA, Fruiquière B, Fulchiron C, Munoz L, Rivat S, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A, Martins Simoes P.
30th ECCMID conference, 2020.

AFFICHEES

Différentiation des membres du complexe *Staphylococcus aureus* par MALDI-TOF- VITEK MS.

Cellière B., Monnin V., Bes M., Laurent F., Ranc AG, Arend S., Courault P., Vandenesch F., Durand G., Tristan A., Girard V.
40^{ème} RICAI, 14 – 15 décembre 2020, Paris.

Arthroscopic Debridement Antibiotic And Implant Retention (DAIR) with local administration of Exebacase (Lysin CF-301) (LysinDAIR) followed by suppressive tedizolid as salvage therapy in elderly patients for relapsing multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* prosthetic knee infection.

Ferry T, Batailler C, Kolenda C, Cassino C, Chidiac C, Perpoin T, Le Corvaisier C, Josse J, Souche A, Lustig S, Laurent F.
30th ECCMID conference, 2020.

Intra-osteoblastic activity of dalbavancin during treatment of *Staphylococcus aureus* bone and joint infection.

Chauvelot P, Abad L, Souche A, Dupieux C, Josse J, Ferry T, Laurent F, Valour F.
30th ECCMID conference, 2020.

Therapeutic innovation in bone and joint infections: evaluation of the activity of exebacase (CF-301 lysin) on clinical strains belonging to *Staphylococcus epidermidis* species

Souche A, Kolenda C, Dupieux C, Schuch R, Ferry T, Laurent F, Josse J.
30th ECCMID conference, 2020.

Performance of the PBP2a (Alere-Abbott) immunochromatographic test on early primary cultures from positive MRSA/MR-CoNS blood cultures.

Munier C, Dupieux C, Kolenda C, Bes M, Dauwalder O, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F.
30th ECCMID conference, 2020.

Staphylococcus aureus dampen autophagy flux to survive inside a model of keratinocytes mimicking *S. aureus* nasal colonization.

Audoux E, Caire R, Josse J, Dupieux-Chabert C, Berthelot P, Laurent F, Verhoeven P.
30th ECCMID conference, 2020.

(III) *Conférences sur invitations.*

Pas de conférence sur invitation en 2020 en raison de la crise COVID.

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

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

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR poursuivra en 2021/22 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal. Les éléments spécifiques et/ou nouveaux sont :

8.1 Activités d'expertise

8.1.1 Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Le CNR est en lien avec un important réseau de correspondants de CHU, CHR et laboratoires privés (369 en 2020). Il fidélisera ses correspondants actuels et poursuivra le développement de ce réseau par une retour d'information rapide et personnalisé à l'ensemble des correspondants. Il essaiera de raccourcir les temps de rendu grâce à la transmission électronique sécurisée des comptes rendus et de leur interprétation.

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

En matière de technologie, le CNR poursuit la transition vers le séquençage complet des génomes en vue de répondre d'une part aux besoins croissants d'une épidémiologie moléculaire ultrafine et d'autre part de s'adapter l'arrêt de fabrication des puces à ADN utilisées depuis une dizaine d'années au CNR

Par ailleurs, en matière d'innovation, les avancées du projet RHU IDBIORIV visant à la caractérisation de la résistance et de la virulence par spectrométrie de masse vont permettre de caractériser le profil d'expression de facteurs de virulence de *S. aureus* pour les souches adressées au CNR. Cet outil devrait être opérationnel en routine en 2021 grâce à l'installation sur le site de la Croix Rousse d'un spectromètre de masse Triple Quadropole Sciex.

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

En 2021/2022, le CNR devrait évaluer l'activité d'une nouvelle fluoroquinolone, la délafloxacine sur une collection de souches de staphylocoques, à la fois *S. aureus* et les SCN, en focalisant notamment sur les souches résistantes aux fluoroquinolones classiques telles que la lévofloxacine afin d'évaluer le pourcentage de souches pour lesquelles la délafloxacine permet de retrouver une sensibilité.

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

Des travaux de phylogénomique portant notamment sur les clones émergents de SARM CC6 PVL résistant à l'acide fusidique en Nouvelle Calédonie et à Tahiti sont en cours. Ils font appel à l'analyse bayésienne des génomes entiers de souches collectées au cours des 8 dernières années.

Dans le cadre du RHU ID-BIORIV, les facteurs intrinsèques (génomiques) et extrinsèques (conditions de cultures et autres paramètres environnementaux) permettant de corréler protéomique quantitative et niveau d'expression de la résistance à la méticilline seront étudiées. A terme, ces résultats permettront d'optimiser la détection de la résistance des staphylocoques aux bêta-lactamines.

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.

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

Comme cela a été le cas en 2020, 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.

8.2.4 Autres activités de référence

Le CNR renouvellera en 2021 l'exercice in silico européen d'analyse de séquence de souches de *S.aureus*

8.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

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

Des contacts avec les responsables de SPARES et PRIMO, le CNR de la résistance et Santé Publique France se sont développés au cours de l'année 2020 et début 2021. L'ambition actuelle est de s'appuyer sur la couverture très large de la population incluse dans ces réseaux de collecte de données, pour mettre en place sous l'égide de Santé Publique France des études ciblées sur un échantillon représentatif défini avec l'aide des méthodologistes et statisticiens.

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 avec une transition progressive par une approche NGS et 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 nous permet 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 5.2, le CNR est un membre actif du groupe ESGS de l'ESCMID et participe via cette instance à différents travaux thématiques sur la résistance et/ou sur la prise en charge des infections à Staphylocoques.

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

Enquête sur la prévalence de la résistance au linézolide chez les staphylocoques et les entérocoques

Le linézolide fait partie de la famille des oxazolidinones. Ces molécules constituent une option thérapeutique intéressante pour certaines infections à staphylocoques et à entérocoques, y compris les souches multirésistantes. Cependant, plusieurs études ont montré une augmentation de la prévalence des résistances chromosomiques ou plasmidiques à cette famille d'antibiotiques chez les entérocoques et les staphylocoques en Europe. Les données du CNR sont également en faveur d'une augmentation de la prévalence de la résistance en France. Cette émergence de la résistance est préoccupante en raison de l'omniprésence des staphylocoques à coagulase négative (SCN) dans la flore cutanéomuqueuse et des entérocoques dans la flore digestive. Ces bactéries commensales constituent autant

de réservoirs possibles de gènes de résistance aux oxazolidinones potentiellement transférables aux souches pathogènes comme les souches de *Staphylococcus aureus* virulentes et parfois déjà multirésistantes.

Compte tenu de l'augmentation importante des prescriptions de linézolide, le CNR des Staphylocoques et le CNR de la Résistance aux Antibiotiques – Laboratoire associé Entérocoques lanceront courant 2021 une étude afin d'évaluer la prévalence de la résistance des staphylocoques et des entérocoques au linézolide en France. Cette étude se fera par le moyen d'un questionnaire envoyé aux CH et CHU participant au réseau GMC (Groupe de Microbiologie Clinique) pour recueillir la proportion de staphylocoques et d'entérocoques détectés résistants au linézolide dans ces laboratoires entre 2013 et 2020 par rapport à l'ensemble des souches sur lesquelles a été réalisé un antibiogramme. L'objectif de cette étude préliminaire est de déterminer la prévalence de la résistance et des mécanismes de résistances aux oxazolidinones en France chez les souches de *S. aureus*, de SCN et d'entérocoques. Cette étude préliminaire permettra d'avoir une estimation de la prévalence et de dimensionner une potentielle étude prospective avec recueil de souches pour au final disposer d'une vision épidémiologique globale de la résistance aux oxazolidinones en France chez les staphylocoques et les entérocoques. Ces données permettront d'adapter les mesures de prévention et contrôle de la diffusion des souches résistantes aux oxazolidinones ainsi que la prise en charge des patients colonisés/infectés. Le but est de préserver l'efficacité thérapeutique des oxazolidinones qui doivent pouvoir conserver leur place, dans le futur, dans l'arsenal thérapeutique.

Projet SARMPac- Surveillance des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le Pacifique avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Staphylococcus aureus est la principale espèce responsable d'infections bactériennes pouvant aller du simple furoncle à des pathologies bien plus graves (ostéomyélites, endocardites) voire mortelles (pneumopathies nécrosantes). Ceci est particulièrement le cas, dans les pays tropicaux, où le staphylocoque doré trouve des conditions climatiques (chaleur et humidité) idéales à son développement. Longtemps considéré comme un germe responsable d'infections nosocomiales, ce dernier s'est aujourd'hui propagé en communautaire (en ville) où il représente un réel problème de santé publique. A cela s'ajoute, son niveau de résistance aux antibiotiques qui est en pleine ascension en Nouvelle-Calédonie et à la production très fréquente de toxines ayant des répercussions cliniques gravissimes. Nous proposons dans ce projet, en lien avec l'Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, d'étudier les souches de *S. aureus* présentes dans le Pacifique afin de mieux comprendre leur dissémination en milieu communautaire dans le but de trouver des moyens de lutte adaptés. Ce projet a été accepté lors de l'appel à projet fonds pacifique 2019

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 ces dernières années en lien avec l'observation d'un nombre croissant d'épidémies de colonisation et d'infections à *Staphylococcus* spp en néonatalogie. 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, de même que l'apparition en France du clone SARM PVL+ CC152-MRSA-XIII.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

1. Expertise

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

2. Conseil

Dans le cadre des missions Biotox :

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

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

1. Secteur virulence et épidémiologie

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

2. Secteur résistance

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

3. Secteur sérologie

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

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

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

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

1.3 Locaux et équipements

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

- le R+5 est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie,
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique),
- le R+2 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24,

- le R+3 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie-Hématologie 24h24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée,
- le R+1 héberge le CNR des staphylocoques, le CNR des Légionelles, l'hygiène environnementale et la Parasitologie-Mycologie non automatisée.



L'étage des CNR de Bactériologie.

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (Figure 23). 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 23. 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 de signature d'un accord de transfert de matériel entre les parties (les HCL et le laboratoire demandeur-Annexe 5).

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

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

1.5 Démarche qualité du laboratoire

1.5.1 L'enjeu de l'accréditation

Le laboratoire de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon (LBMMS) est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (accréditation COFRAC n°8-3442) et le même système de management de la qualité est appliqué à tous les services du laboratoire. De ce fait, le CNR des staphylocoques est accrédité pour la PCR PVL en urgence sur les souches (extension demandée en 2015, audit du COFRAC effectué en 2016, confirmation du COFRAC suite à notre déménagement en janvier 2017) mais également pour la recherche des facteurs de virulence et la détection des gènes de résistance (ajout 2019).

1.5.2 La structure qualité du laboratoire

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 24).

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

Le CNR des staphylocoques s'appuie également sur la technicienne qualité du Centre de Biologie Nord et celle de l'IAI. La Figure 25 représente l'organigramme qualité de l'IAI.

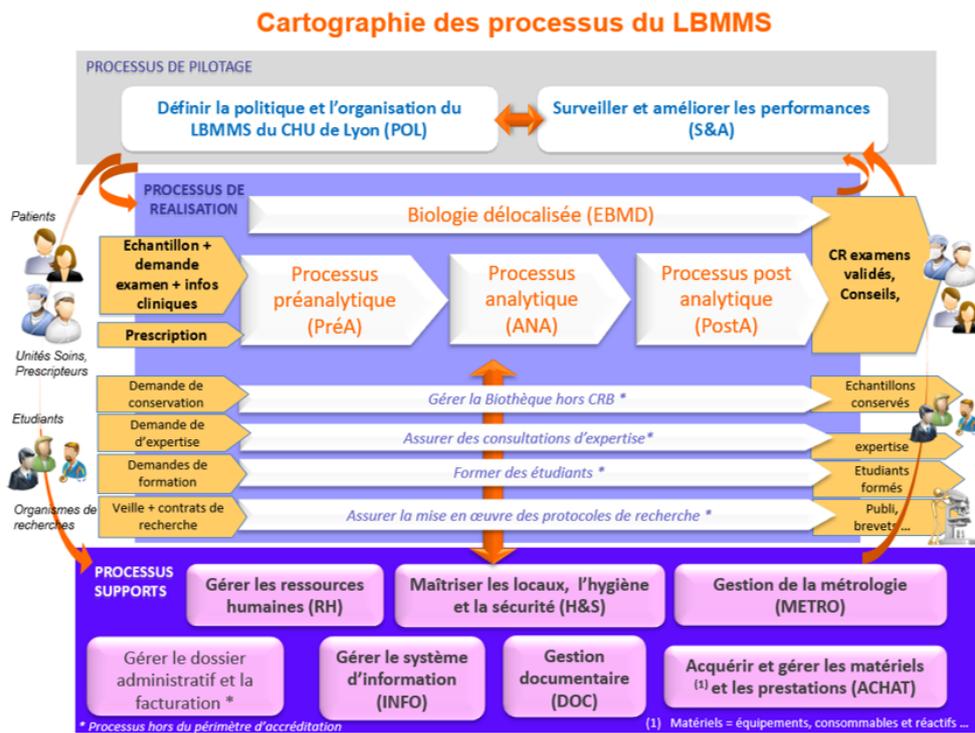


Figure 24- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-05)



Figure 25- Organigramme qualité de l'IAI

1.5.3 Les audits

Des audits internes ont lieu tous les ans pour vérifier la mise en place du système de management de la qualité et le respect des exigences de la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire formé à l'audit et

donnent lieu à des rapports qui permettent de mettre en place des actions d'amélioration. De plus, le COFRAC fait des audits de surveillance y compris au CNR.

1.5.4 Le logiciel de gestion de la qualité

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

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

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

1.5.5 Avancement de la démarche qualité

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici fin 2021.

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.

La détection des gènes codant les facteurs de virulence et de résistance est désormais accréditée.

Le dossier de validation de méthode du NGS aurait dû être déposé d'ici fin 2020 mais ne sera déposé qu'en 2021 en raison de la crise sanitaire ainsi que la technique SensiTitre® pour la réalisation des antibiogrammes.

1.5.6 Les contrôles qualité

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

1.5.6.1 *CQE Européen de l'ESGS*

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

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

- En 2020, le panel incluait :
 - Identification ;
 - résistance : le profil de résistance à 18 antibiotiques (en diffusion et/ou CMI), la détection des gènes de résistance (*mecA*, *mecC*, *mupA*, *cfr*, *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*, *aph3*, *aadD*, *aac-aphD*) ainsi que l'interprétation de ces résultats ;
 - virulence : la détection des gènes codant les toxines (PVL, TSST, ETA, ETB et les entérotoxines A, B, C, D, E, H, K et Q) ainsi que le locus ACME ;
 - typage : le *spa*-type, le *sequence type* et le typage de la cassette *SCCmec*.

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

Pour la troisième année consécutive, le CNR français a organisé **le CQE en 2020**. Douze laboratoires incluant 10 pays y ont participé : Allemagne (n=2), Angleterre (n =1), Belgique (n=1), Danemark (n=2), Ecosse (n=1), France (n=1), Italie (n=1), Irlande (n=1), Portugal (n=1), et Roumanie (n=1).

Par ailleurs un collègue australien nous a également demandé de participer à ce CQE dans le cadre de son accréditation.

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

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

A noter : nouveauté 2020 pour cet EQC : en sus des souches transmises pour caractérisation phénotypique et moléculaire dans le cadre de l'accréditation, des fichiers FastQ de génomes de *S. aureus* ont été fournis pour analyse bio-informatique et interprétation en termes de détection ou non d'un phénomène épidémique. Il s'agissait, en s'affranchissant de la phase (et du coût) de la réalisation technique du séquençage, de tester la capacité des laboratoires d'experts à exploiter cet outil et répondre aux objectifs de caractérisation des souches qui nous sont adressées (résistance, virulence, lien de clonalité...).

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

En 2019, nous avons mis en place un contrôle externe avec les laboratoires des HIA de Bègin et Toulon qui souhaitent évaluer leurs techniques de détection de la résistance à la métilicine et des gènes codant la leucodine de Panton Valentine qui s'est poursuivi en 2020 ainsi qu'avec le laboratoire du CHRU de Tours.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Diagnostic/identification

2.1.1.1 *Techniques d'identification*

PCR agr (accréditée)

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

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

Depuis 2011, le CNR utilise la technique par spectrométrie de masse MALDI-TOF (VITEK MS TM version 2.0) pour l'identification des souches de staphylocoques reçues principalement des staphylocoques à coagulase négative et des souches de *S. aureus* présentant des caractères « atypiques » ou discordants par les techniques conventionnelles. Les techniques développées au CNR ou mises en place lors du précédent « mandat » : séquençage du gène *tuf* et Maldi-tof ont permis entre 2011 et 2016 de caractériser une centaine de souches au niveau de l'espèce. Les espèces concernées étaient les suivantes : *Staphylococcus argenteus*, *aureus*, *auricularis*, *capitis*, *caprae*, *carneus*, *condimentii*, *epidermidis*, *haemolyticus*, *hominis*, *hyicus*, *intermedius*, *lugdunensis*, *pettenkoferi*, *pseudintermedius*, *saprophyticus*, *schleiferi*, *sciuri*, *warneri*, et *xylosus*¹².

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

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

¹² 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

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 Genbank, la plus forte homologie est observée avec la séquence correspondant au gène *tuf* de la souche MSHR1132, souche type de *S. argenteus* dont le génome entier a été séquencé. Les puces à ADN reconnaissent également l'espèce *S. schweitzeri*, récemment décrite qui est également proche phylogénétiquement de *S. aureus* et *S. argenteus* mais isolée principalement chez les primates non humains en Afrique. Aucune souche appartenant à cette espèce n'a été reçue au CNR depuis sa description¹³.

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

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

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

Cette technologie devra malheureusement être arrêtée en 2020 en raison de l'interruption de fabrication des réactifs par l'industriel. Le dossier d'accréditation finalisé ne sera donc pas déposé. Un nouveau kit de puces (Interarray®) basé sur la même technologie est en cours d'évaluation au CNR.

PCR toxine simplex (accréditée)

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*).

¹³ 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

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-toxiques », Immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine a été mise en place au CNR à partir des souches. La technique utilise une extraction manuelle et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV* avec révélation par incorporation de SYBR GREEN. Le résultat est disponible en 3 heures et peut être transmis immédiatement au laboratoire prescripteur.

PCR toxines multiplex sur souche (accréditée)

En raison de l'arrêt de la commercialisation des puces à ADN utilisées jusqu'à présent au CNR, la détection des gènes codant les toxines staphylococciques par PCR multiplex avec révélation en gel, utilisées depuis des années au CNR a été redéployée le temps d'accréditer le NGS qui sera réalisé sur l'ensemble des souches reçues au CNR pour caractérisation de la virulence ainsi que la recherche de lien de clonalité.

2.1.1.3 Techniques immunologiques de diagnostic indirect

Sérologies TSST-1 et PVL

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

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

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

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

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

La sérologie PVL peut présenter un intérêt dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même si la cinétique de séroconversion est encore mal connue. Dans le cas de la sérologie TSST-1, l'absence d'anticorps à la phase aigüe du choc en période menstruelle est en faveur d'un choc toxique staphylococcique ; le suivi sérologique

permet d'observer une absence de séroconversion chez la majorité des patientes. Or, la persistance d'un taux négatif à distance de l'épisode de choc est associée à un risque accru de récurrence et conduit donc à conseiller aux femmes concernées de s'abstenir d'utiliser des tampons vaginaux ou des coupes menstruelles.

Une **sérologie alpha-toxine** a également été mise en place : il s'agit d'une sérologie contrôle. L'alpha-toxine est une toxine quasi-constante chez *S. aureus* (codée dans 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.

Dans tous les cas, pour que la sérologie soit interprétable, il convient, dans la mesure du possible, de nous envoyer un **sérum précoce** (au moment du début des symptômes) puis un **sérum tardif** (au moins 3-4 semaines après le début des symptômes) afin de pouvoir objectiver une séroconversion ou une absence de séroconversion.

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* (accréditée)

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

Caractérisation de la Casette SCC*mec*

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

Le CNR dispose d'outils de PCR assurant la détection rapide des différents complexes *mec* et *ccr* (PCR-M1 et PCR-M2 de Kondo). Cette approche est désormais remplacée par le NGS.

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 *orfX* a été implémenté au CNR en 2014. La technique, appelée *dru*-typing (direct repeat units-typing), a pour but d'amplifier une série de séquences répétées de 40 paires de composition variable située à côté de la séquence d'insertion IS431 présente au sein de la cassette SCC*mec*. Le produit d'amplification est

ensuite séquencé. La nature (enchaînement de bases) et le nombre des séquences répétées permet de définir une combinaison particulière dénommée *dru*-type et signalée par le préfixe dt, un chiffre différent pour chaque combinaison. Plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir discriminant de cette approche pour différencier les clones de staphylocoques résistant à la 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 reliés 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. Cette technologie s'est malheureusement arrêtée en 2020 en raison de l'interruption de fabrication des réactifs par l'industriel mais un nouveau kit est en cours d'évaluation au CNR.

2.1.3 Techniques de séquençage (dossier d'accréditation en cours)

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. Le CNR utilise pour a plateforme NGS des Hospices Civils de Lyon.

L'augmentation de l'activité de NGS s'est manifestée par une évolution de séquençage de manière ponctuelle (investigation d'épidémies, analyse de phénotypes particuliers de virulence ou de résistance) à un séquençage systématique depuis janvier 2020 des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline ou productrices de toxine PVL. Le but était de constituer une base de données de génomes pertinente pour le CNR, en vue d'un changement de technique (actuellement PCR multiplex) et de l'accréditation du NGS pour le rendu de la caractérisation des facteurs de virulence de *S. aureus*.

Cette montée en puissance de notre activité est organisée par une ingénieure hospitalière bio-informaticienne du CNR en coordination avec l'équipe de biologistes.

Voir paragraphe 2.6. du rapport

2.1.4 Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

Détection des gènes *mecA/mecC* de résistance à la méticilline (accréditée)

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

Détection PLP2a

Le test PBP2a SA Culture Colony Test (Abbott) 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 recommandations 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 0.5 McF est réalisé dans du sérum physiologique puis dilué au 1/100 dans un bouillon Muller Hinton II. Enfin, 100µl de la suspension diluée sont transférés dans chaque puits de la galerie UMIC avant de la recouvrir avec un 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. Du 2^{ème} au 12^{ème} puits, nous disposons d'une concentration croissante d'antibiotiques (de 0,25 à 4 mg/L pour la vancomycine et de 0,25 à 8 mg/L pour la teicoplanine). La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne (ce qui correspond à la 1^{ère} cupule limpide). Les concentrations critiques en mg/L selon le CA-SFM 2019 (idem dans le CA-SFM 2021) sont :

- *Staphylococcus aureus* : vancomycine et teicoplanine ≥ 2 mg /L

- Staphylocoques à coagulase négative : vancomycine ≥ 2 mg/L et teicoplanine ≥ 4 mg/L.

Ce test devrait être remplacé par la technique Sensititre en 2021.

La recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides pour *S. aureus* est réalisée par un test de dépistage utilisant la technique des macrobandettes (inoculum de 2 McF, bandelettes en gradient vancomycine et teicoplanine déposées sur gélose cœur-cerveille, incubation 48h). Le dépistage est positif lorsque la valeur obtenue est ≥ 12 mg/L pour la teicoplanine seule ou ≥ 8 mg/L pour vancomycine et teicoplanine.

En cas de dépistage positif, la confirmation définitive repose sur une analyse de population selon la technique d'Hiramatsu sur gélose cœur-cerveille contenant 1, 2, 3 4, 5 et 6 mg/L de vancomycine avec comparaison à la souche hGISA de référence, Mu3.

Le CNR est également en mesure de détecter d'éventuels souches de *S. aureus* porteuses des gènes *vanA/B*. 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 est capable de dépister ces souches via une mesure de la CMI vancomycine et teicoplanine (le gène *vanA* conférant un haut niveau de résistance contrairement aux souches de sensibilité diminuée) puis détecter ces gènes, auparavant grâce à la puce à ADN qui comportait des spots dédiés à la détection des gènes *vanA*, *vanB*, et *vanZ*, et actuellement par NGS. A ce jour, aucune souche de *S. aureus* portant ce mécanisme de résistance n'a été identifiée en France.

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 les loci *cfra* et *cfb* (décrit en 2015) en position plasmidique qui codent des méthylases modifiant l'ARN 23S à la position 2503, ont été développées. Les souches que le CNR a été amené à expertiser étaient essentiellement des staphylocoques à coagulase négative adressés pour recherche spécifique du mécanisme associé à une résistance au linézolide détectée phénotypiquement par le laboratoire demandeur. Il faut noter que le premier *S. aureus* positif pour le gène *cfra* a été détecté en juillet 2015. Cette modification confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (Linézolide), Pleuromutilins et Streptogramine A. Ce mécanisme conduit à des faibles niveaux de résistance au linézolide, sauf quand il est associé à des mutations ribosomales.

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

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

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

Outre les techniques d'antibiogramme en milieu liquide (Vitek2, bioMérieux) et en milieu solide (diffusion en gélose). Le CNR dispose de l'ensemble des outils (réplicateur de Steers) et des personnels techniques formés pour la réalisation des mesures de CMI par les méthodes standard de référence (dilutions en milieu liquide, dilutions en milieu gélosé). Ces techniques sont utilisées lors des protocoles (ex : Etude endocardite ; Etude IOA), lorsqu'un grand nombre de souches doit être étudié, ou pour des vérifications de résultats obtenus par des méthodes commerciales.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

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

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

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

3.1 Permanence du CNR ¹⁴

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

3.2 Autorisations MOT ¹⁵

- *Une personne est-elle autorisée par l'ANSM à effectuer des opérations sur les MOT pour les activités du CNR ? A défaut, une demande d'autorisation a-t-elle été déposée à l'ANSM et à quelle date ?*
- *Si OUI, qui est titulaire ¹⁶ ou demandeur de cette/ces autorisations(s)*

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

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

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

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

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

¹⁴ Ces informations seront conservées exclusivement par Santé publique France aux seules fins de contacter un CNR en cas d'urgence ; elles ne seront pas rendues publiques.

¹⁵ Micro-Organismes et Toxines de la liste prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. La liste des MOT est actuellement fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par les arrêtés du 6 novembre 2014 et par l'arrêté du 2 octobre 2015.

¹⁶ Ne pas indiquer les personnes habilitées mais seulement les personnes titulaires.

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 reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRS ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.
 - Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
 - Le Demandeur s'engage à utiliser le MATERIEL selon les lois et réglementations en cours.
 - Le MATERIEL est accessible gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition)
- Le Demandeur et le CNR-S, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signée étant gardée par le Demandeur et l'autre par le CNR-S.

Le Centre National de Référence des Staphylocoques

Nom de la personne autorisée :

En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Staphylocoques,

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

Signature

Le Demandeur :

Nom de la personne :

Organisation :

Adresse :

Signature

Date

Annexe 5 : Sommaire du Manuel qualité du laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU 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



*Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire
Référence Kalilab : MU-POL-MQ-001-06*

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

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

Page 2/38

Sommaire

SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	5
PRESENTATION DU LABORATOIRE	6
ORGANISATION DU LABORATOIRE	9
A / DEFINIR LA POLITIQUE ET L'ORGANISATION DU LBMMS (POL)	10
A1. Politique qualité et engagement de la direction	10
A2. Organisation des responsabilités	10
A3. Organisation de la qualité au LBMMS	11
A4. Communication et éthique	13
A4.1 Communication interne	13
A4.2 Communication avec les professionnels de santé	13
A4.3 Communication avec les patients	15
A4.4 Ethique	15
B / SURVEILLER ET AMELIORER LES PERFORMANCES (S&A)	16
B1. Processus de gestion documentaire	16
B2. Vigilances	17
B3. Satisfaction des utilisateurs	18
B4. Suivi des indicateurs	18
B5. Gestion des audits internes	19
B6. Maîtrise des non-conformités	19
B7. Gestion des actions correctives et préventives	20
C / PRE-ANALYTIQUE (PreA)	21
C1. Sous-traitance	22
D / ANALYTIQUE (ANA)	23
E / POST-ANALYTIQUE (PostA)	25
F / BIOLOGIE DELOCALISEE (EBMD)	27
G / GERER LES RESSOURCES HUMAINES (RH)	27
H / GERER LES SYSTEMES INFORMATISES (SI)	28
I / ACQUERIR ET GERER LES MATERIELS ET LES PRESTATIONS (ACHAT)	29
I1. Maîtrise des achats	30
I2. Maîtrise des matériels, réactifs et prestations	30
J/ GERER LA METROLOGIE (METRO)	31
K/ MAITRISER LES LOCAUX, L'HYGIENE, ET LA SECURITE (H&S)	32
L / PROCESSUS HORS PERIMETRE D'ACCREDITATION	33
L1. Gérer le dossier administratif et la facturation	33
L2. Assurer la mise en œuvre des protocoles de recherche	33
L3. Gérer la Biothèque hors Centre de Ressources Biologiques des HCL	34
L4. Assurer des consultations d'expertises	34
L5. Former des étudiants	34
ANNEXE 1- POLITIQUE QUALITE DU LBMMS DU CHU DE LYON	35
ANNEXE 2- Corrélation NF EN ISO 15189 et Manuel Qualité	37
ANNEXE 3- Corrélation NF EN ISO 17025, NF EN ISO 15189 et Manuel Qualité	38

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-06)

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

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

Page 3/38

Version : 01	Date d'application : 01/06/2013
Version : 02	Date d'application : 15/05/2014
Version : 03	Date d'application : 24/06/2015
Version : 04	Date d'application : 01/09/2017
Version : 05	Date d'application : 08/06/2018
Version : 06	Date d'application : 01/11/2019
Motif de révision :	
<ul style="list-style-type: none"> - Précisions apportées sur les procédures spécifiques pour le SMQ 17025 (biologie environnementale) - Mises à jour des documents liés et informations des différents chapitres, particulièrement : <ul style="list-style-type: none"> - Mise à jour de l'organigramme fonctionnel (page 11) - Précisions concernant l'organisation des EBMD au LBMMS - Ajout de l'Expert Métrologue (nouvelle prestation) au chapitre Métrologie - Ajout d'un paragraphe concernant le document unique au chapitre H&S - Mise à jour de la Politique Qualité 	
Rédaction : PILOTES DE PROCESSUS	
Vérification : Mylène GADOUX et Maud BAUME, RQ LBMMS	
Approbation : Dr Anne MIALON, Biologiste responsable du LBMMS, Chef de Pôle Activité Médicale Biologie et Anatomie et Cytologie Pathologiques et Pr Gérard LINA, Adjoint	

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-06)