



# RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

***Année d'exercice 2022***

**CNR des Staphylocoques**

	<b>Organisme / Structure d'hébergement</b>	<b>Responsable</b>
Laboratoire CNR	Hospices Civils de Lyon	<u><b>Dr Anne TRISTAN</b></u>

<b>Résumé analytique</b> .....	4
Faits marquants.....	4
<b>Executive summary</b> .....	5
Highlights.....	5
<b>1. Missions et organisation du CNR</b> .....	6
Organigramme.....	6
Mission et Organisation .....	6
Démarche Qualité.....	7
<b>2. Activités d'expertise</b> .....	8
2.1 Evolution des techniques .....	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	9
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....	11
2.4 Collections de matériel biologique .....	12
2.5 Activités d'expertises.....	13
2.6 Activités de séquençage .....	13
2.7 Partage de séquences produites par les CNR.....	16
<b>3. Activités de surveillance</b> .....	17
3.1 Description du réseau de partenaires .....	17
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	18
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	31
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....	46
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....	47
<b>4. Alertes</b> .....	53
<b>5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil</b> .....	63
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	63
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	65
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...) .....	66
<b>6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR</b> .....	68
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.....	68
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.....	74
<b>7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux</b> .....	80
<b>8. Programme d'activité pour les années suivantes</b> .....	81

<b>1. Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR</b> .....	101
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	101
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés .....	102
1.3 Locaux et équipements.....	103
1.4 Collections de matériel biologique .....	105
1.5 Démarche qualité du laboratoire.....	106
<b>2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</b> .....	110
2.1 Liste des techniques de référence .....	110
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	119
<b>3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)</b> .....	120
3.1 Permanence du CNR .....	120
3.2 Autorisations MOT .....	120
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale.....	120
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo .....	120
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France .....	120
3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR .....	120
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR.....	120

## RESUME ANALYTIQUE

### Faits marquants

Expertise, contribution à la surveillance et à l'alerte, et conseil sont les mots clés de nos missions. Les enjeux de santé publique liés aux *Staphylococcus* restent majeurs aussi bien en termes de surveillance de l'épidémiologie globale que d'émergence/diffusion de nouveaux clones et de nouveaux mécanismes de résistance. Au-delà de la seule espèce *S. aureus*, les *Staphylococcus non-aureus*, responsables d'infections chez certaines populations à risque, méritent aussi une attention particulière.

**Expertise.** 2303 souches (hors protocoles) analysées, nombre de correspondants élevé (89 départements métropolitains/DROM COM)

#### Surveillance-Alerte.

- Augmentation des souches reçues responsables d'impétigo bulleux
- Détection de cas groupés (communauté ou établissements de santé), affirmation ou infirmation de la transmission grâce à l'utilisation exclusive du NGS pour l'investigation des cas.
- Signalements et investigation de cas groupés/épidémies dans les services de néonatalogie : surtout des SARM de différentes lignées mais l'année 2022 aura été particulièrement marquée par la saisine pour l'investigation de la recrudescence des cas d'infections à *S. haemolyticus* dans ces services.
- Détection croissante de souches résistantes au linézolide (*S. non-aureus*), augmentation du nombre de souches résistantes à la daptomycine (*S. aureus* et *non-aureus*)
- Surveillance de l'évolution des clones de SASM/SARM en France : décroissance des clones de SARM communautaires historiques au profit de clones internationaux ou de nouvelles lignées tel le CC152 PVL+, SASM et SARM, émergent ces dernières années.
- Enquête concourant à la surveillance de la résistance dans la communauté et webinaire programmés en 2023 en lien avec PRIMO.

**Conseil.** Outre sa participation à différentes cellules de gestion d'épidémie, le CNR a poursuivi son activité de diffusion de la connaissance y compris pour le grand public.

Le CNR a poursuivi **sa recherche translationnelle** en lien avec son équipe de recherche INSERM, notamment en établissant des liens clinico-biologiques à partir de souches issues de cohortes de patients initiées par le CNR ou auxquelles le CNR est associé.

## EXECUTIVE SUMMARY

### Highlights

Expertise, contribution to surveillance and alert, and advice are the key words of our missions. The public health challenges associated with *Staphylococcus* remain major, both in terms of monitoring global epidemiology and the emergence/diffusion of new clones and new resistance mechanisms. In addition to the *S. aureus* species, *Staphylococcus non-aureus*, which are responsible for infections in certain at-risk populations, also deserve particular attention.

**Expertise.** 2303 strains (excluding protocols) analyzed, large number of correspondents (89 metropolitan departments/DROM COM).

#### Surveillance-Alert.

- Increase in the number of strains received responsible for bullous impetigo.
- Detection of clustered cases (community or health establishments), confirmation or denial of transmission thanks to the exclusive use of NGS for case investigation.
- Reports and investigation of cluster cases/epidemics in neonatal units: mainly MRSA of different lineages, but 2022 will have been particularly marked by the referral for investigation of the resurgence of *S. haemolyticus* infections in these units.
- Increasing detection of strains resistant to linezolid (*S. non-aureus*) and an increase in the number of strains resistant to daptomycin (*S. aureus* and *non-aureus*).
- Monitoring of changes in MRSA clones in France: decline in historical community MRSA clones in favor of international clones or new lines such as CC152 PVL+, MRSA and MRSA, which have emerged in recent years.
- Survey to monitor resistance in the community and webinar scheduled for 2023 in conjunction with PRIMO.

**Advice.** In addition to its participation in various epidemic management units, the CNR has continued to disseminate knowledge, including to the general public.

The CNR pursued its **translational research** in conjunction with its INSERM research team, notably by establishing clinico-biological links using strains from patient cohorts initiated by the CNR or in which the CNR is involved.

# 1. Missions et organisation du CNR

Le CNR des Staphylocoques remercie chaleureusement l'ensemble de nos correspondants et partenaires pour l'envoi de souches ainsi que pour les renseignements permettant de remplir nos missions de surveillance microbiologique.

Le CNR des Staphylocoques remercie Santé Publique France pour les nombreuses interactions permettant de répondre à nos missions.

## Organigramme

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 ingénieurs) et des personnels qui consacrent une partie de leur temps seulement au CNR selon un principe de multi-affectation (biologistes, secrétaires, cadre médico-technique).

**Responsable** : Anne TRISTAN (depuis janvier 2023)

**Co-responsables** : Frédéric LAURENT

François VANDENESCH



### DIRECTRICE

Anne Tristan (MCU-PH)  
[anne.tristan@chu-lyon.fr](mailto:anne.tristan@chu-lyon.fr)

### DIRECTEURS ADJOINTS

François Vandenesch (PU-PH)  
[francois.vandenesch@univ-lyon1.fr](mailto:francois.vandenesch@univ-lyon1.fr)  
Frédéric Laurent (PU-PH)  
[frederic.laurent@univ-lyon1.fr](mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr)

### SECTEUR VIRULENCE ET EPIDEMIOLOGIE

Anne TRISTAN (MCU-PH) – directrice  
[anne.tristan@chu-lyon.fr](mailto:anne.tristan@chu-lyon.fr)  
Anne-Gaëlle Ranc (PH)  
[anne-gaëlle.ranc@chu-lyon.fr](mailto:anne-gaëlle.ranc@chu-lyon.fr)  
Camille Kolenda (PHU)  
[camille.kolenda@chu-lyon.fr](mailto:camille.kolenda@chu-lyon.fr)  
Gérard Lina (PU-PH)  
[gerard.lina@chu-lyon.fr](mailto:gerard.lina@chu-lyon.fr)

### SECTEUR RESISTANCE

Frédéric LAURENT (PU-PH) – directeur adjoint  
[frederic.laurent@univ-lyon1.fr](mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr)  
Céline Dupieux-Chabert (PHC)  
[celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr](mailto:celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr)

### EQUIPE TECHNIQUE ET INGENIEURE

Patricia Martins-Simoes (ingénieure)  
[patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr](mailto:patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr)  
Benjamin Youenou (ingénieur)  
[benjamin.youenou@chu-lyon.fr](mailto:benjamin.youenou@chu-lyon.fr)

Yves Gillet (PU-PH / infectiologue pédiatre)  
[yves.gillet@chu-lyon.fr](mailto:yves.gillet@chu-lyon.fr)  
Tristan Ferry (PU-PH / infectiologue adulte)  
[tristan.ferry@chu-lyon.fr](mailto:tristan.ferry@chu-lyon.fr)  
Pascal Del Giudice (PH : Référent dermatologie)  
[del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr](mailto:del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr)  
Marine Butin (PU-PH : Référente néonatalogie)  
[marine.butin@chu-lyon.fr](mailto:marine.butin@chu-lyon.fr)

### SECTEUR SEROLOGIE

Frédéric LAURENT (PU-PH) – directeur adjoint  
[frederic.laurent@univ-lyon1.fr](mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr)  
Céline Dupieux-Chabert (PHC)  
[celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr](mailto:celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr)

**Cadre de santé**  
Laetitia Dubost

**Techniciennes**  
Nadia Boulegroun (départ juin 2023)  
Christine Gardon (départ octobre 2022)  
Emelyne Jeanne  
Emilie Josse  
Roxane Schnell  
Charline Vuillot



## Mission et Organisation

Les missions et l'organisation du CNR des Staphylocoques sont détaillées en Annexe 1. Anne Tristan est directrice du CNR des Staphylocoques dans les suites du renouvellement.

## Démarche Qualité

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité du CHU de Lyon 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. Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur. Pour le CNR des Staphylocoques, il s'agit de Anne Tristan. Le CNR des Staphylocoques s'appuie également sur la technicienne qualité du Centre de Biologie Nord et celle de l'IAI.

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 en 2018 à la suite de notre déménagement en janvier 2017, audit COFRAC novembre 2019) mais également pour la recherche des gènes codant facteurs de virulence et la détection des gènes de résistance par PCR multiplex (ajout 2019) et séquençage du génome complet (ajout 2022) ainsi que pour la réalisation des antibiogrammes et détermination des concentrations minimales inhibitrices en lien avec le plateau de microbiologie 24/24 de l'Institut des Agents Infectieux.

Des audits internes ont lieu régulièrement 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. En 2020, un audit interne de la gestion des ressources humaines et de la gestion de la métrologie ont été réalisés. Le dernier audit interne du CNR interne a eu lieu le 28 juin 2022 sur le NGS, analyse déposée en ajout en mai 2022. Le prochain audit COFRAC est prévu sur l'ensemble du LBMMS en septembre 2023.

Depuis l'année 2022, le CNR participe à un contrôle externe d'évaluation de la qualité (EEQ) proposé par le CTCB. Ce contrôle a lieu deux fois par an et permet d'évaluer la résistance à la méticilline par les différentes techniques ainsi que la détection des gènes codant les toxines TSST-1, PVL, exfoliatine A et exfoliatine B. Le CNR a également organisé et participé au contrôle de qualité européen ESGS qui permet d'évaluer de manière plus large l'identification, la réalisation de l'antibiogramme et la recherche de gènes de virulence et de résistance.

## 2. Activités d'expertise

### Éléments clés en termes de production d'expertise :

- **2303** souches reçues
- **89** départements métropolitains ou DROM COM,
- Expertise **virulence** ⇒ séquençage
- Expertise **clonalité** ⇒ séquençage
- Expertise **résistance** ⇒ antibiogrammes Sensititre +/- CMI en microdilution +/- antibiogrammes par diffusion
- + analyse de population pour les glycopeptides +/- gènes de résistance +/- séquençage
- Délai moyen de réalisation d'expertise (entre date d'envoi et rendu, hors clonalité) environ 7 jours (72h pour PVL urgente)

### 2.1 Evolution des techniques

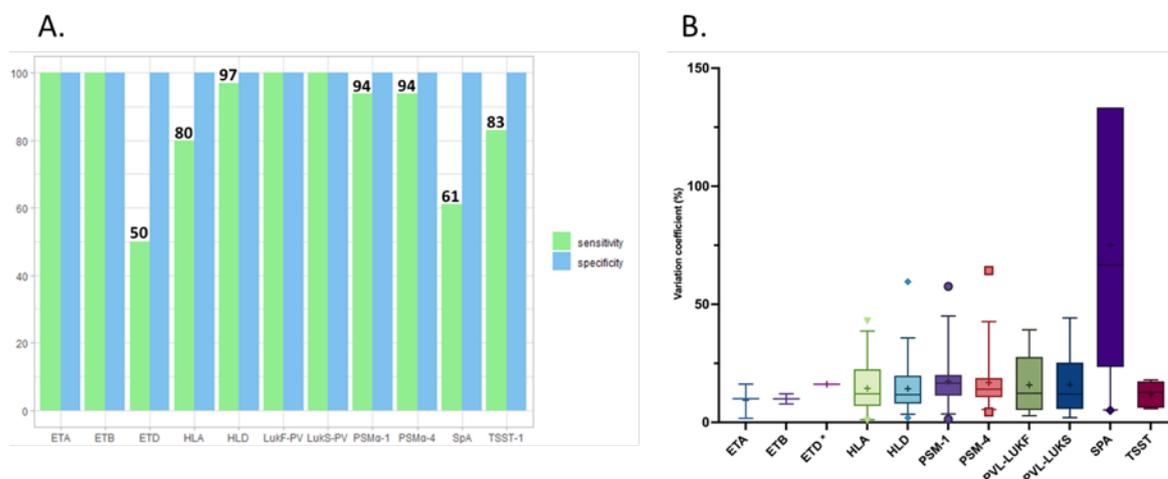
#### Évolution NGS

Dans un souci d'optimisation de la consommation des réactifs des analyses de séquençage et de leur coût, le CNR a travaillé en 2022, en lien avec la plateforme de séquençage GenEPII des Hospices Civils de Lyon dédiée à la microbiologie, sur l'utilisation des surplus des kits COVIDSeq (Illumina) pour la préparation des banques d'ADN pour le séquençage. Ces réactifs sont moins chers et certaines étapes du protocole COVIDSeq sont simplifiées par rapport au protocole DNA prep (Illumina) précédemment utilisé permettant un gain de temps (2h versus 3h). Le principe de ce protocole et ses grandes étapes (digestion enzymatique de l'ADN, indexation et clean up) sont conservés par rapport au kit DNA prep. Ceci a nécessité une gestion de portée flexible de la technique accréditée et notamment une comparaison de méthodes ayant permis la confirmation de l'équivalence des performances analytiques entre ces deux kits.

#### Protéomique ciblée

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 a développé une méthode de protéomique haut débit ciblant 41 des principaux facteurs de virulence et régulateurs globaux de *S. aureus*. Les avancées du projet RHU IDBIORIV vont permettre de caractériser le profil d'expression de facteurs de virulence de *S. aureus* pour les souches adressées au CNR. Cet outil est actuellement opérationnel dans une configuration recherche grâce à l'installation sur le site de la Croix Rousse d'un spectromètre de masse Triple Quadropole Sciex couplé à un système de chromatographie liquide haute pression Agilent 1290 Infinity II. Pour être totalement opérationnel en mode « routine CNR », un développement informatique financé sur le budget du RHU est en cours de finalisation. Ce développement vise à l'amélioration de la couverture de détection en déterminant un panel de peptides permettant de couvrir 98 % de la diversité protéique connue à ce jour chez *S. aureus*. L'objectif en 2023 sera de rendre un résultat de protéome en même temps que la caractérisation génomique des souches adressées pour expertise de la virulence. A terme, cette approche permettra de sélectionner de nouveaux biomarqueurs et de développer éventuellement des tests rapides d'identification des pathovars afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique des patients. En 2022, le CNR a mis en place une série d'analyses afin de vérifier l'avancée des développements bio-informatiques de la méthode par des données analytiques. Un jeu de 36 souches répondant

à des combinaisons spécifiques de peptides pour 11 protéines de virulence (HIA, SpA, HID, PSM $\alpha$ -1, PSM $\alpha$ -4, LukS-PV, LukF-PV, TSST-1, ETA, ETB et ETD) a donc été sélectionné. Les souches ont été analysées en triplicats biologiques dans le but de pouvoir estimer les coefficients de variation des données quantitatives obtenues.



**Figure 1- Résultats des mises au point pour donner suite à l'évolution de la méthode protéomique pour l'étude de la virulence de *S. aureus*.**

A. Sensibilités et spécificités détaillées pour chaque protéine évaluée.

B. Coefficients de variation moyens mesurés pour chaque protéine évaluée. \* coefficient de variation d'ETD déterminé sur 1 triplicat biologique d'une unique souche.

Les sensibilités et spécificités globales observées pour ces 11 protéines ont été respectivement de 87 % et 100 % (Figure 1 A). Concernant la fiabilité des données de quantification, les coefficients de variation moyens ont varié de 9 à 17 % sauf pour la protéine SpA (75 %) (Figure 1 B). Les données de détection qualitative et de quantification actuelles semblent donc robustes bien que perfectibles pour certaines protéines de virulence évaluées. Des mises au point seront poursuivies sur les protéines ayant présenté les plus faibles sensibilités et les plus fort coefficients de variation ainsi que sur la validation des 30 autres cibles protéiques.

## 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

**Dépistage de la résistance au linézolide : évaluation d'un milieu chromogène sélectif** (Poster RICAI 2022)

**Objectif – Introduction :** Évaluer les performances du milieu chromogène sélectif CHROMagar™ LIN-R (CHROMagar/Mast) pour la détection et la différenciation des bactéries Gram+ résistantes au linézolide (LNZ-R) possédant différents mécanismes de résistance et niveaux de CMI.

**Matériels et méthodes :** 42 souches ont été ensemencées sur milieu LIN-R et gélose au sang avec un inoculum fort (IF : 0,5McF, 10 $\mu$ L) et/ou dilué (ID : 0,5McF à 1/10<sup>5</sup>, 100 $\mu$ L ;  $\approx$ 20-100UFC) :

- 4 souches à IF pour contrôle de sélectivité du milieu (*Bacillus* LNZ-S, *Corynebacterium* LNZ-S, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853) ;
- 32 souches de staphylocoques (Sta) à IF et ID : LNZ-S, n=10 ; LNZ-R, n=22, dont 12 ayant seulement le gène *cfr* ou *cfr*(B) et 10 présentant des mutations ribosomales +/- *cfr* ou *optrA* ;
- 6 souches d'entérocoques (Enc) à IF et ID (LNZ-S : *E. faecalis* ATCC29212 ; LNZ-R : n=5, dont *optrA*+, n=2, *poxtA*+, n=2 et *cfrB*+, n=1).

La croissance sur LIN-R a été observée à 24 et 48h d'incubation à 37°C (taille/couleur des colonies). La CMI LNZ des souches a été déterminée par E-test (bioMérieux) à 24 et 48h d'incubation (concentration critique = 4mg/L).

**Résultats :** Les 4 souches utilisées comme contrôle de sélectivité du milieu n'ont présenté aucune croissance sur LIN-R en 48h.

Parmi les 11 souches LNZ-S (10 Sta, 1 Enc), de fines colonies ont été observées à 48h pour 2 souches (faux-positifs, présentant des CMI LNZ limites à 48h à 4-6mg/L).

Les 27 souches LNZ-R (22 Sta, 5 Enc) poussaient sur LIN-R dès 24h avec l'IF alors qu'avec l'ID, seules 21/27 étaient positives à 24h. Les 6 autres souches ne poussaient à ID qu'après 48h ; ces souches avaient des CMI catégorisées S à 24h (5/6 possédaient le gène *cfi*). La taille et le nombre de colonies observées étaient corrélées à la CMI LNZ des souches.

Les colonies sur LIN-R avaient une couleur conforme aux attentes (Sta / rose et Enc / bleu), sauf 2 staphylocoques présentant une teinte bleutée (*S. cohnii* et *S. sciuri*).

**Conclusion :** Le milieu LIN-R présente une excellente sensibilité, y compris pour des souches présentant un mécanisme de résistance au LNZ conférant une CMI basse. Pour cela, comme recommandé par le fabricant, il est indispensable d'incuber 48h, puis d'identifier et vérifier la CMI LNZ des souches. Ce milieu se révèle donc être un outil performant de dépistage des bactéries Gram+ LNZ-R, quel que soit leur niveau de résistance et le mécanisme impliqué.

### Évaluation de la galerie VITEK2 P668 pour la CMI daptomycine des staphylocoques (Poster RICA 2022)

**Objectif - Introduction :** La daptomycine (DAP) a été récemment ajoutée dans la galerie VITEK® 2 staphylocoques P668 (bioMérieux). La résistance à la DAP reste rare mais sa détection est capitale. Nous avons donc cherché à comparer les performances de cette galerie pour la DAP vs 2 autres techniques commerciales : CMI en bandelette Etest® (bioMérieux) et CMI en milieu liquide Sensititre (ThermoFisher).

**Matériels et méthodes :** 82 souches de staphylocoques, dont 54 résistantes à la méticilline, ont été testées : *S. aureus*, n= 39, dont ATCC29213, et staphylocoques à coagulase négative (SCN), n=43. 70 souches avaient été initialement identifiées comme résistantes à la DAP (DAP-R, CMI > 1 mg/L, le plus souvent en Etest). Trois techniques de détermination de la sensibilité à la DAP ont été comparées, avec lecture à 24h d'incubation (sauf VITEK2) :

- galerie VITEK2 P668,
- bandelette Etest sur gélose MHE (BioRad),
- microdilution Sensititre FR1STENT, considérée ici comme la référence.

Les résultats ont été interprétés selon les recommandations du CA-SFM 2021 et les deux techniques comparées en termes de « Categorical Agreement » (CA), d'« Essential Agreement » (EA), d'erreurs majeures (EM) et très majeures (ETM).

**Résultats :** Au total, en Sensititre, 40/82 souches étaient DAP-R et 25/82 avaient une CMI égale à la concentration critique (1 mg/L).

Pour 3 souches, aucun résultat VITEK2 n'a pu être obtenu (échec). Sur les 79 autres souches, la galerie P668 en catégorisait 45 DAP-R. Le CA et l'EA avec le Sensititre étaient respectivement de 82,3 et 92,4%, avec 10,3% d'ETM et 25% d'EM. Les 14 souches discordantes S/R ou R/S avaient toutes des CMI à 1 ou 2 mg/L en Sensititre.

En Etest, 68/82 souches étaient catégorisées DAP-R. Le CA et l'EA avec le Sensititre étaient respectivement de 65,9 et 90,2%, avec 0% d'ETM et 66,7% d'ETM. Les 28 souches discordantes étaient toutes des fausses DAP-R en Etest ; 22/28 avaient une CMI à 1 mg/L en Sensititre.

**Conclusion :** Malgré la sélection de souches majoritairement résistantes à la daptomycine et/ou avec des CMI proches de la concentration critique, cette étude montre globalement une bonne corrélation entre la galerie VITEK2 P668 et la microdilution pour la daptomycine. En revanche, la bandelette Etest semble surestimer la CMI (effet inoculum ?) avec de nombreuses CMI trouvées R à 1,5 mg/L (n=22), non confirmées par les 2 autres techniques dans 59% des cas.

## Activité anti-staphylocoques des lysines de bactériophage

Le CNR a établi une collaboration avec la société ContraFect Corporation (Yonkers, NY, USA), spécialisée dans le développement de nouvelles molécules antibactériennes de la classe des lysines de bactériophages, dont l'activité est prometteuse dans le cadre de la lutte contre l'antibiorésistance. La molécule Exebacase a démontré une efficacité clinique contre les infections à staphylocoques et est notamment en cours d'évaluation dans le cadre du traitement des infections sur prothèse ostéo-articulaires (essai randomisé de phase 1b/2 monocentrique, Hospices Civils de Lyon). Pour permettre l'inclusion de patients dans cet essai ou plus largement l'accès à cette molécule dans le cadre de traitements compassionnels, le CNR est le centre référent français pour la réalisation de la détermination de la sensibilité à cette molécule grâce à une méthode de référence développée par ContraFect Corporation et validée par le CLSI. Nous avons réalisé une validation de cette technique au CNR pour les souches de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative et étudié la distribution des valeurs de CMI pour une collection de souches françaises responsables d'infections ostéoarticulaires sur prothèse (*S. aureus* (n=150) et Staphylocoques à coagulase négative (SCN) (n=150)).

## Puces à ADN

A la suite de la fin de commercialisation du précédent kit de typage *S. aureus* genotyping kit 2.0 (Alere technologies) qui remplaçait l'ensemble de techniques PCR du CNR grâce à la détection simultanée de 336 gènes ou allèles de gènes, les analyses par PCR en secours ou complément du séquençage WGS ont été remises en place. Au cours de l'année 2022, l'industriel fzmb GmbH a remis sur le marché un kit de typage basé sur la même technologie de puces à ADN (INTER-ARRAY Genotyping kit *S. aureus* – fzmb GmbH). Ce nouveau kit permet la caractérisation des mêmes facteurs de virulence/résistance et un typage des souches similaires au kit utilisé antérieurement au CNR. Concernant les facteurs de virulence, la puce assure la détection : (i) de l'ensemble des gènes codant les toxines staphylococciques connues à ce jour ainsi que de certains variants ; (ii) des gènes codant 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*). Dans l'optique de réintégrer cette technique en secours/renfort des analyses réalisées par séquençage, le CNR, a sélectionné un panel de 105 souches couvrant à la fois la diversité de facteurs de virulence et de fonds génétiques (clones) rencontrée en France et 6 souches de contrôles de qualité internes afin d'évaluer les performances de ce nouveau kit de typage (n=111 souches au total). Ces souches ont été caractérisées préalablement par techniques de PCR et/ou WGS afin de pouvoir comparer les résultats obtenus via les différentes méthodologies accréditées du CNR. Les résultats obtenus sont très satisfaisants avec des correspondances entre PCR et puces à ADN comprises entre 97.8 % et 100 % et des correspondances entre séquençage WGS et puces comprises entre 98.3 % et 100% pour les 20 facteurs de virulence évalués. Quelques discordances au niveau du typage du système *agr* (4,3 % discordances) ont été observées et les raisons expliquant ces discordances sont en cours d'investigation en collaboration avec l'industriel. Aux vues des excellentes concordances obtenues au cours de l'évaluation de cette technique et des améliorations en cours en collaboration avec l'industriel, un dossier d'accréditation est en cours de rédaction et sera déposé fin de l'année 2023.

## 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. Entre 2017 et 2022, nous avons notamment transmis à plusieurs laboratoires français (notamment dans les territoires d'Outre-mer) et étrangers des 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 Panton Valentine.

## 2.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve la totalité des échantillons (congélation à -20 °C) qui lui sont adressés qu'il s'agisse de souches cliniques, de souches type ou de référence, de sérums et autres prélèvements cliniques (pus, biopsies...). Il dispose aussi d'une DNAtèque de la totalité des souches reçues au laboratoire depuis 2005 (Cf Annexe 1).

Entre 2006 et 2022, le CNR a reçu 38 750 souches de staphylocoques pour expertise (Figure 2) 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).

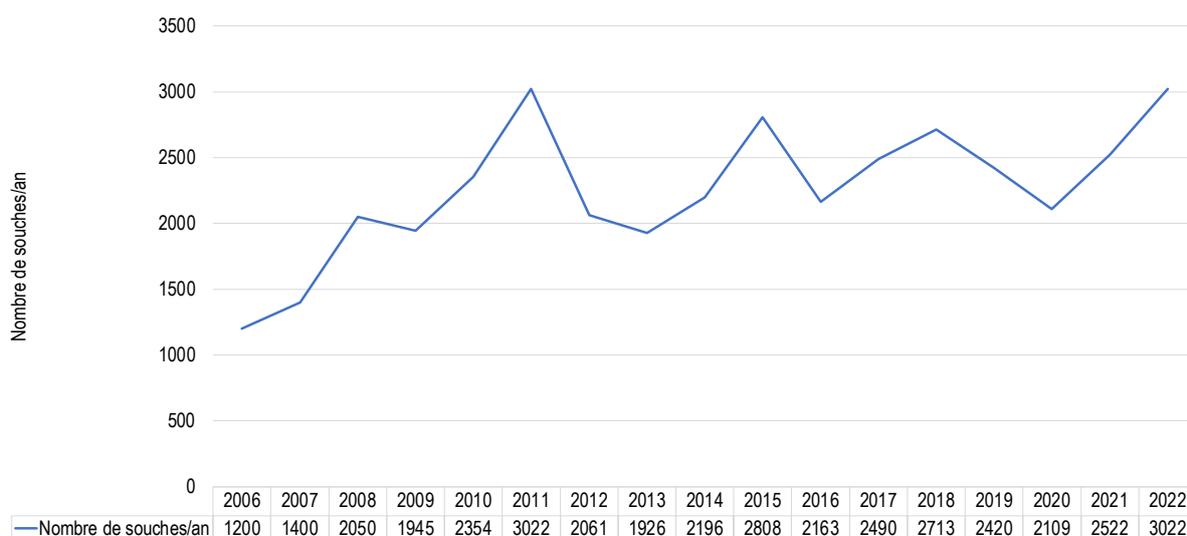


Figure 2- Évolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2022.

En 2022, le CNR des Staphylocoques a reçu **730 souches** dans le cadre de protocoles ou travaux de recherche de nos correspondants en France ou à l'étranger.

En 2022, Le CNR a envoyé **230 souches** bactériennes à des fins de transfert de technique (témoins PCR) et de collaboration scientifique.

Les envois ont été réalisés majoritairement vers des laboratoires hospitaliers et de recherche publique en France (CIRI Lyon, ANSES, CHU Brest, CHU Paris Necker, APHP) et en Europe (organisation d'un contrôle de qualité européen, envoi vers 17 laboratoires répartis au sein de 13 pays européens).

Trois envois de souches vers des collaborateurs privés ont également été réalisés (bioMérieux (n=19), Evotec (n=1)).

## 2.5 Activités d'expertises

En 2022, le CNR a reçu **2303 souches** bactériennes pour expertise (virulence, résistance et lien de clonalité) hors protocoles. Le tableau ci-dessous synthétise brièvement le nombre de souches et leur provenance (LABM vs. Laboratoires hospitaliers) et les proportions associées. Toutes les souches expertisées dans le cadre des activités de routine sont originaires de France métropolitaine et des DROM COM.

**Tableau 1-** Nombre de souches reçues au CNR en 2022 et leur provenance.

	Virulence		Résistance		Lien de clonalité		Total	
	Nbre souches	(%)	Nbre souches	(%)	Nbre souches	(%)	Nbre souches	(%)
Laboratoires hospitaliers	1042	45,24	531	23,06	388	16,85	1961	85,15%
LABM	266	11,55	58	2,52	18	0,78	342	14,85%
Total	1308	56,79	589	25,58	406	17,63	2303	100,00%

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

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

Toutes les souches reçues pour **expertise résistance** ont bénéficié d'une détermination de la sensibilité aux antibiotiques antibiogramme par microdilution grâce à une plaque à façon Sensititre (ThermoFisher). Une partie des souches (52%) a été séquencée pour élucider des mécanismes de résistance (par exemple au linézolide) ou des discordances entre méthodes phénotypiques et génotypiques.

Le **délai de réalisation moyen d'une expertise** (hors clonalité) est d'environ 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. Dans le cadre d'investigation d'épidémies, le délai moyen de rendu est d'environ trois semaines mais peut varier en fonction du nombre de souches et de leur arrivée.

En 2022, nous avons reçu **730 souches** pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

## 2.6 Activités de séquençage

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

Au total, en 2022, **3142 souches** ont été séquencées y compris dans le cadre de protocoles du suivi de la résistance aux antibiotiques. **1984** des 2303 souches (hors protocole) reçues au CNR (86%) ont été séquencées.

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès : interne aux Hospices Civils de Lyon (plateforme GenEPII)
	Technologie/matériel : Le CNR a accès à la plateforme de séquençage GenEPII qui dispose de plusieurs automates : un starlet (Hamilton) pour l'aliquotage, 1 extracteur haut débit Sp960 (MGI) un extracteur bas débit Maxwell (Promega), 1 DremPrep (Tecan), 2 Dragonfly (SPTLabtech), 3 Mosquito HV (SPTLabtech) et un Epimotion (Eppendorf) pour la préparation des librairies, un Qubit (ThermoFisher) et une TapeStation (Agilent) pour la quantification et la qualification des librairies, un Nextseq 550, un Novaseq 6000 (Illumina®) et un GridION (Nanoporetech) pour le séquençage des librairies. Le CNR a également en interne un extracteur Maxwell (Promega) et un séquenceur MinION (Nanoporetech).

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès : interne
	Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics®) pour détection des gènes de virulence/ <i>mecA</i> et <i>mecC</i> , pipeline interne pour analyses de clonalité et expertise des mécanismes de résistance Par ailleurs, la plateforme possède également les ressources pour l'analyse et le stockage des données générées avec plusieurs stations de calcul informatique utilisables à distance dont une station de calcul GPU, 2 serveurs de stockage sécurisés à la direction des systèmes numériques (DSN) des Hospices Civils de Lyon, un accès sécurisé (payant) à un cluster de calcul haute capacité (Université de Grenoble) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologistes développant conjointement des outils d'analyse mutualisés pour les différents services.

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Surveillance des infections (détection des gènes de virulence, typage et détection des mécanismes de résistance, notamment au linézolide cf paragraphe 3), et investigations d'épidémies (cf paragraphe 4).

### Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

La majorité des analyses de données de séquençage de souches de *S. aureus* est réalisée grâce aux modules d'analyses bio-informatiques proposés par le logiciel commercial BioNumerics® (BioMérieux) pour la détection des gènes de virulence et de résistance à la métilicine afin de rendre ce traitement de données accessible à l'ensemble des biologistes et techniciens du CNR sans besoin de formation avancée en bio-informatique. En parallèle, un « pipeline maison » construit avec des outils exclusivement « open-source » lancés en ligne de commande permet de compléter les besoins d'analyse du CNR.

Les objectifs des analyses de séquençage des souches de staphylocoques sont :

#### i) Identification de souches de staphylocoques

En cas de difficultés d'identification malgré le recours à la technique de première ligne (MALDI-TOF), le séquençage du génome entier des souches de staphylocoques peut être utilisé. L'identification de l'espèce est faite en utilisant FastANI (pour déterminer le « average nucleotide identity » de génomes entiers, ref : <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>) et une base de données construite avec un génome de chaque

espèce du genre *Staphylococcus*. Cette approche a l'avantage d'être très rapide et de permettre d'identifier des espèces avec très peu de souches connues.

#### ii) Analyse de la virulence de *S. aureus*

La recherche des gènes codant pour des facteurs de virulence, tels que les entérotoxines staphylococciques, exfoliatines, toxine du choc staphylococcique TSST-1 et leucocidine de Panton-Valentine (PVL), est réalisée par approche de « blast » du génome assemblé versus une base de données publique de facteurs de virulence de *S. aureus*, VirulenceFinder<sup>1</sup>, implémentée dans la suite BioNumerics®. Cette approche intervient en première ligne par rapport aux autres techniques disponibles au CNR (puces à ADN, PCR multiplex).

#### iii) Typage MLST

Le typage des souches de staphylocoques, basé sur la technique MLST, est réalisé par un blast des génomes assemblés versus des schémas de référence de combinaisons d'allèles disponibles sur des bases publiques (PubMLST pour 7 espèces de staphylocoques, <https://pubmlst.org/>, et <https://bigsd.bpasteur.fr/staphlugdunensis/> pour *S. lugdunensis*). L'ensemble de ces 8 bases de données est installé localement au CNR et mis à jour régulièrement.

#### iv) Détermination de liens de clonalité – surveillance épidémiologique

Les analyses pour la recherche de lien de clonalité sont réalisées grâce à un pipeline maison constitué des étapes suivantes :

- Assemblage des génomes et typage MLST +/- élément SCC*mec* pour vérifier l'appartenance au même fond génétique

- Les souches appartenant au même fond génétique sont comparées à l'aide d'une souche de référence disponible dans les bases de données ou choisie parmi la collection d'intérêt (e.g. la souche la plus ancienne) pour l'alignement des reads. L'alignement des reads et l'appel de variants sont réalisés en utilisant le logiciel Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>). Ceci permet d'extraire un alignement des SNP des régions génomiques conservées entre l'ensemble des souches comparées, c'est à dire les SNP du « core-genome ». Une matrice de distances entre chaque paire de souches (« pairwise distance matrix ») et un arbre phylogénétique sont calculés à partir de cet alignement. Enfin, la distance entre les souches, la structure de la phylogénie et l'horloge moléculaire (pour les comparaisons de souches de *S. aureus*) sont ensuite utilisées pour évaluer le potentiel lien de clonalité entre les souches.

Pour les souches de *S. aureus*, le recours au NGS peut être réalisé en deuxième intention après le typage du système *agr* (PCR multiplex) pour permettre un premier filtre (exclusion de liens de clonalité si types *agr* différent) afin de limiter le coût des analyses.

#### v) Analyse du résistome et typage de la résistance à la méticilline

La détection de l'ensemble des gènes connus comme codant pour une résistance aux antibiotiques est réalisée par une approche de « blast » du génome assemblé versus une base de données publique dédiée aux résistances, ResFinder<sup>2</sup>. Ces analyses peuvent être réalisées à partir de la suite BioNumerics® (souches de *S. aureus*, gènes *mecA/mecC*) ou grâce à un pipeline maison. La caractérisation de l'élément mobile SCC*mec*, porteur du gène *mecA* conférant la résistance à la méticilline est également importante pour le typage des clones de SARM. Elle est réalisée par une approche similaire de blast des génomes assemblés contre 3 bases de données publiques installées localement de l'outil SCC*mec*Finder<sup>3</sup>. Elles comprennent i) les différents allèles de recombinases, les différents allèles des IS1272 et les différents allèles des gènes composant le complexe *mec*

<sup>1</sup> Joensen KG et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1501-10.

<sup>2</sup> Bortolaia V et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020 Dec 1;75(12):3491-3500.

<sup>3</sup> Kaya H et al. SCC*mec*Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. mSphere. 2018 Feb 14;3(1):e00612-17.

(*mecA* ou *mecC*, *mecR* et *mecl*), ii) une base de données codant pour les différentes insertions des IS341 et iii) une base de données composée des éléments SCC*mec* I à XIII complets.

Le recours au séquençage NGS pour l'identification des mécanismes de résistance est principalement utilisé en deuxième ligne après confirmation par technique phénotypique et screening PCR (gènes *mecA/C*) pour identification des déterminants génétiques des mécanismes de résistance i) au linézolide, ii) des discordances entre techniques phénotypiques et moléculaires de la résistance à la méticilline.

#### Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

406 souches envoyées pour recherche de lien de clonalité ont été séquencées au CNR en 2022.

#### Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Nombre de souches séquencées dans l'année : **1578 (hors investigation d'épidémie)**

Modalités de sélection des souches pour séquençage : toutes les souches reçues pour identification de facteurs de virulence (**1272** souches en 2022) avec caractérisation des grands clones de *S. aureus* (SASM/SARM) diffusant en France. Concernant la résistance, le séquençage est utilisé pour typer et détecter des mécanismes de résistance (**306** souches en 2022).

#### Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les **bases de données fermées** : Base de données interne du CNR (serveurs sécurisés HCL dédiés avec copie et sauvegarde régulières).

Dans des **bases de données publiques** (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Les séquences brutes (FastQ) des souches séquencées au CNR et utilisées dans des études/publications auxquelles le CNR est associé, sont déposés dans la base de données publique European Nucleotide Archive (ENA).

## 2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Tous les laboratoires correspondants du CNR peuvent demander l'accès aux données brutes et/ou aux assemblages de souches d'intérêt ou précédemment envoyées. Pour ceci, il suffit de faire une demande au CNR et un envoi des données est organisé dans le cadre d'un MTA.

Ainsi, en 2022, le CNR a partagé des séquences avec :

- ONIRIS (Nantes) : partage de 6 génomes et les reads (*S. aureus anaerobius*)
- CIRI équipe VirStaph : 53 génomes et les reads associés (projet rechutes IOA)
- RHU protéomique : 600 génomes de *S. aureus* couvrant la diversité des fonds génétiques et des marqueurs de virulence pour aider à définir les séquences de peptides ciblant les différents marqueurs.

### 3. Activités de surveillance

#### Éléments clés en termes de surveillance :

- Augmentation du nombre de souches reçues responsables d'impétigo bulleux
- Stabilité du nombre de souches d'infections suppuratives avec un fort taux de PVL (>70%, 98.2% dans les infections primitives)
- Poursuite de l'émergence des CC152 MRSA PVL
- Nombre élevé de souches de staphylocoques résistantes au linézolide reçues
- Nombre élevé de demandes 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 proviennent majoritairement de l'ensemble des CHU et CHG de France métropolitaine (85,15% des souches) mais aussi, de manière croissante, de LABM (14.85% en 2022 vs. 13.4% en 2021).

En 2022, le CNR a reçu **2303 souches pour expertise** (virulence, résistance et recherche de clonalité) hors protocoles. Environ 57 % des souches ont été envoyées au CNR pour expertise de virulence, 17,6 % pour recherche de clonalité et 25.6% des souches pour analyse de leurs propriétés de résistance. Ces souches provenaient de **89 département métropolitains** ou des DROM COM (représentativité de 89/101 départements soit 88% des départements couverts). Plus de 73 % des souches provenaient de 7 régions principales : 25 % (Auvergne Rhône-Alpes), 14 % (Ile de France), 8 % (Provence-Alpes-Côte d'Azur), 8 % (Hauts de France), 7 % (Nouvelle Aquitaine), 6 % (Bretagne), 6 % (Grand Est), et < ou = 5% pour chacune des autres régions (Figure 3). Huit pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Ile de la Réunion, Tahiti), quatre souches ont été reçues de Monaco.

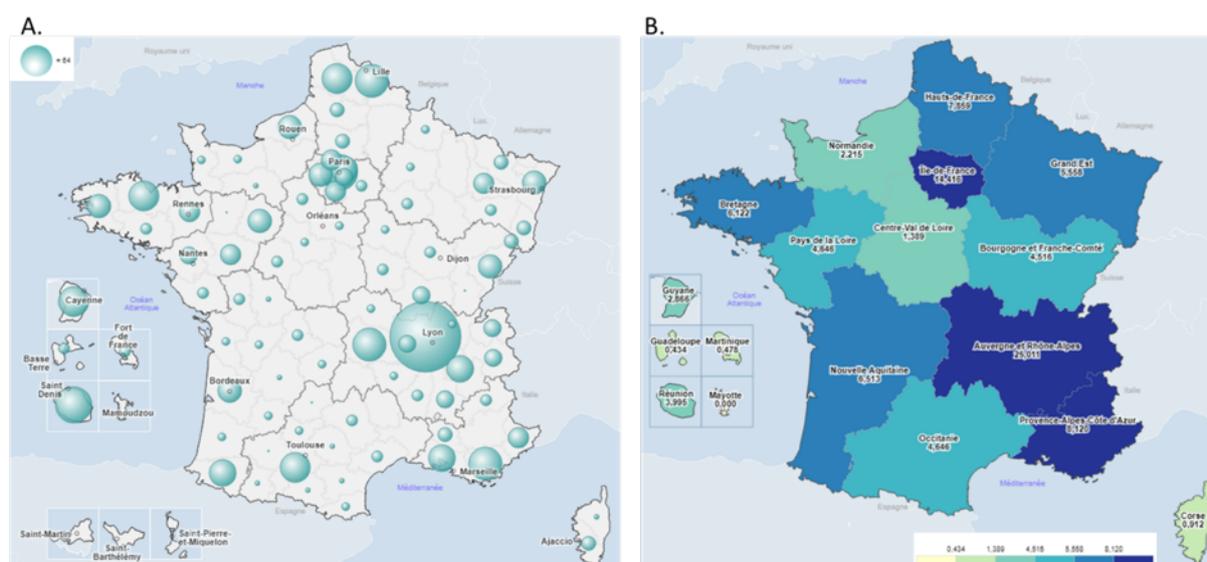


Figure 3- Répartition géographique des souches reçues en 2022 pour expertise (recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques).

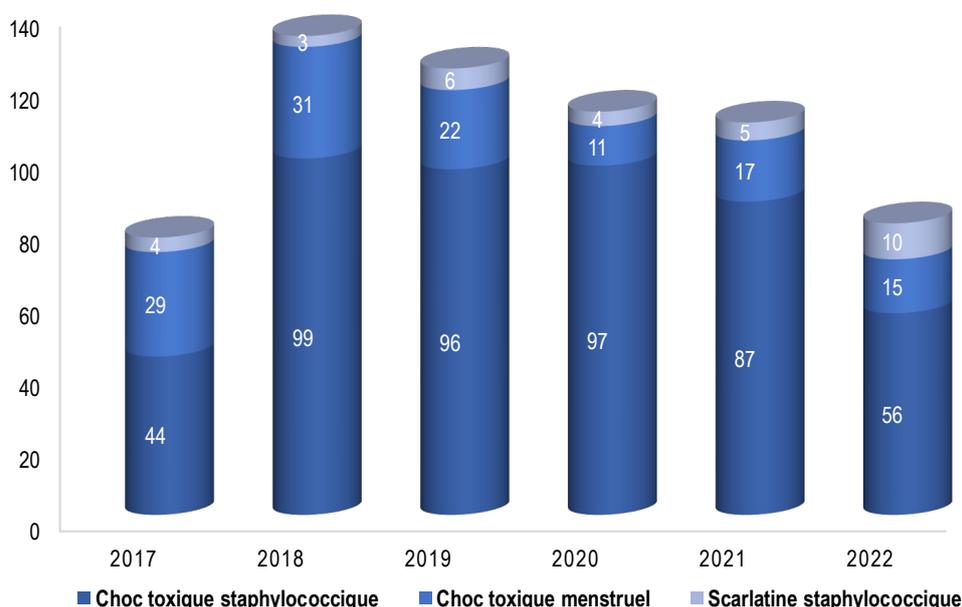
A. représentées en nombre de souches reçues par département. B. représentées en proportion de souches reçues par région.

Le réseau de partenaire n'a pas subi de franche évolution entre 2021 et 2022 avec toutefois une proportion moindre de souches provenant de la région ARA (25 % en 2022 contre 42 % en 2021) et une augmentation / homogénéisation des proportions de souches reçues pour les autres régions. La représentativité des analyses à l'échelle nationale a donc été améliorée cette année.

## 3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

### 3.2.1 Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique

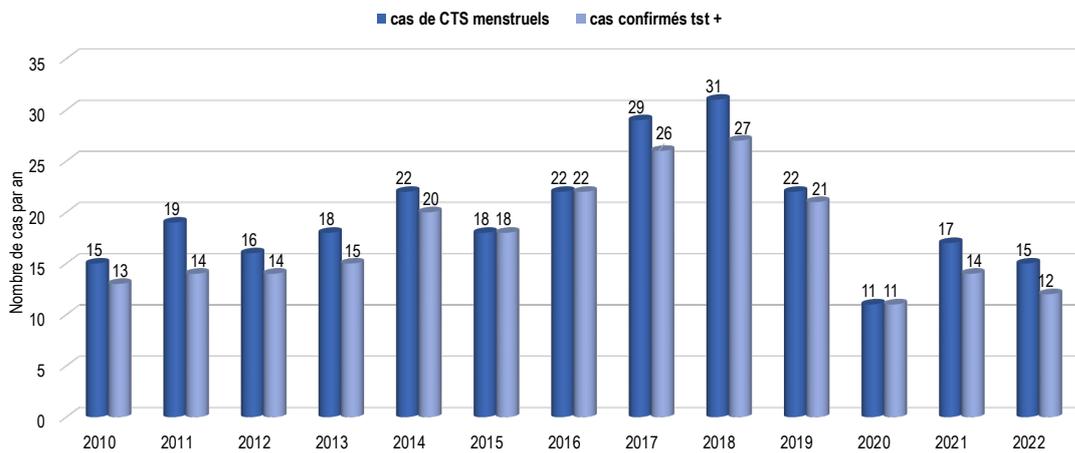
Depuis 2017, le CNR a analysé **604** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et **32** souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 4).



**Figure 4-** Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2017 et 2022.

En 2022, le CNR a analysé **71** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et 10 souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique.

Parmi ces souches, **15 cas de CTS menstruels** ont été rapportés. L'âge des patientes s'étend de 13 à 40 ans avec une médiane de 33 ans. Douze souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1 et 11 souches isolées appartenaient au complexe clonal CC30, clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. 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 5). On note cependant une légère diminution du nombre de souches reçues au CNR depuis 2020. Cependant il reste difficile à déterminer si cette diminution est liée à un manque d'envoi des souches au CNR plutôt qu'à une vraie diminution de la prévalence de cette pathologie. En effet, à la suite du lancement de l'enquête IPRO-CTSM (paragraphe 3.5.1), nous observons une légère augmentation des cas signalés à confirmer lors de notre prochain rapport d'activité.



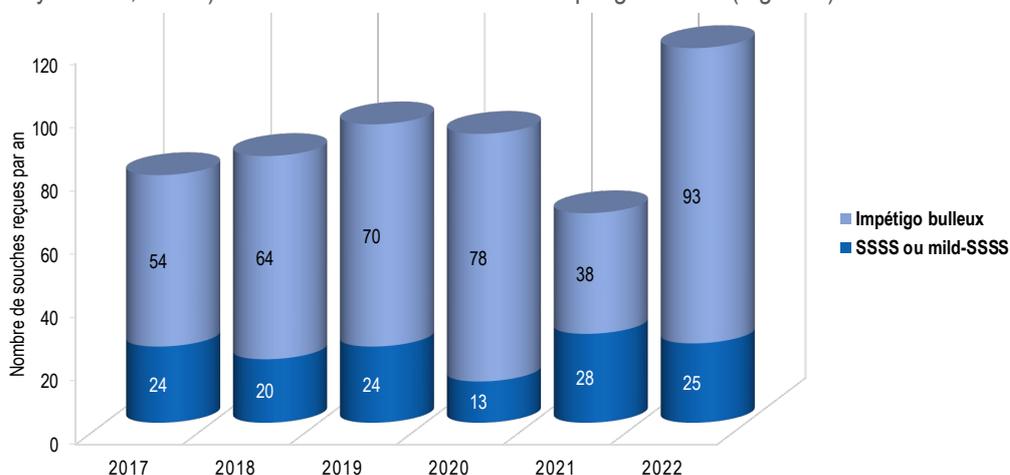
**Figure 5-** Évolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle (CTS menstruel) entre 2010 et 2022. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tsst-1*.

Dix cas de scarlatine staphylococcique ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 1 à 84 ans avec une médiane d'âge de 12 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ est de 1,5. Cinq de ces souches étaient résistantes à la méticilline et 4 souches possédaient le gène codant la TSST-1.

Concernant les 56 autres souches (choc toxiques non menstruels et hors scarlatine), les chocs sont survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. L'âge des patients s'étend de 0 à 91 ans avec une médiane d'âge de 43 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 2,2. Quatre souches étaient résistantes à la méticilline (SARM) et aucune de ces souches de SARM ne possédaient la toxine TSST-1. Concernant les souches de SARM, 19 souches (34%) possédaient au moins le gène codant la TSST-1 et la majorité de ces souches appartiennent au clone CC30-MSSA. Parmi les souches négatives pour le gène codant la TSST-1, 14 possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB, SEC) tandis que 2 souches possédaient uniquement le gène codant l'entérotoxine P.

### 3.2.2 Syndrome d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2017, le CNR a analysé au total 531 souches isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 134 cas de maladie exfoliante généralisée (staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) ou de mild SSSS et 397 cas d'impétigo bulleux (Figure 6).



**Figure 6-** Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2017 et 2022.

En 2022, le CNR a analysé **118 souches** de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont **25 cas de maladie exfoliante** généralisée et **93 cas d'impétigo bulleux**.

Pour les **25 cas** de patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique** classique, l'âge s'étend de quelques jours à 85 ans avec une médiane à 3,82 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 2,1. Les profils toxiques révélèrent :

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

Parmi les 25 souches associées aux cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique, deux souches de SARM ont été retrouvées.

**Concernant les impétigos bulleux** en 2022, l'âge des patients s'étend de quelques jours à 30 ans avec une médiane de 6,33 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1,02. L'analyse du profil toxique de ces souches a permis de révéler :

- 60 souches possédant les gènes codant ETA et ETB,
- 30 souches pourvues de l'ETA seule,
- 3 souche possédant l'ETB seule.

Parmi les 93 souches associées aux cas d'impétigo bulleux, quatre souches de SARM ont été retrouvées. On constate une nette **augmentation des souches envoyées dans ce contexte au CNR en 2022**.

A noter une épidémie avec des cas groupés d'impétigo bulleux avec un SARM CC121-MRSA-V producteur des exfoliatines A et B en région Bretagne. Ce SARM communautaire a la particularité d'être résistant aux aminosides (Cf paragraphe 4. Alertes).

### 3.2.3 Infections suppuratives à *S. aureus* producteur de la leucocidine de Panton Valentine

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 de nombreuses souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 7). En 2022, on constate une légère augmentation du nombre de souches reçues notamment dans un contexte de dermohypodermite non nécrosante. Pour rappel, le CNR ne préconise pas de lui faire parvenir des souches de surinfection ou de colonisation d'escarre-ulcère car l'habillage toxique de ces souches est généralement non contributif et n'entraîne pas de modification de la prise en charge des patients en l'absence d'autres signes cliniques associés.

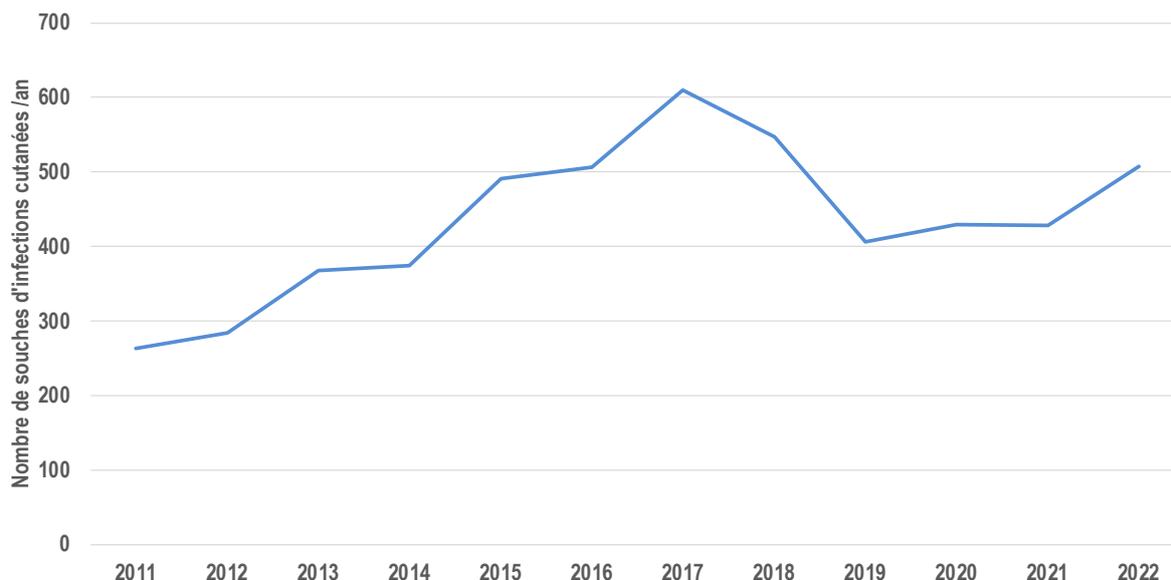


Figure 7- Évolution du nombre de souches reçues dans le cadre d'infections suppuratives (hors épidémies).

Ainsi en 2022, nous avons expertisé **507** souches de suppurations (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, dermohypodermite...) hors épidémies. **La proportion de souches PVL+ est de 74%** au total mais de **98,2%** de lorsque l'on ne considère que les infections primitives (Figure 8).

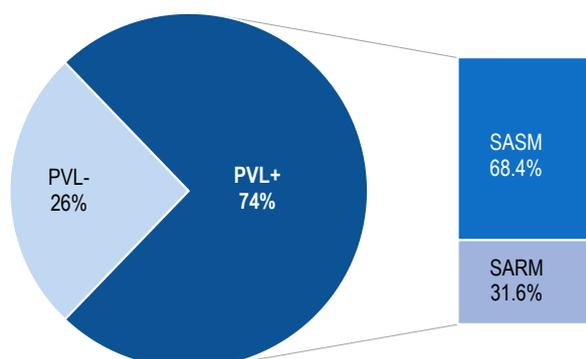


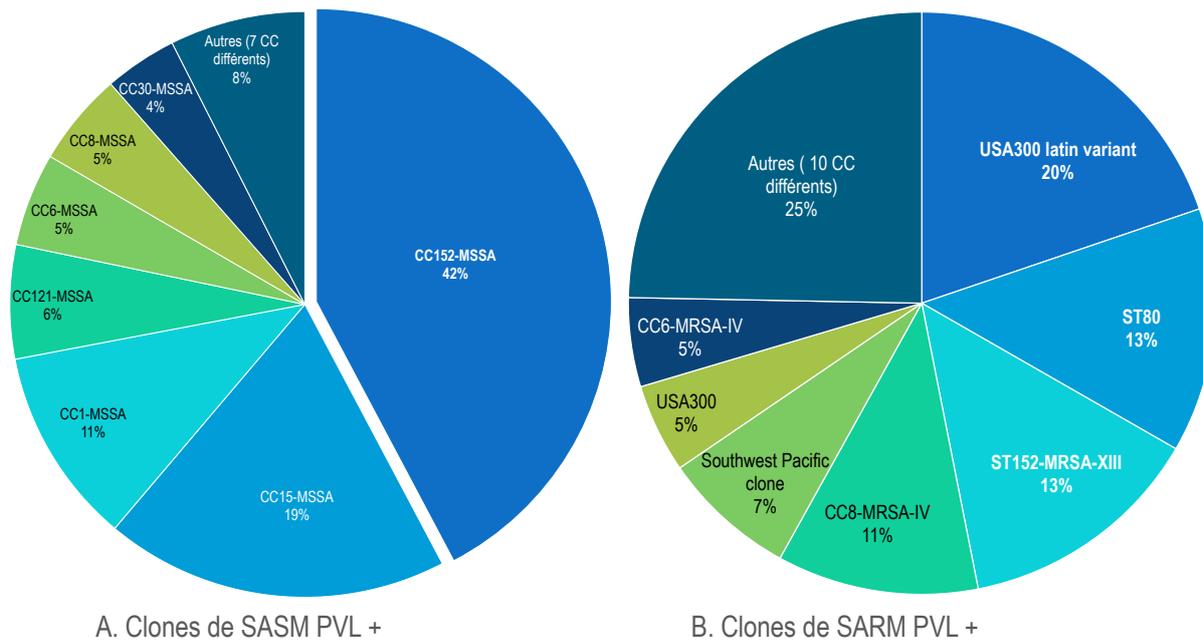
Figure 8- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2022 (n=507).

Parmi les souches PVL+ :

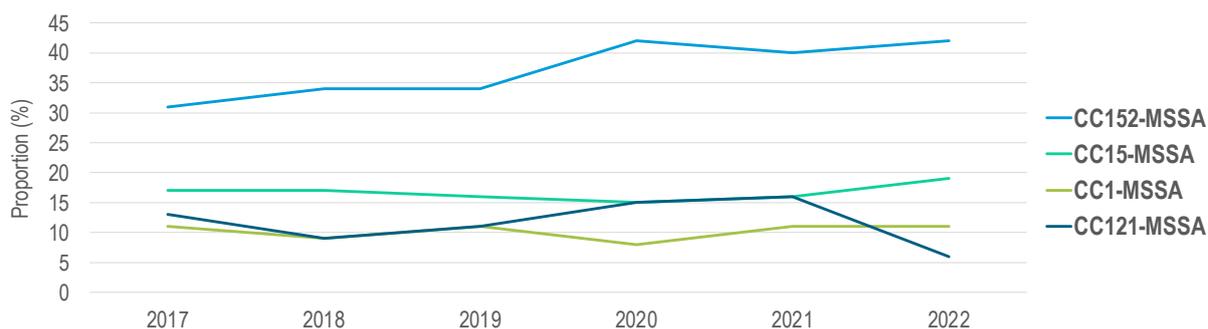
(i) **68,4 % sont des SARM** (Figure 8). On note une grande diversité des clones de SARM PVL. Le clone majoritaire est le clone CC152-MSSA (Figure 9A). Nous observons depuis 2013 une augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal. Il n'était qu'en quatrième position en 2013 et représentait moins de 11% des souches de SARM PVL+ alors que depuis 2015, il est en première position et représentait 27% des souches de SARM PVL+ responsables d'infections suppuratives (Figure 10). En 2022, il représente 42% de ces souches (Figure 9A).

(ii) **31,6 % sont des SARM** (Figure 8). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés. En 2022, comme les trois années précédentes, le clone ST80 (*agr3*, PVL+, *mecA*+) n'est plus le clone de SARM PVL+ le plus prévalent en France. Il représente 13% en 2022 des SARM PVL+ isolés d'infections suppuratives contre 17% en 2019 et 25% en 2018 (Figure 9B et 11). 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 et à se stabiliser (Figures 9B et 11). 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<sup>4,5</sup>.



**Figure 9-** Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ (SASM et SARM) responsables d'infections suppuratives en 2022



**Figure 10-** Évolution des clones SASM PVL+ responsables d'infections suppuratives entre 2017 et 2022.



**Figure 11-** Évolution des clones de SARM PVL+ responsables d'infections suppuratives entre 2017 et 2022.

<sup>4</sup> Stegger M et al. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. mBio. 2014 Aug 26;5(5):e01044-14.

<sup>5</sup> Glaser P et al. Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage. mBio. 2016 Feb 16;7(1):e02183-15.

Il convient de poursuivre la surveillance du clone **CC152-MSSA PVL+**. En effet, on note une nette augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal qu'il s'agisse d'infections cutanées (Figure 10) mais également dans le contexte des pneumonies (cf. paragraphe 3.2.5). Une étude génomique de ce complexe clonal est en cours afin de mieux comprendre son épidémiologie. Par ailleurs, nous observons l'augmentation de la prévalence du clone **CC152-MRSA-XIII PVL +** en France, dont il conviendra de suivre la diffusion (Figure 11) (Cf. paragraphe 3.3.5.2).

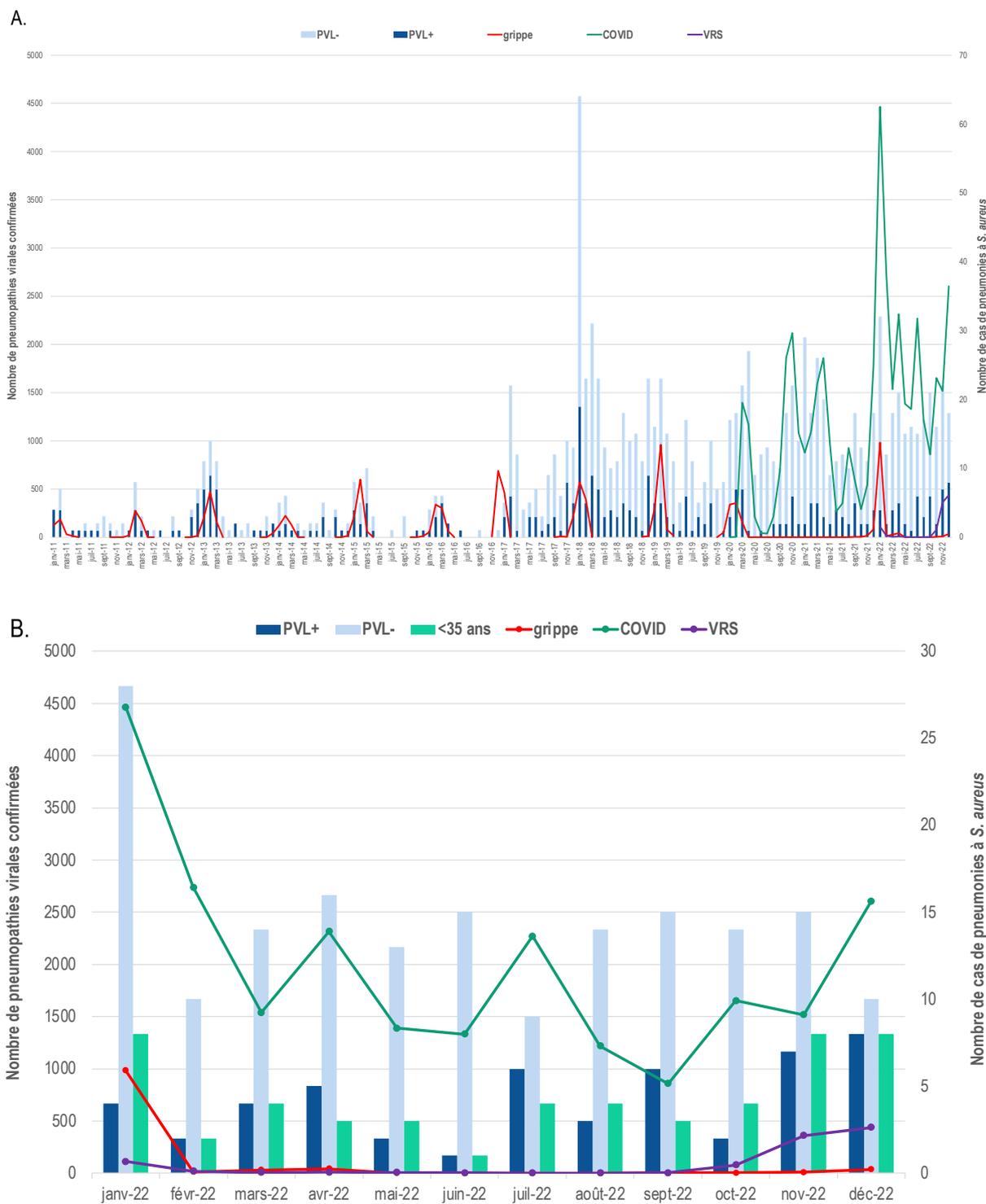
### 3.2.4 Furonculoses familiales

En 2022, **27 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 2022.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu **48 demandes d'expertise** pour recherche de leucocidine de Panton Valentine dans un contexte d'infections cutanées à diffusion intrafamiliale avec différentes souches d'infections et de portage pour chacun des membres des différentes familles.

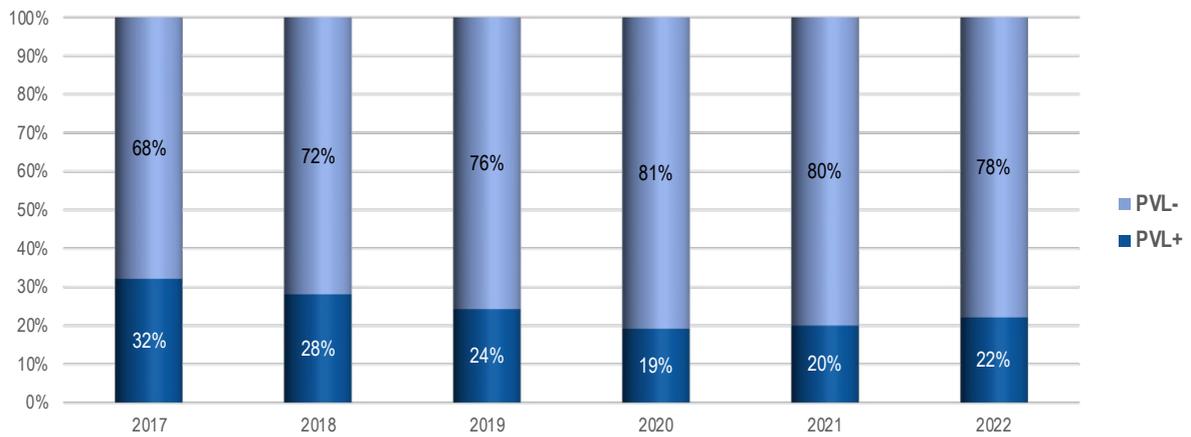
### 3.2.5 Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine

À la suite du PHRC concernant les pneumonies nécrosantes entre 2010 et 2015, un parallélisme a été vu entre les pics de l'épidémie grippale et une augmentation de l'incidence des pneumonies communautaires à *S. aureus*, suggérant l'existence d'une relation entre l'infection virale et cette pneumonie. Cette tendance s'est confirmée sur les épidémies hivernales suivantes. Les connaissances acquises faisaient craindre une recrudescence de ces tableaux gravissimes chez les patients atteints de SARS-CoV-2. De la même manière que pour la grippe, une superposition des différentes épidémies grippales, de SARS-CoV-2 ainsi que de VRS ont été réalisées avec le nombre de pneumonies sévères à *S. aureus* (Figure 12). A noter que le nombre de cas de grippe et de SARS-CoV-2 rapportés représente les cas confirmés par le CNR de Lyon mais reflètent les tendances nationales.



**Figure 12- A-**Nombre de cas de pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* au cours des épidémies de grippe, de SARS-COV2 entre 2011 et 2022. L'épidémie de VRS a également été rajoutée à partir de l'année 2022. **B-** Focus sur l'année 2022.

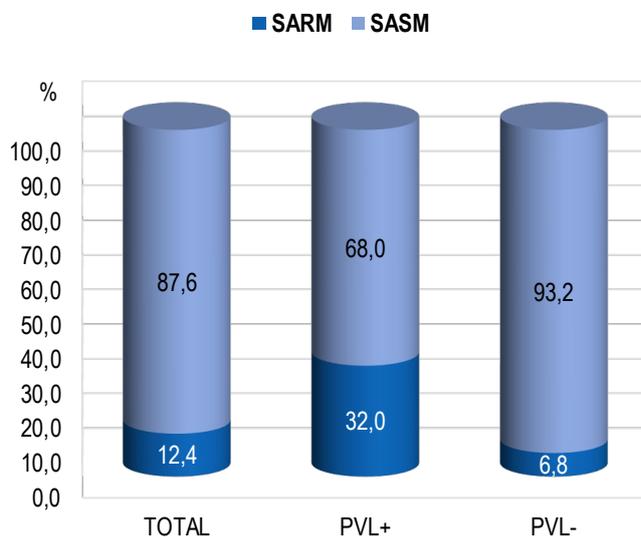
De manière inattendue, les surinfections à *S. aureus* PVL dans les patients infectés à SARS-CoV-2 sont restées marginales et les surinfections documentées à *S. aureus* l'ont été dans des contextes classiques de pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez des sujets de réanimation. On note ainsi une augmentation du nombre de souches envoyées pendant toute la période épidémique du COVID-19 mais ceci concerne majoritairement une augmentation de souches ne produisant pas la toxine PVL (Figure 13).



**Figure 13-** Proportion de souches de *S. aureus* produisant ou non la toxine de Pantone Valentine (PVL) parmi les souches envoyées pour pneumopathies sévères entre 2011 et 2022.

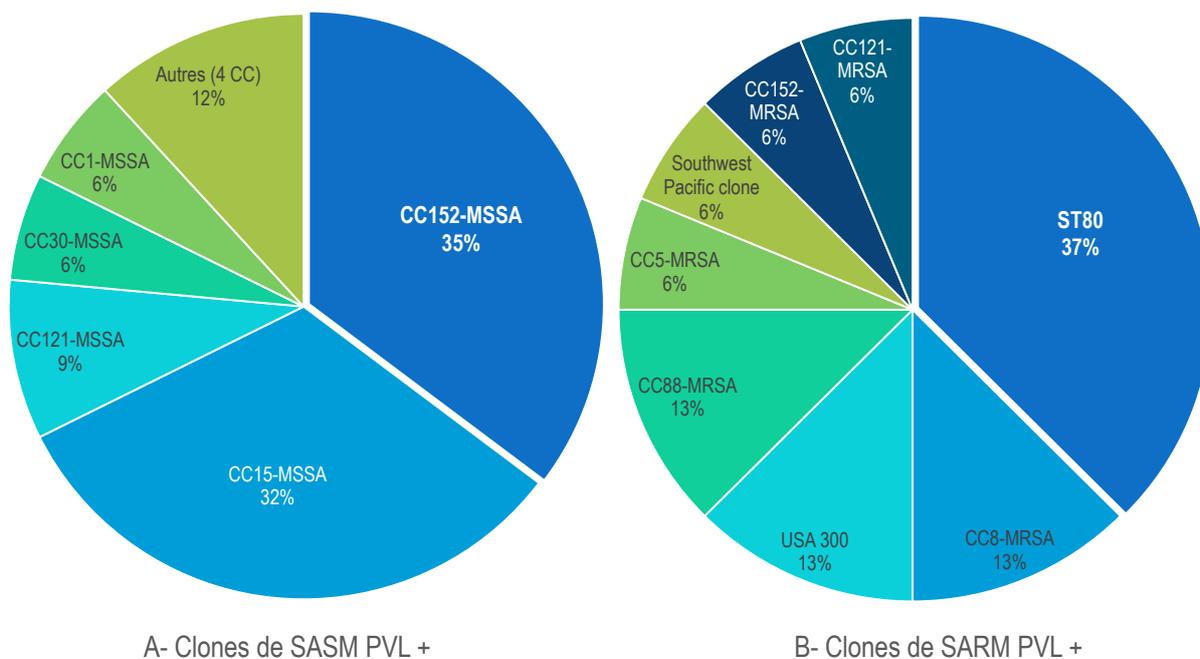
Les résultats suggèrent que la production de PVL ne semble pas associée à la gravité des infections par le SARS-CoV2 en cas de co-infection par *S. aureus* et que ces co-infections ne sont pas associées à certains clones particuliers de *S. aureus*.

En 2022, le CNR a reçu **226 souches** de *S. aureus* dans des contextes de pneumopathies et/ou d'abcès pulmonaires. Parmi ces souches, **50 (22,1%) étaient sécrétrices de PVL**. Comme les années précédentes, la proportion de SARM est plus élevée chez les souches produisant la PVL (32%) par rapport à celles ne la produisant pas (6,8%) (Figure 14).

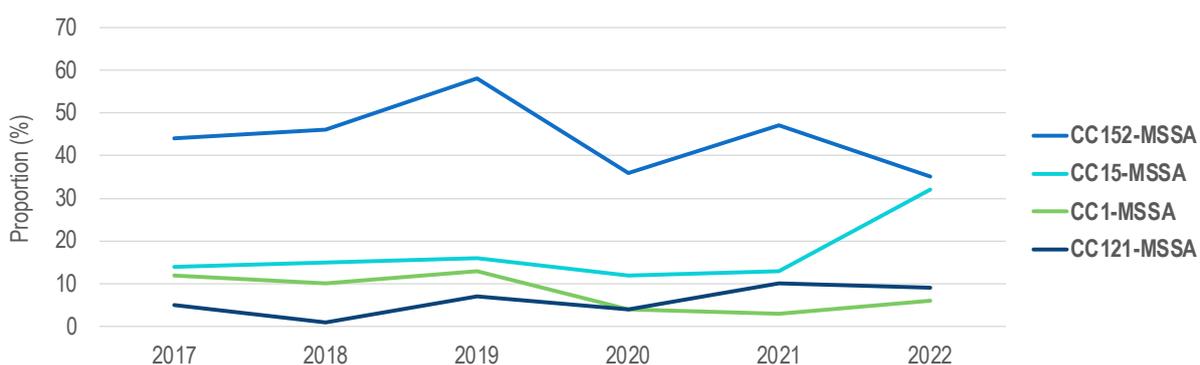


**Figure 14-** Proportion de SASM et de SARM au sein des souches sécrétrices ou non de la leucocidine de Pantone Valentine, parmi les souches isolées dans un contexte de pneumonie en 2022.

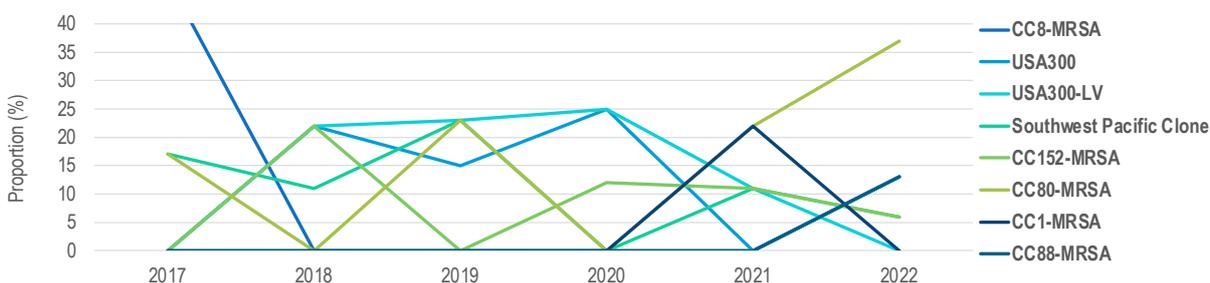
Concernant les clones de *S. aureus* impliqués dans les pathologies PVL+, le clone de SASM majoritaire reste depuis plusieurs années le clone CC152-MSSA (Figures 15A et 16). Ce clone, émergent en France, est le clone le plus impliqué dans la majorité des pathologies en France (bactériémies, pneumonies nécrosantes, autres). Concernant les clones de SARM produisant la leucocidine de Pantone Valentine, les clones diffusants actuellement sont retrouvés avec majoritairement le CC80 et le CC8 (Figures 15B et 17).



**Figure 15-** Caractéristiques des clones de SASM et SARM PVL + responsables de pneumonies en 2022.

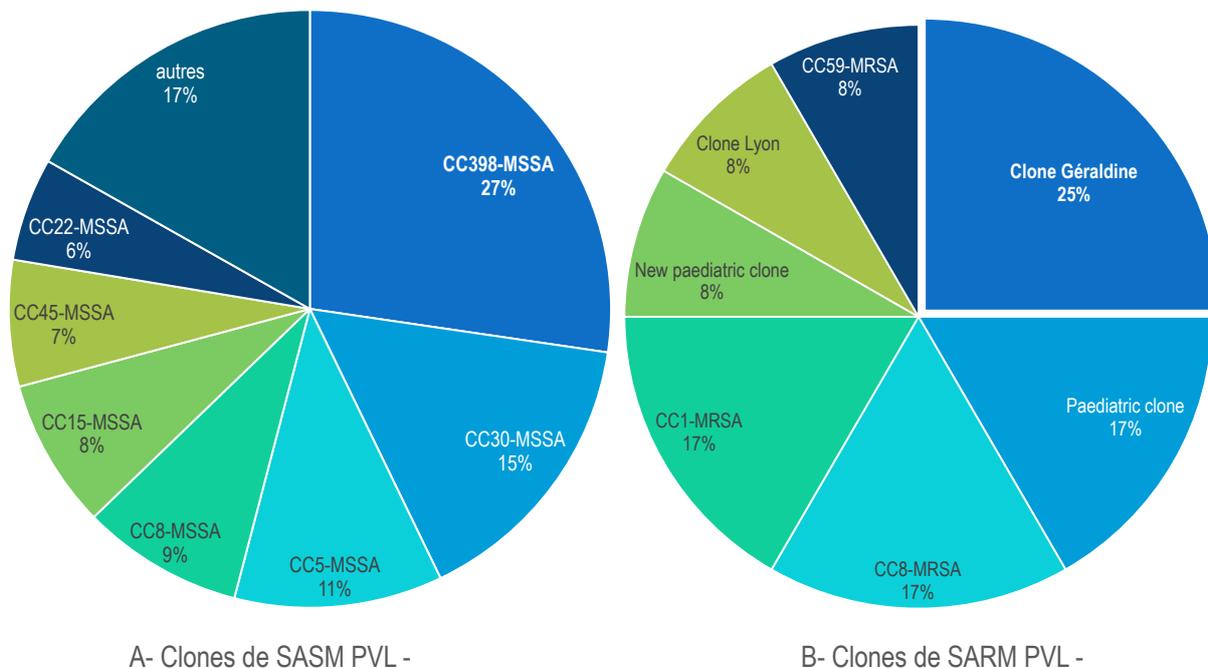


**Figure 16-** Évolution des principaux clones de SASM PVL+ impliqués dans les pneumonies entre 2017 et 2022.

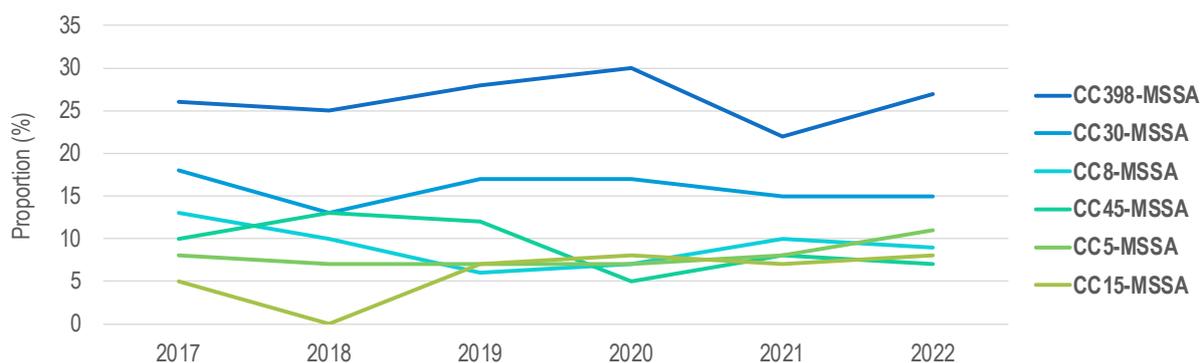


**Figure 17-** Évolution des principaux clones de SARM PVL+ impliqués dans les pneumonies entre 2017 et 2022.

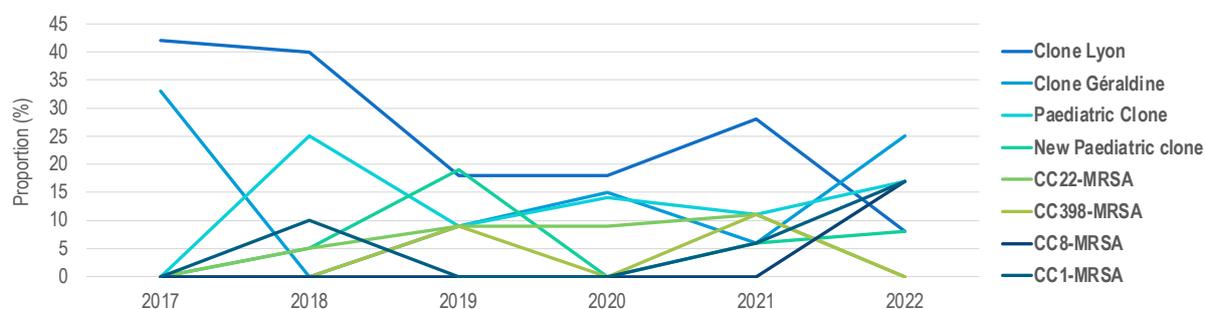
Concernant les clones de *S. aureus* PVL- (SARM et SASM confondus) retrouvés dans les pneumonies sévères PVL-, l'épidémiologie correspond aux clones retrouvés largement en France dans d'autres pathologies avec notamment les clones CC398-MSSA et CC30-MSSA pour les SASM (Figure 18A) et les grands clones nosocomiaux diffusant en France pour les SARM comme le clone Géraldine, le clone Pediatric et New Pediatric (Figure 18B). Cette tendance est stable depuis les 5 dernières années (Figures 19 et 20).



**Figure 18-** Caractéristiques des clones de SASM et SARM ne produisant pas la PVL et responsables de pneumonies en 2022.



**Figure 19-** Évolution des principaux clones de SASM PVL- impliqués dans les pneumonies entre 2017 et 2022.



**Figure 20-** Évolution des principaux clones de SARM PVL- impliqués dans les pneumonies entre 2017 et 2022.

### 3.2.6 Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Dans le cadre de ses missions, le CNR participe à l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives.

En 2022, le CNR a été contacté dans le cadre d'une TIAC mais malheureusement les échantillons n'ont finalement pas été acheminés au CNR.

### 3.2.7 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2011, nous avons expertisé **987** souches d'infections ostéo-articulaires (exclus les « pieds diabétiques » sans ostéite). En 2022, nous avons reçu que **75** souches de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire (Figure 21) pour recherche de facteurs de virulence.

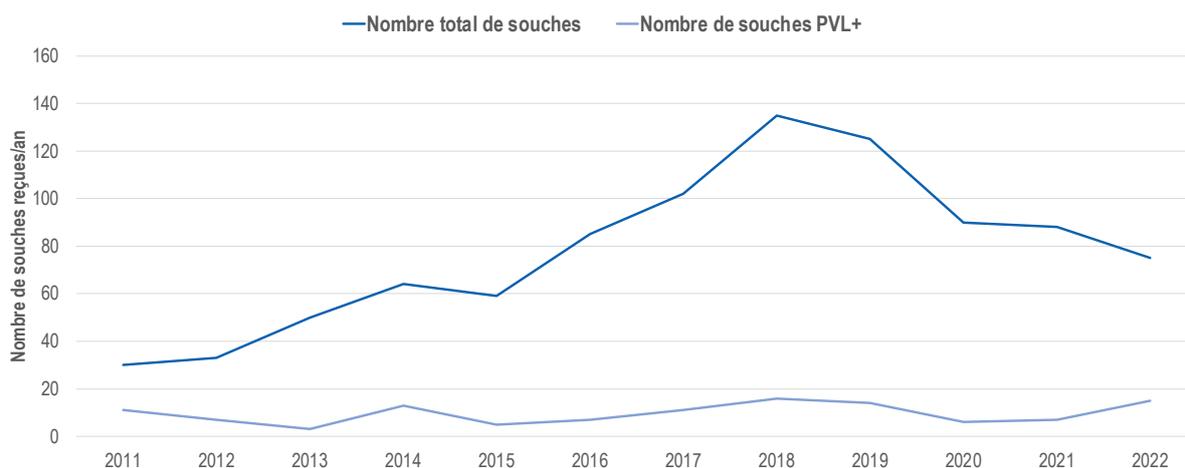


Figure 21- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour infections ostéo-articulaires entre 2011 et 2022.

Les patients étant âgés de 0,15 à 91,5 ans (médiane d'âge 49,40 ans) avec un sexe ratio ♂/♀ de 2,4. Parmi les souches de *S. aureus*, treize étaient des SARM (17,3%) (Figure 22).

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 20% (n = 15) (Onze SASM et quatre SARM) (Figure 22).

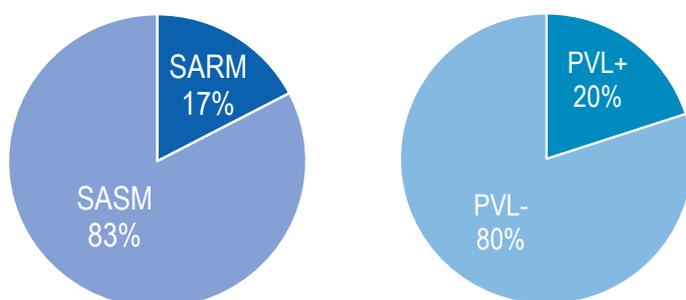
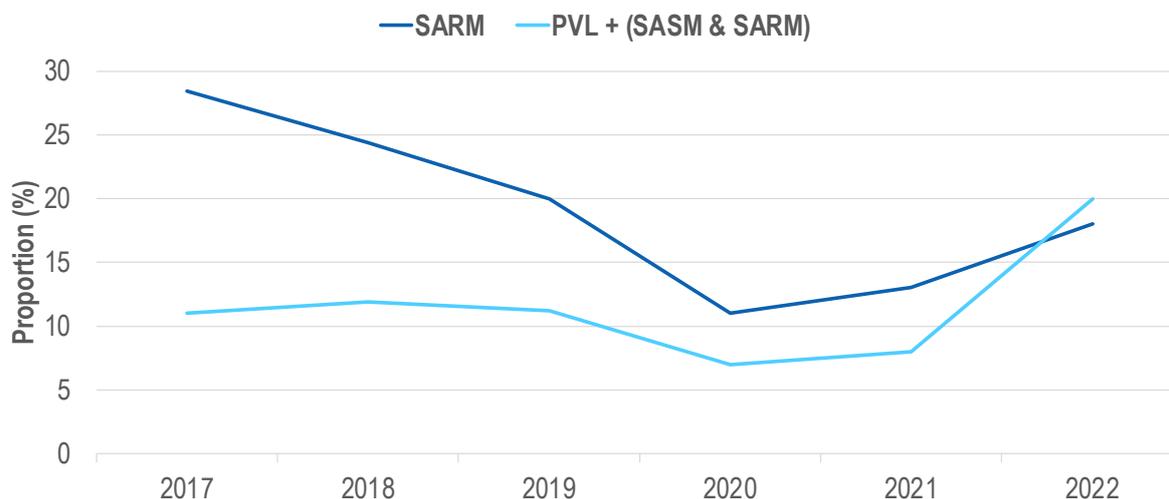


Figure 22- Caractéristiques des *S. aureus* responsables d'infections ostéo-articulaires en 2022 (n=75).

On observe une augmentation du nombre de SARM reçus dans un contexte d'infection ostéoarticulaire de même qu'une augmentation du nombre de souches PVL+ en 2022 (Figure 23).



**Figure 23-** Evolution du taux de SARM et pourcentage de PVL + des souches reçues dans un contexte d'infection ostéo-articulaire au CNR entre 2017 et 2022.

### 3.2.8 Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année 2022, **18 demandes** de sérologies **anti-PVL** (leucocidine de Panton-Valentine) ou **anti-TSST-1** (toxine du choc staphylococcique) ont été adressées au CNR, ce qui correspondait à 17 sérums, versus 35 en 2021. Ce chiffre est faible et reflète les indications assez restreintes de ces sérologies qui ne remplacent pas le diagnostic direct des infections à *S. aureus* par la culture et la caractérisation moléculaire des facteurs de virulence des souches. Il peut aussi être lié à une information insuffisante des biologistes et des cliniciens. Cependant, le site Internet du CNR contient une page précisant les indications et l'intérêt de ces sérologies dans le diagnostic et le suivi des infections staphylococciques à composante toxinique, et les biologistes du CNR conseillent ces sérologies dès qu'ils sont sollicités pour un cas pouvant correspondre à leurs indications.

#### Sérologies PVL

**Quatre demandes**, en provenance de trois hôpitaux ou laboratoires différents, concernaient une **sérologie PVL**. Ces demandes concernaient quatre patients différents : un présentant une forme grave de grippe avec suspicion de surinfection à *S. aureus* PVL-positif, deux présentant des infections cutanées sévères ou récidivantes et un présentant une endocardite infectieuse.

Pour le patient présentant des lésions cutanées atypiques survenues au décours d'une spondylodiscite à *S. aureus*, la souche de *S. aureus* responsable de la spondylodiscite avait été isolée et caractérisée PVL-négative par le CNR. Ce patient présentait une sérologie élevée (15179 UA/mL) à 2 mois du début de l'épisode infectieux, taux similaire à la sérologie qui avait été prélevée en 2021 pour ce même patient à 3 semaines du début de l'infection. Ce taux d'anticorps stable par rapport au prélèvement précédent ne permettait pas de différencier une infection invasive à *S. aureus* PVL-positif d'une cicatrice sérologique (infection ancienne) ou d'une réaction croisée avec l'HlgC (gamma-hémolysine de *S. aureus*, hyperproduite par certaines souches). La souche responsable des lésions cutanées n'ayant pas été envoyée au CNR, nous ne pouvons pas éliminer que la souche cutanée ait été différente de la souche de spondylodiscite et ait pu être productrice de PVL.

Pour deux patients, la sérologie prélevée était positive (>4900 UA/mL) et aucune souche de *S. aureus* n'avait pu être mise en évidence par les cultures bactériologiques. Il s'agissait d'une part d'une patiente présentant des infections cutanées récidivantes avec une sérologie anti-PVL deux fois supérieure au seuil de positivité (11363 UA/mL), ce qui était cohérent avec des infections cutanées liées à une souche PVL-positif. Dans ce cas, il est cependant nécessaire de tenter d'isoler la souche en réalisant des prélèvements cutanés afin de pouvoir tester sa

sensibilité aux antibiotiques, notamment à la mupirocine classiquement utilisée pour décoloniser ces patients. Le second patient présentait un syndrome de détresse respiratoire aiguë lié à une grippe et avait une sérologie positive juste au-dessus du seuil (5382 UA/mL), ce qui ne permettait pas de différencier une surinfection par une souche PVL-positif d'une cicatrice sérologique ou d'une réaction croisée avec l'HlgC.

Pour la dernière patiente, qui présentait une endocardite, aucune souche de *S. aureus* n'a été envoyée au CNR pour expertise de la virulence et la sérologie était négative. Le sérum avait été prélevé précocement après le début des symptômes (5 jours), ce qui ne permettait pas d'interpréter la sérologie puisque le délai était trop court pour qu'une séroconversion ait pu avoir lieu et aucun sérum tardif n'a été reçu pour rechercher une séroconversion. Cependant, le tableau clinique d'endocardite de cette patiente était peu en faveur d'une infection toxique liée à la PVL.

Au total, la sérologie PVL a été potentiellement contributive au diagnostic pour un patient sur les quatre testés, même si chez cette patiente présentant des infections cutanées récidivantes, l'idéal aurait été de pouvoir caractériser la souche responsable des lésions cutanées. Pour les 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**.

### Sérologies TSST-1

**Quatorze sérologies TSST-1** ont été effectuées pour 11 prescripteurs différents. Elles concernaient 11 patients (dont 8 femmes) et étaient négatives dans 71% des cas (n=10). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) pour 6 patientes (55%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) pour 5 patients (45%).

Les sérums en contexte de **MTSS**, reçus pour 6 patientes, étaient séronégatifs pour la TSST-1 dans 8 cas sur 9, et faiblement positif pour le dernier 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 100% des cas au total. Concernant le résultat faiblement positif, il s'agissait d'un sérum prélevé 4 jours après un épisode supposé de MTSS et qui présentait un taux d'anticorps de 68 UA/mL, ce qui est faible par rapport à la moyenne dans la population générale (500 à 1300 UA/mL) et ne permet pas d'écarter une réaction croisée ; la souche isolée au niveau vaginal chez cette patiente ne possédait cependant pas la TSST-1, ce qui ne permettait pas de confirmer le diagnostic de MTSS. Concernant les 5 autres patientes, un sérum prélevé précocement au moment du MTSS avait été reçu pour 4 d'entre elles et était négatif (pour 3 de ces patientes un sérum tardif a été prélevé et a également été trouvé négatif, ce qui est cohérent avec l'absence de séroconversion observée chez la grande majorité des patientes) ; pour la 5<sup>ème</sup> patiente, seul un sérum tardif avait été prélevé et était négatif, démontrant aussi une absence de séroconversion.

Les 5 sérums en contexte de **NMTSS** concernaient 5 patients différents. Nous n'avons reçu un sérum précoce et un sérum tardif pour aucun de ces patients, ne permettant pas d'objectiver une éventuelle séroconversion. Pour 2 des 5 patients, la souche de *S. aureus* avait été isolée par le laboratoire expéditeur et caractérisée au CNR : une possédait la TSST-1, ce qui était cohérent avec le diagnostic de NMTSS, et l'autre ne possédait pas la TSST-1 mais possédait l'entérotoxine B qui est également un superantigène et pourrait donc être à l'origine du tableau de NMTSS de la patiente. Pour les 3 autres patients, la souche de *S. aureus* n'avait pas été isolée ou pas envoyée au CNR et une sérologie ponctuelle sans comparaison possible sérum précoce/sérum tardif n'a pas permis de confirmer ou infirmer le diagnostic de NMTSS. Sur les 5 sérologies, 2 présentaient un taux d'anticorps anti-TSST-1 similaire à celui de la population générale ; 3 étaient négatifs ou avec un titre très faible d'anticorps, ce qui aurait pu être un facteur favorisant le développement d'un NMTSS en cas d'infection par une

souche productrice de la TSST-1, mais ne permet pas d'affirmer le diagnostic de NMTSS en absence de caractérisation de la souche de *S. aureus* responsable de l'infection. Finalement, l'absence de souche de *S. aureus* isolée chez ces 3 derniers patients et l'absence de sérum tardif permettant d'objectiver une séroconversion anti-TSST-1 ne permettent donc pas de conclure sur la possibilité d'un choc toxique non menstruel. Dans ces cas, une sérologie isolée anti-TSST-1 est souvent non contributive pour le diagnostic d'une toxémie à TSST-1. 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**.

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

#### 3.3.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Au total, en 2022, **589 souches** ont été adressées au CNR pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques, en provenance de 146 laboratoires différents. Ceci représente une **augmentation de 21,4% par rapport à l'année 2021** (485 souches) (Figure 24).

Cette augmentation des demandes concernait principalement la détermination de sensibilité/résistance à la daptomycine et au linézolide. Le nombre de demandes a été stable pour la résistance aux bêta-lactamines et aux glycopeptides. Cette forte augmentation globale des demandes concernant l'antibiogramme des souches de staphylocoques peut s'expliquer par plusieurs phénomènes :

- l'émergence de souches de staphylocoques multirésistantes offrant des options thérapeutiques réduites,
- l'augmentation d'utilisation de la daptomycine et du linézolide pour les infections à staphylocoques qui induit une augmentation du nombre de souches résistantes à ces antibiotiques alors que ces résistances sont réputées être rares, d'où la nécessité de confirmation et de surveillance par le CNR,
- la mise sur le marché récente de certaines molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole, le tédizolide, la dalbavancine ou la délafloxacine pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des techniques permettant de tester la sensibilité des souches de staphylocoques.

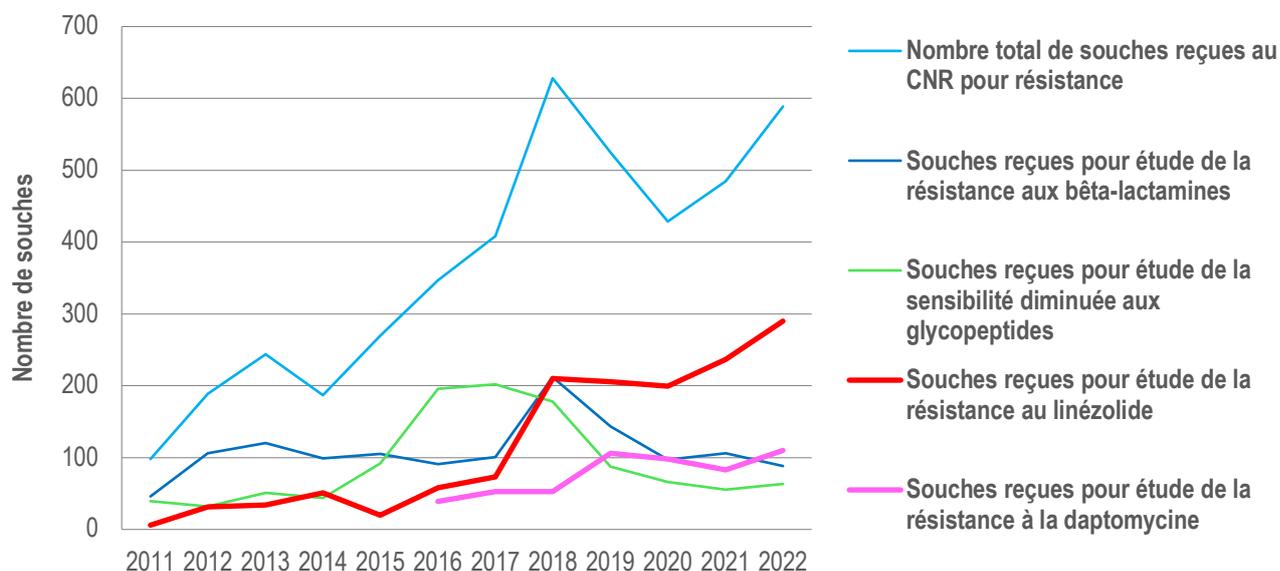


Figure 24- Souches reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques entre 2011 et 2022.

En 2022, les souches expertisées au CNR pour la résistance aux antibiotiques comprenaient 480 demandes extérieures et 109 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon (nombre élevé en raison notamment d'une épidémie de staphylocoques résistants au linézolide). La répartition de ces souches par espèce est décrite dans le tableau 2 : *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 même dépassé *S. aureus* depuis 2020 en nombre de souches reçues, ce qui reflète la fréquente multirésistance des isolats de cette espèce.

**Tableau 2-** Répartition selon l'espèce des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques en 2022.

Espèce	Nombre de souches reçues	Pourcentage des souches reçues (%)
<b><i>S. epidermidis</i></b>	311	52,8
<b><i>S. aureus</i></b>	181	30,7
<i>S. capitis</i>	37	6,3
<i>S. haemolyticus</i>	20	3,4
<i>S. hominis</i>	9	1,5
<i>S. lugdunensis</i>	9	1,5
<i>S. warneri</i>	9	1,5
<i>S. saprophyticus</i>	5	0,8
<i>S. pettenkoferi</i>	3	0,5
<i>S. sciuri</i>	2	0,3
<i>S. pasteurii</i>	1	0,2
<i>S. succinus</i>	1	0,2
<i>S. xylosum</i>	1	0,2
<b>Total</b>	<b>589</b>	<b>100</b>

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 (42 souches pour l'année 2022).

### 3.3.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

En 2022, les souches ont été catégorisées phénotypiquement sensibles, intermédiaires (sensibles à forte posologie) 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 2021 (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 2022 du CA-SFM/EUCAST pour les staphylocoques.

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 (chapitre 2.1.6).

### 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 2022, au total, 88 souches ont été reçues pour détermination de la sensibilité/résistance aux bêta-lactamines : 73 souches pour une demande de confirmation de sensibilité/résistance à la méticilline, mais également 8 souches de staphylocoques sensibles à la méticilline pour CMI oxacilline ou céfazoline ou détection/typage de la pénicillinase staphylococcique, et 7 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).

#### Souches sensibles à la méticilline reçues pour typage de la pénicillinase staphylococcique ou CMI bêta-lactamines

Quatre souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline ont été reçues pour recherche et/ou typage de la bêta-lactamase BlaZ. Trois des quatre souches possédaient le gène de la bêta-lactamase en NGS. Pour l'une de ces souches, isolée d'une endocardite et traitée par céfazoline, le clinicien souhaitait connaître le typage de la bêta-lactamase : il s'agissait d'une bêta-lactamase de type A. 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), 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<sup>6,7</sup>.

Quatre souches de SASM ont été reçues pour détermination de la CMI oxacilline (n=3) ou céfazoline (n=1) : les souches reçues pour CMI oxacilline avaient une CMI ≤ 0,25 mg/L et la quatrième souche avait une CMI céfazoline à 1 mg/L (CMI déterminées en microdilution).

#### Résistance à la méticilline

Les 73 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient 51 souches de *S. aureus* et 22 souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Tableau 3).

Tableau 3 - Bilan des souches reçues au CNR en 2022 pour vérification de la résistance à la méticilline et des résultats obtenus au CNR sur ces souches.

	<i>S. aureus</i>	SCN
Souches <i>mecA</i> +	18	16
Souches <i>mecC</i> +	5	0
Souches <i>mec</i> -négatives	28	6
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>22</b>

<sup>6</sup> Chong YP et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Feb;34(2):349-55.

<sup>7</sup> Song KH et al. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in a multicentre bacteraemia cohort. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Feb;36(2):285-294.

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

- **17 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 demande de i) confirmation de la méticillino-résistance pour des souches exprimant la résistance à l'oxacilline de manière hétérogène ou, ii) confirmation de la sensibilité à la méticilline pour des souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la CMI oxacilline ou le diamètre de la céfoxitine était proche des valeurs critiques, ou iii) confirmation 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 et/ou aux fluoroquinolones), ou iv) confirmation du phénotype pour des souches avec des résultats discordants entre deux techniques (antibiogramme en milieu liquide vs en diffusion) ou entre le test céfoxitine et la CMI oxacilline en automate Vitek2®. Sur ces 17 souches, seules 3 possédaient le gène *mecA* et les 14 autres ne possédaient aucun gène *mec*.

- **14 souches** de *S. aureus* adressées au CNR spécifiquement pour **recherche de gène *mecC***. Cette demande était motivée par deux raisons : i) le plus souvent des souches résistantes à la céfoxitine 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). **Cinq** de ces souches se sont révélées porteuses du **gène *mecC***. Ces 5 souches *mecC*-positives avaient été isolées à Niort (n=2, isolées chez le même patient à plusieurs mois d'intervalle), Épinal, Valenciennes et Angoulême. Toutes ces souches appartenaient au complexe clonal CC130 qui est le clone *mecC*+ le plus courant en Europe, et plus précisément au ST130-MRSA-XI. Sur les 9 autres souches, une seule était résistante à la méticilline et possédait le gène *mecA* ; les 8 autres souches étaient négatives pour les gènes *mec*. Une de ces 8 souches *mec*-négatives présentait une CMI élevée à 8 mg/L pour la céfoxitine (résistant) avec une CMI oxacilline à 1 mg/L (sensible) : le séquençage de son génome a révélé la présence de mutations non-synonymes dans les gènes codant les PLP1, 2 et 3 déjà connues dans la littérature comme associées au phénotype MODSA/BORSA (phénotypes résistants à l'oxacilline ou la céfoxitine sans gène *mec*, dont l'impact clinique est mal connu).

- **20 souches** de *S. aureus* présentant une **discordance** dans le laboratoire expéditeur entre les résultats **phénotypiques** et une technique de **biologie moléculaire ou la recherche de la protéine PLP2a**.

Pour 9 cas, il s'agissait d'une discordance entre recherche de PLP2a positive ou PCR *mecA* positive et une sensibilité de la souche de *S. aureus* à la méticilline sur l'antibiogramme réalisé par le laboratoire expéditeur, pour laquelle le CNR a confirmé la présence du gène *mecA*. Pour 4 de ces souches, l'antibiogramme en microdilution réalisé au CNR a montré une résistance phénotypique à la céfoxitine et donc à la méticilline. Pour les 5 autres souches, bien qu'elles soient positives pour le gène *mecA*, elles présentaient une sensibilité phénotypique à la céfoxitine et l'oxacilline devant la présence du gène *mecA*. Ces souches doivent cependant être considérées comme résistantes à la méticilline. L'analyse en NGS de ces 5 souches a permis de retrouver l'origine de cette apparente sensibilité à la méticilline malgré la présence du gène *mecA* : pour 3 souches, une insertion ou une délétion dans le gène *mecA* était responsable de l'introduction d'un codon stop et induisait une protéine PLP2a tronquée donc probablement non fonctionnelle ; les 2 autres souches présentaient une mutation en amont du gène *mecA*, dans la boîte -10 ou la région RBS du promoteur du gène *mecA*, rapportées dans la littérature comme associées à une diminution de la transcription du gène *mecA* et à une faible résistance à l'oxacilline (Qi, Ender et al, J Clin Microbiol. 2005 ; Ender et al, BMC Microbiol. 2007 ; Ender et al, Int. J. Med. Microbiol. 2008). Il n'existe cependant pas d'étude portant sur l'impact de ces mutations sur l'efficacité des bêta-lactamines *in vivo* et leur utilisation reste déconseillée devant la production de PLP2a et l'existence d'une potentielle sous population résistante.

Pour 2 autres cas, le laboratoire expéditeur avait aussi obtenu un test immunochromatographique positif pour la PLP2a mais une sensibilité à la méticilline sur l'antibiogramme. Pour ces 2 souches, au CNR, la recherche

de gène *mecA* et *mecC* s'est avérée négative et la recherche de PLP2a par immunochromatographie s'est également révélée négative.

Pour 3 cas, il s'agissait d'une discordance entre la technique GenXpert MRSA (Cepheid) qui avait rendu un résultat négatif pour la détection de SARM alors que le laboratoire expéditeur avait détecté un SARM par culture et antibiogramme. Une de ces souches s'est en fait révélée être un SASM. Pour les 2 autres souches, le GenXpert avait rendu un résultat positif pour le gène *mecA* mais un résultat négatif pour la jonction de la cassette *SCCmec*. Au CNR, nous avons confirmé la présence du gène *mecA* et qu'il s'agissait bien de SARM. Ces souches ont été analysées par NGS à la recherche d'un élément *SCCmec* atypique : les 2 souches possédaient des éléments *SCCmec* typiques (elles appartenaient respectivement au ST5-MRSA-IV et ST1535-MRSA-V), ce qui n'a pas permis d'expliquer les résultats obtenus en GenXpert.

Pour 3 cas, il s'agissait d'une discordance entre la technique multiplex FilmArray (Biofire) qui avait rendu un résultat négatif pour la détection de SARM sur un prélèvement respiratoire alors que le laboratoire expéditeur avait détecté un SARM par culture et antibiogramme. Au CNR, nous avons confirmé la présence du gène *mecA* dans ces 3 souches et qu'il s'agissait donc bien de SARM. Ces souches ont été analysées par NGS : elles appartenaient au ST22-MRSA-V, ST1-MRSA-IV et ST398-MRSA-V et possédaient des éléments *SCCmec* typiques, ce qui n'a pas permis d'expliquer les résultats obtenus en FilmArray.

Pour 3 cas, il s'agissait d'une discordance entre une technique moléculaire (FilmArray, n=1, ou GenXpert, n=2) qui avait détecté un SARM alors que la culture et l'antibiogramme avaient retrouvé des *S. aureus* sensibles à la méticilline. Les 3 souches ont été confirmées comme phénotypiquement sensibles à la méticilline et négatives pour les gènes *mecA/mecC*. Elles ont ensuite été analysées par NGS à la recherche d'un élément *SCCmec* complet ou tronqué qui pourrait expliquer le résultat faux-positif de la technique moléculaire pour la détection de SARM. Pour 2 de ces souches, aucun fragment de cassette *SCCmec* n'a été détecté ; la troisième souche possédait une recombinaison de type *ccrA1* normalement retrouvé dans les éléments SCC. Pour finir, ces discordances pourraient s'expliquer soit par la présence d'un staphylocoque à coagulase négative *mecA*-positif et d'un SASM dans le même prélèvement, soit par la vraie détection d'un SARM qui n'a pas pu être mis en évidence en culture.

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

- **9 souches** de *S. lugdunensis* (n=8) et *S. saprophyticus* (n=1). 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, et les souches véritablement résistantes à la méticilline avec présence du gène *mecA* sont rares, ce qui amène souvent les laboratoires à demander la confirmation par le CNR lorsqu'ils détectent une souche résistante à la méticilline chez ces espèces. 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 : 8 souches étaient positives en PCR *mecA* (7/8 *S. lugdunensis* et 1/1 *S. saprophyticus*).

- **13 souches** de SCN appartenant à d'autres espèces (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. succinus*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : 8 possédaient le gène *mecA* et étaient donc résistantes à la méticilline. Les 5 autres souches étaient négatives pour les gènes *mecA/mecC* et étaient donc sensibles à la méticilline.

## Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole

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

En 2022, 7 souches ont été reçues pour détermination de la sensibilité à la ceftaroline et/ou au ceftobiprole : 2 pour CMI ceftaroline et ceftobiprole, 4 pour CMI ceftaroline et 1 pour CMI ceftobiprole. Depuis 2021, le CNR détermine en parallèle les CMI ceftaroline et ceftobiprole dès lors qu'une des deux molécules est demandée par le laboratoire expéditeur.

La détermination des CMI **ceftaroline** et **ceftobiprole** ou la confirmation d'une résistance détectée par le laboratoire expéditeur ont donc été demandées pour **7 souches** en 2022, toutes résistantes à la méticilline :

- **4 souches de *S. aureus*** : elles se sont révélées toutes sensibles à la ceftaroline et au ceftobiprole,
- **3 souches de staphylocoques à coagulase négative** : **2 souches de *S. haemolyticus*** (1 sensible à forte posologie à la ceftaroline et résistante au ceftobiprole et 1 résistante aux 2 molécules), et **1 souche de *S. epidermidis*** (sensible à la ceftaroline mais résistante au ceftobiprole).

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

Depuis 2015, les recommandations du CA-SFM/EUCAST ont abaissé les CMI à partir desquelles une sensibilité diminuée aux glycopeptides 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<sup>er</sup> 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. Pour les souches de *S. aureus*, le CNR n'expertise les souches que si le laboratoire expéditeur a vérifié en microdilution les CMI > 1 mg/L obtenues en technique automatisée. Ces conditions d'acceptation des souches sont clairement indiquées sur le bon de demande du CNR.

En 2022, **63 souches de staphylocoques** ont été reçues pour étude de la sensibilité aux glycopeptides (53 *S. aureus* et 10 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié le plus souvent par des CMI élevées aux glycopeptides en microdilution ou en technique automatisée (> 1 mg/L).

Sur les **53 souches de *S. aureus*** reçues dans ce contexte, **6 souches** (11,3% ; 3 SARM et 3 SASM) ont été confirmées comme présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type **GISA/hGISA** selon la méthode de référence qui est l'analyse de population (APOP, avec un ratio d'AUC par rapport à la souche Mu3 ≥ 0,9) ; ces 6 souches avaient une CMI à 2 mg/L pour la vancomycine en microdilution. Une de ces souches GISA était également résistante à la daptomycine et trois étaient résistantes à la dalbavancine.

Pour 14 souches, le test de dépistage des hGISA (test en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un

inoculum lourd de 2 McF) était négatif ; cependant elles ne pouvaient être rendues sensibles aux glycopeptides car elles présentaient une CMI > 2 mg/L pour la teicoplanine, ce qui conduisait à les catégoriser résistantes à la teicoplanine en dépit du fait qu'elle ne réponde pas aux critères retenus par la littérature pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type hGISA. Onze de ces 14 souches avaient une CMI vancomycine > 1 mg/L, ce qui est associé dans la littérature à un risque plus élevé d'échec thérapeutique.

Trente-trois souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage (CMI ≤ 2 mg/L et test en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un inoculum lourd de 2 McF négatif). Parmi elles, 8 présentaient une CMI vancomycine à 2 mg/L (catégorisée sensible). Cependant, comme indiqué précédemment, 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 donc 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**, **10 souches** ont été reçues au CNR en 2022 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides. Pour 4 souches, le laboratoire expéditeur avait envoyé une souche identifiée chez eux *S. aureus*, qui s'est en fait avérée être du *S. haemolyticus* : les analyses n'ont donc pas été réalisées. Concernant les 6 autres souches (dont 4 *S. epidermidis*), elles étaient toutes résistantes à la teicoplanine (CMI ≥ 8 mg/L) et 2 étaient également résistantes à la vancomycine avec une CMI à 4 mg/L (1 *S. epidermidis* et 1 *S. haemolyticus*).

### 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, d'autant qu'il existe des formes orales permettant un relais au traitement parentéral. Il est aussi de plus en plus souvent utilisé en première intention en réanimation chez certains patients fragiles en cas de suspicion d'infection à SARM/SARM, notamment pour les infections respiratoires. La résistance aux oxazolidinones est liée soit :

- à des **mutations du gène codant l'ARNr (ARN ribosomal) 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,

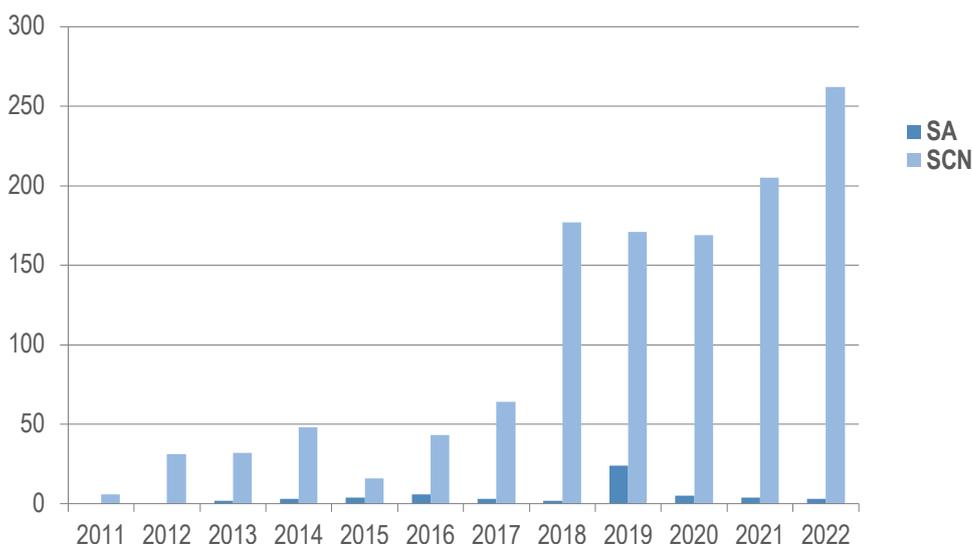
- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *cfr* ou *cfr(B)*** (*chloramphenicol-florfenicol resistance*) qui codent des méthyltransférases de l'ARNr 23S, méthylations qui masquent la cible du linézolide sur le ribosome et sont responsables d'un phénotype de résistance croisée dit PhLOPSa (phénicolés, lincosamides, linézolide, pleuromutilines et streptogramine A),

- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *optrA* et *poxTA*** qui codent des protéines ABC responsables de résistance aux oxazolidinones et phénicolés par un mécanisme de protection ribosomale (gènes principalement retrouvés chez les entérocoques).

L'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes (Figure 25). Le nombre de souches de staphylocoques résistantes au linézolide reçues au CNR a fortement augmenté en 2018, puis s'est stabilisé en 2019-2020 et a de nouveau augmenté en 2021 et 2022. Nous savons cependant que tous les laboratoires n'envoient pas leurs souches résistantes au linézolide au CNR et donc les chiffres du CNR ne reflètent pas la réelle épidémiologie de ces souches. Les résistances au linézolide semblent de moins en moins rares (et probablement sous diagnostiquées car les résistances plasmidiques de bas niveau peuvent être mal détectées) alors que les oxazolidinones sont des antibiotiques de dernier recours dont il faudrait

préserver l'efficacité ; d'après les données du CNR, elles sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations de l'ARNr 23S et ces souches peuvent être responsables d'épidémies intra- et inter-hospitalières. De façon plus inquiétante, il est également retrouvé des résistances plasmidiques au linézolide, telles que celle médiée par le gène *cfr*.

En 2022, le CNR a expertisé **290 souches de staphylocoques** pour lesquelles le laboratoire expéditeur avait identifié une CMI augmentée pour le linézolide ou suspectait une résistance en disque ou en technique automatisée (vs 238 en 2021). **Deux-cent-soixante-cinq souches**, dont **3 *S. aureus*** et **240 *S. epidermidis***, ont été confirmées **résistantes au linézolide** (CMI > 4 mg/L). A noter qu'une souche de *S. epidermidis* phénotypiquement sensible au linézolide (CMI égale à 4 mg/L) a été détectée comme porteuse du gène de résistance *cfr* et qu'aucune souche n'a été détectée porteuse du gène *optrA* ou *poxxA*.



**Figure 25-** Nombre de souches de staphylocoques **résistantes au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2022. SA = *S. aureus*, SCN = staphylocoques à coagulase négative.

### **S. aureus**

Sur les 16 souches de *S. aureus* reçues pour suspicion de résistance au linézolide, seules **3** ont été confirmées **résistantes** avec des CMI entre 8 et 16 mg/L. Ces 3 souches étaient des SARM appartenant à 3 fonds génétiques différents et isolés de prélèvements respiratoires. Deux des 3 patients étaient connus atteints de la mucoviscidose. Ceci confirme les observations des années précédentes : les souches de *S. aureus* résistantes au linézolide restent rares et sont majoritairement retrouvées dans des prélèvements respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose. Ceci invite à surveiller l'émergence de cette résistance chez ces patients, la colonisation chronique de ces patients favorisant l'acquisition de résistance en cas de cures itératives de linézolide (cf. étude MUCOLINE, paragraphe 8.3.5.1).

Les 3 souches résistantes au linézolide avaient été isolées au CH de Suresnes (n=1) et au CHU de Brest (n=2). Deux de ces souches avaient une CMI linézolide à 16 mg/L et étaient porteuses de la mutation de l'ARNr 23S G2576T. La troisième souche avait une CMI linézolide à 8 mg/L ; elle ne portait aucune mutation connue au niveau des multiples copies du gène codant pour l'ARNr 23S mais présentait des mutations dans la région codant les protéines ribosomales L3 et L22 (déletion H146 dans la séquence de la protéine L3, mutation non décrite dans la littérature mais des mutations non-synonymes au niveau de l'histidine en position 146 comme H146Q ont déjà été décrites, et insertion 91GQ dans la séquence de la protéine L22, mutation non décrite dans la littérature). Aucune de ces souches ne possédait le gène *cfr*.

## Staphylocoques à coagulase négative

Sur les 274 souches de SCN envoyées par les laboratoires pour investigation de la résistance au linézolide, 262 ont été confirmées comme résistantes. A noter qu'une souche de *S. epidermidis* phénotypiquement sensible au linézolide (CMI égale à 4 mg/L en 48h d'incubation) a été détectée comme porteuse du gène de résistance *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 **262 souches** de SCN résistantes au linézolide appartenaient à 4 espèces : *S. epidermidis* (n=240 ; 91,6%), *S. capitis* (n=12), *S. hominis* (n=8), et *S. haemolyticus* (n=2), et étaient résistantes à la méticilline pour 258 d'entre elles (98,5%). Elles avaient été isolées principalement dans des hémocultures (n=160), des cathéters (n=27) ou des prélèvements ostéo-articulaires (n=27).

Parmi les 240 souches de ***S. epidermidis*** résistantes au linézolide, seules 7 possédaient le gène plasmidique *cfr* (sans mutation de l'ARNr 23S associée) et présentaient des CMI linézolide entre 8 et 16 mg/L. Cinq de ces souches provenaient des Hospices Civils de Lyon où sévit une épidémie de souches résistantes au linézolide depuis plusieurs années ; les 2 autres souches provenaient de Bayonne et Bourgoin-Jallieu. Parmi les 233 souches de *S. epidermidis* ne possédant pas le gène *cfr*, 228 (en provenance de 46 laboratoires) possédaient la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S ; ceci montre la large distribution de ces souches résistantes au linézolide sur tout le territoire français, d'autant que certains centres hospitaliers ne nous envoient pas ces souches et qu'elles sont donc en réalité plus répandues. Deux souches présentaient les mutations T2504A et C2534T de l'ARNr 23S, et trois souches ne présentaient aucune mutation au niveau de l'ARNr 23S mais possédaient une ou plusieurs mutations non synonymes dans les gènes codant les protéines ribosomales L3 et L4.

Parmi les 12 souches de ***S. capitis*** résistantes au linézolide, 3 possédaient le gène plasmidique *cfr* (sans mutation de l'ARNr 23S associée). Elles provenaient de 3 villes différentes (Strasbourg, Lyon, Cornebarrieu à proximité de Toulouse) et avaient été isolées d'hémocultures (n=2) et d'un cathéter (n=1). Les 9 souches *cfr*-négatives possédaient toutes la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S (associée à la mutation T2319C pour 3 d'entre elles).

Parmi les 8 souches de ***S. hominis*** résistantes au linézolide (toutes isolées d'hémocultures), 4 possédaient le gène transférable *cfr* (sans mutation de l'ARNr 23S associée) et avaient été isolées à Valenciennes (n=2), Lyon (n=1) et Muret à proximité de Toulouse (n=1). Les 4 souches *cfr*-négatives présentaient toutes la mutation G2576T de l'ARNr 23S.

Les 2 souches de ***S. haemolyticus*** résistantes au linézolide avaient été isolées d'une hémoculture au CHU de Toulouse et d'un prélèvement osseux au CHU de Nancy. Elles possédaient toutes les 2 le gène plasmidique *cfr* (associé à la mutation de l'ARNr 23S G2576T pour une souche).

Ces données confirment que la mutation majeure associée à la résistance au linézolide retrouvée en France est toujours la mutation G2576T (retrouvée chez 244/265 souches résistantes, soit 92,1%). 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, sur les 290 souches reçues pour demande d'expertise de la résistance au linézolide, **17 souches** porteuses du **gène *cfr*** ont été mises en évidence en 2022 (dont 8 aux Hospices Civils de Lyon). Ces souches *cfr*-positives ont été détectées dans 8 établissements différents répartis sur le territoire national (Bayonne, Strasbourg, Valenciennes, Nancy, 2 établissements dans la région de Toulouse, et 2 dans la région de Lyon). 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 et incite à renforcer la surveillance du niveau de sensibilité au linézolide et

plus généralement aux molécules de la famille des oxazolidinones (cf. étude LINESTAPH, paragraphe 3.5.1). Le CNR a développé le séquençage hybride ONT Minion/Illumina afin d'étudier l'environnement génétique du gène *cf* dans les souches porteuses et leur fond génétique/leur lien épidémiologique. L'ensemble des souches résistantes au linézolide reçues à la discrétion du laboratoire expéditeur au CNR des Staphylocoques ainsi que les souches recueillies dans le cadre de l'étude LINESTAPH sont ou seront analysées par séquençage, et une étude phylogénétique ainsi qu'une comparaison des plasmides porteurs du gène *cf* seront réalisées afin de déterminer la potentielle diffusion de souches et/ou de plasmides à l'échelle nationale.

L'ensemble de ces données concernant la résistance au linézolide semblent montrer que i) le gène *cf* reste assez rare mais est présent en France et peut donner lieu à des épidémies 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 réelle des souches de *S. aureus* et de SCN résistantes au linézolide en France reste à ce jour toujours inconnue. L'étude LINESTAPH a cependant pour but d'estimer cette prévalence (cf. paragraphe 3.5.1). 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 tédizolide, et la forme IV du linézolide a été généralisée induisant une chute de son prix, ce qui conduit à une augmentation de sa prescription.

Concernant le gène *cf*, 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 lipopeptide, dont la concentration critique a été fixée à 1 mg/L par le CA-SFM/EUCAST. Elle est devenue un traitement de choix pour les 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 ont légèrement diminué en 2020 et 2021 avant de réaugmenter en 2022, en lien avec l'utilisation de plus en plus fréquente de la daptomycine au détriment des glycopeptides.

**En 2022**, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **110 souches de staphylocoques** (48 *S. aureus* et 62 staphylocoques à coagulase négative) vs **83 souches en 2021**, le plus souvent car ces souches avaient été trouvées résistantes à la daptomycine par le laboratoire expéditeur ou moins fréquemment parce que le laboratoire ne disposait pas de moyens pour tester la sensibilité de la souche à cet antibiotique.

Sur les **48 souches de *S. aureus*** reçues pour cette demande, 31 souches étaient bien résistantes à la daptomycine avec des CMI comprises entre 2 et 4 mg/L. Dix-neuf de ces souches étaient des SARM ; 21 provenaient d'hémocultures et 4 de prélèvements ostéo-articulaires. Six des souches résistantes à la daptomycine présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides avec une résistance à la teicoplanine.

Sur les **62 souches de SCN** testées, 20 étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 4 mg/L : 8 *S. capitis*, 3 *S. epidermidis*, 3 *S. warneri*, 3 *S. pettenkoferi*, 2 *S. haemolyticus* et 1 *S. sciuri*. Dix de ces souches étaient résistantes à la méticilline ; 9 provenaient d'hémocultures, 4 de prélèvements ostéo-articulaires et 3 de cathéters.

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-phosphatidylglycérol synthase qui assure le transfert de la lysine chargée positivement sur le phosphatidylglycérol 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 n'est pas complètement élucidé, des mutations liées à la résistance à la daptomycine ont été décrites dans d'autres gènes 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 recueille 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 soit de plaques d'antibiogramme en microdilution, soit de bandelettes en gradient de concentration permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococciques utilisés en thérapeutique. Il peut également explorer les mécanismes de résistance d'intérêt par NGS lorsque c'est pertinent.

- **Quarante-trois souches** (26 *S. epidermidis*, 7 *S. haemolyticus*, 6 *S. aureus*, 2 *S. capitis*, 1 *S. lugdunensis* et 1 *S. xylosoyus*) ont été reçues pour détermination de la sensibilité à la **dalbavancine**. Depuis mai 2021, le CNR dispose d'une technique en microdilution pour tester la sensibilité à la dalbavancine (technique Sensititre, Thermo Fisher), comme recommandé par le CA-SFM. Sur ces 43 souches, 39 se sont avérées sensibles à la dalbavancine et 4 souches, appartenant aux espèces *S. aureus* (n=2), *S. epidermidis* (n=1) et *S. haemolyticus* (n=1), se sont avérées résistantes avec une CMI à 0,25 ou 0,5 mg/L. Ces souches étaient toutes les 4 résistantes à la teicoplanine et avaient également une CMI élevée pour la vancomycine (2 ou 4 mg/L ; 3/4 étaient sensibles à la vancomycine). Le CA-SFM indique que les souches de staphylocoques sensibles à la vancomycine sont sensibles à la dalbavancine. D'après cette expérience du CNR, il paraît cependant plus prudent, lorsque la souche a une CMI vancomycine à 2 mg/L ou apparaît résistante à la teicoplanine, de vérifier la sensibilité à la dalbavancine. Néanmoins très peu de réactifs commerciaux existent pour tester la dalbavancine en microdilution.
- **Cinq souches** (*S. aureus*, n=3, et *S. epidermidis*, n=2) ont été reçues pour recherche de résistance à la **rifampicine** : leur CMI pour la rifampicine a été déterminée en microdilution et 4 des 5 souches étaient effectivement résistantes à cet antibiotique.
- **Quatre souches** d'infections ostéo-articulaires ont été reçues pour détermination de la CMI de la **délaflaxacine** car elles étaient résistantes à la lévofloxacine (*S. epidermidis*, n=3, et *S. aureus*, n=1). Trois souches avaient une CMI délaflaxacine à 0,75 mg/L et une souche à 0,25 mg/L. Il n'existe cependant pas de concentration critique pour cette molécule dans le cadre des infections osseuses et pour les SCN.
- **Trois souches** de *S. aureus* ont été reçues dans des contextes d'infections cutanées pour expertise de la virulence et vérification de la CMI de la **mupirocine** : une de ces souches présentait une résistance de haut niveau à la mupirocine (CMI > 1024 mg/L), médiée par le gène *mupA* ; les 2 autres étaient sensibles à la mupirocine.

- **Trois souches** de *S. epidermidis* résistantes à l'érythromycine et à la clindamycine ont été reçues pour détermination de la CMI **quinupristine-dalfopristine** et étaient résistantes à cet antibiotique (CMI > 1 mg/L).
- **Deux souches** (*S. aureus* et *S. epidermidis*) ont été reçues pour détermination de la CMI du **tédizolide**. Ces deux souches étaient sensibles au linézolide et pouvaient donc être extrapolées sensibles au tédizolide, ce qui a été confirmé par la mesure de CMI pour cet antibiotique.
- **Une souche** de *S. epidermidis* a été reçue car elle présentait une **croissance difficile** et l'antibiogramme n'était pas réalisable dans les conditions usuelles (notamment par méthode automatisée). Il a été réalisé au CNR par diffusion sur gélose au sang car la souche ne poussait pas sur milieu MH et la sensibilité de la souche à l'oxacilline a été confirmée par la PCR des gènes *mecA/mecC*.
- **Une souche** de SARM a été reçue pour confirmation de résistance à la **gentamicine**. L'antibiogramme en microdilution réalisé au CNR pour cette souche a confirmé sa résistance à tous les aminosides.

### 3.3.4 Analyse des tendances

Globalement, en 2022, nous observons les mêmes tendances que les 3 années précédentes :

- 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 *cfr*, est un enjeu majeur pour contrôler cette résistance ;
- un nombre assez élevé de souches détectées résistantes à la daptomycine, associée à l'utilisation de plus en plus large de cet antibiotique ;
- une augmentation des demandes pour tester la sensibilité des souches aux antistaphylococciques les plus récents comme la dalbavancine ou la délafloxacine, pour lesquelles les laboratoires ne disposent souvent pas des moyens techniques pour les tester.

### 3.3.5 Surveillance des clones de SARM

#### 3.3.5.1 Évolution des clones de SARM reçus au CNR

Depuis 2017, la proportion entre SARM PVL+ et PVL- reçus au CNR reste relativement stable (Figure 26).

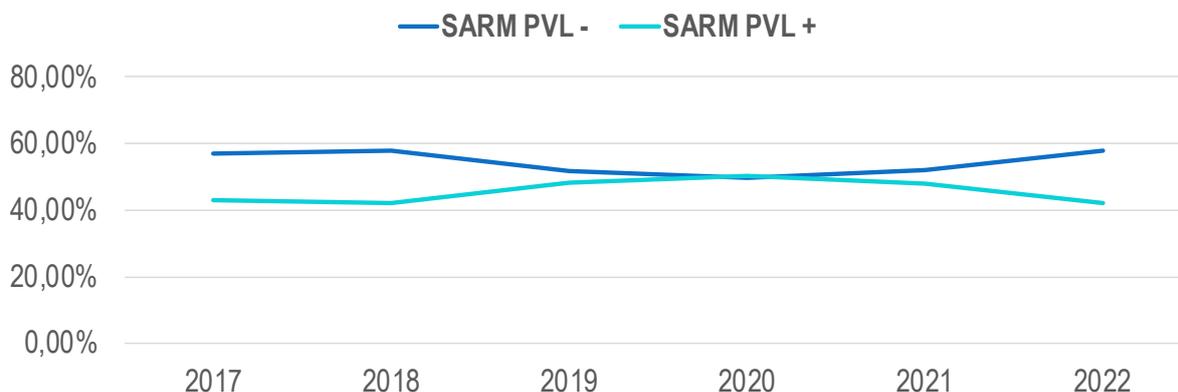


Figure 26- Évolution de la proportion des SARM PVL+ vs PVL- au sein des souches reçus au CNR entre 2017 et 2022

### SARM communautaires

Depuis 2017, on assiste à une stabilisation des grands clones de SARM-C comme le clone européen CC80-MRSA-IV ainsi que les clones USA300 et USA300 latin variant qui ne se sont pas réellement implantés en France. On note l'émergence depuis 2018 du CC152-MRSA-XIII (PVL+) que nous suivons attentivement (Cf paragraphe 3.3.5.2) (Figure 27).

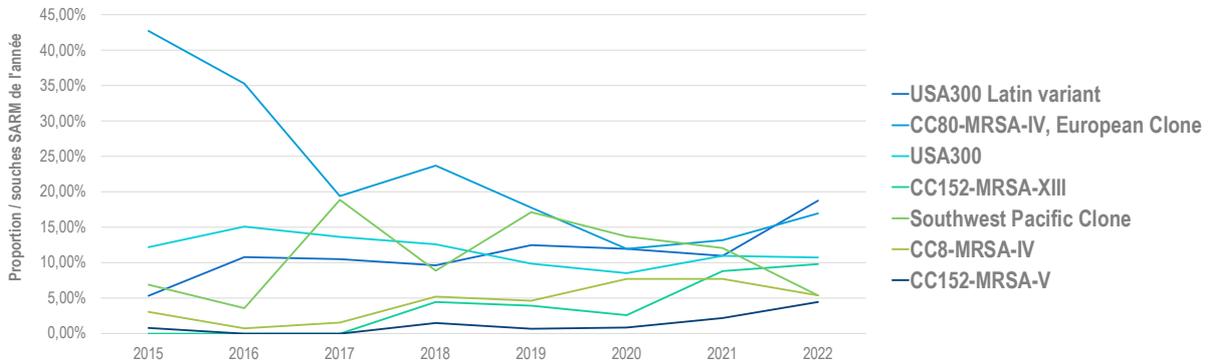


Figure 27- Évolution des clones SARM PVL+ majoritaires et émergents en France depuis 2015.

### SARM PVL –

Depuis 2015, la prévalence du clone Lyon a tendance à diminuer et nous ne constatons pas d'émergence de nouveaux clones mais une stabilisation des clones présents : le clone Lyon, le clone paediatric et new paediatric (Figure 28).

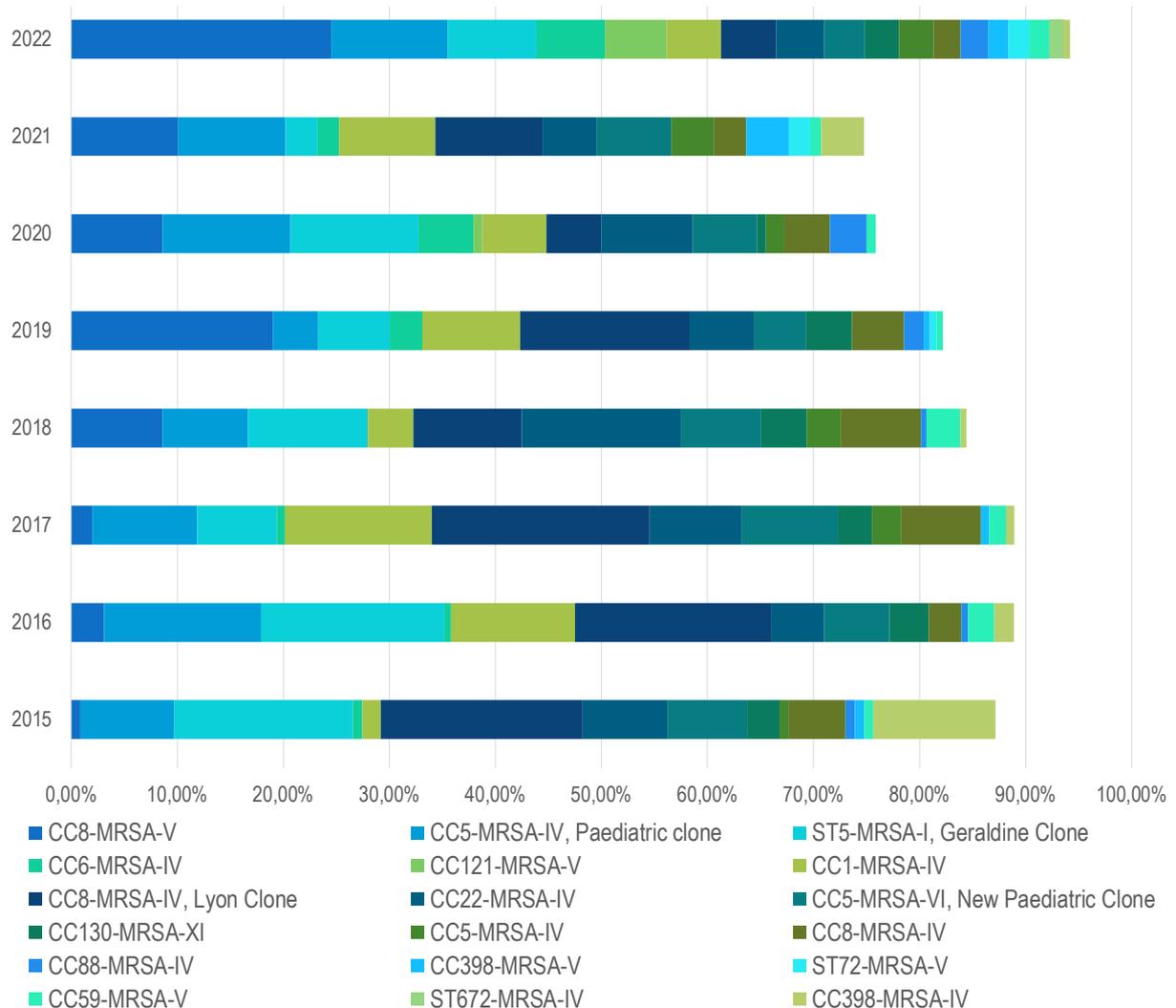
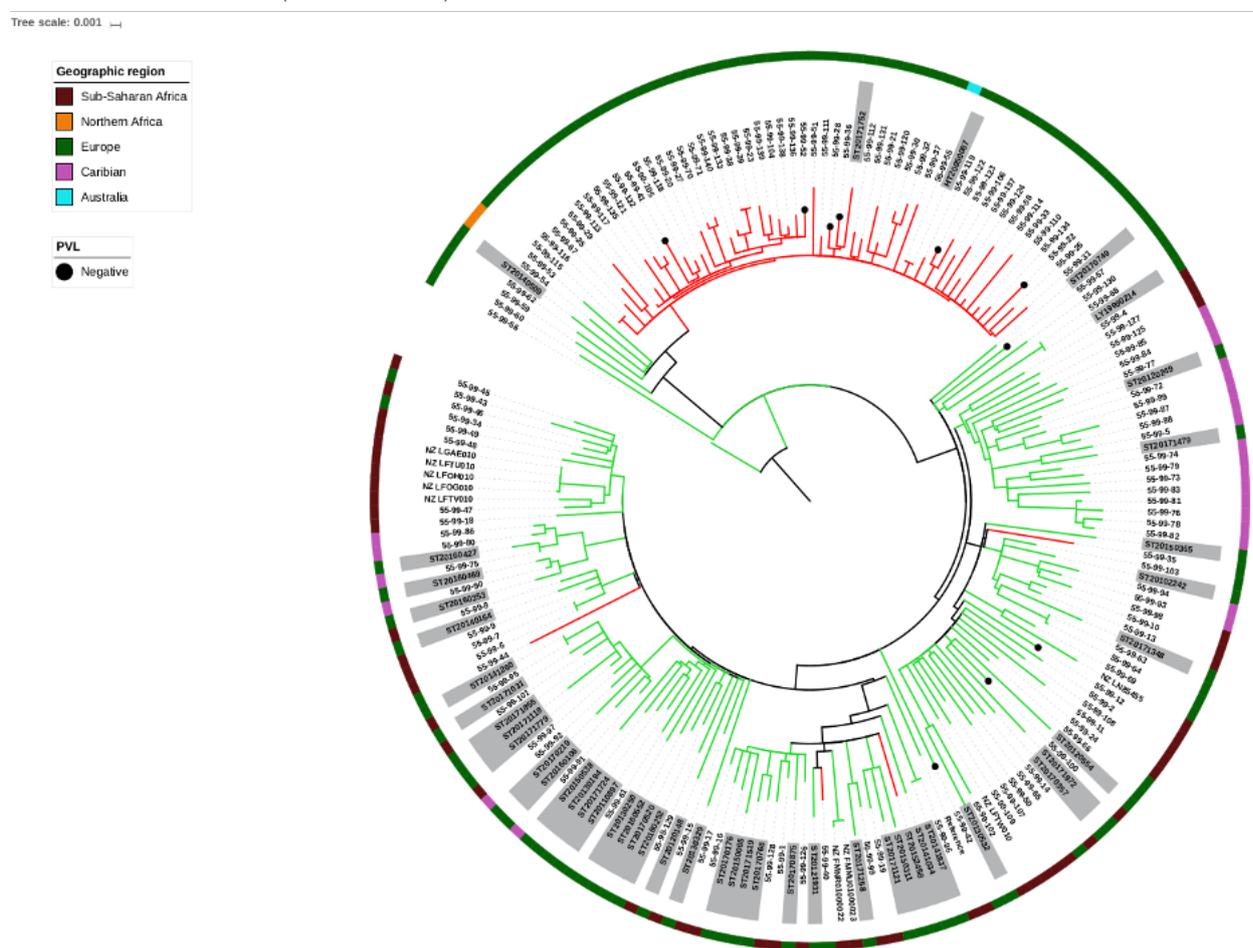


Figure 28- Évolution des clones de SARM PVL- depuis 2015

### 3.3.5.2 Surveillance du clone CC152

Depuis plusieurs années, le complexe clonal CC152-MSSA PVL+ est devenu le clone majoritaire dans les infections graves comme les pneumonies nécrosantes et les infections de la peau et des tissus mous (SSTIs). Son profil de résistance est typique des souches de CC152 endémiques en Afrique Sub-Saharienne. En 2019, une étude génomique de ce complexe clonal réalisée en collaboration avec le Serum Institute (SSI, Danemark) a pu confirmer la proximité des souches SASM circulant en France avec le clade des souches CC152-MSSA d'origine Africaine et des Caraïbes (Figure 29). De plus, cette étude montre l'existence de 3 clades, 1 clade MSSA ancestral d'origine européenne (schématiquement en vert entre 10h et 11h sur la figure), et deux clades avec un grand succès : un clade MRSA PVL+ (en rouge entre 11h et 2h) et un deuxième clade MSSA PVL+ (en vert entre 2h et 10h) avec une distribution géographique très large sans structuration spatiale. C'est à ce dernier clade MSSA qu'appartiennent les souches CC152-MSSA PVL+ collectées par le CNR depuis 1999. Une seule exception a été observée pour une souche isolée en 2014 en France Métropolitaine.

Cette étude a, aussi, permis de détecter et décrire un nouvel élément SCCmec trouvé dans une des souches danoises – SCCmec-XIII (SARM vers 8h).

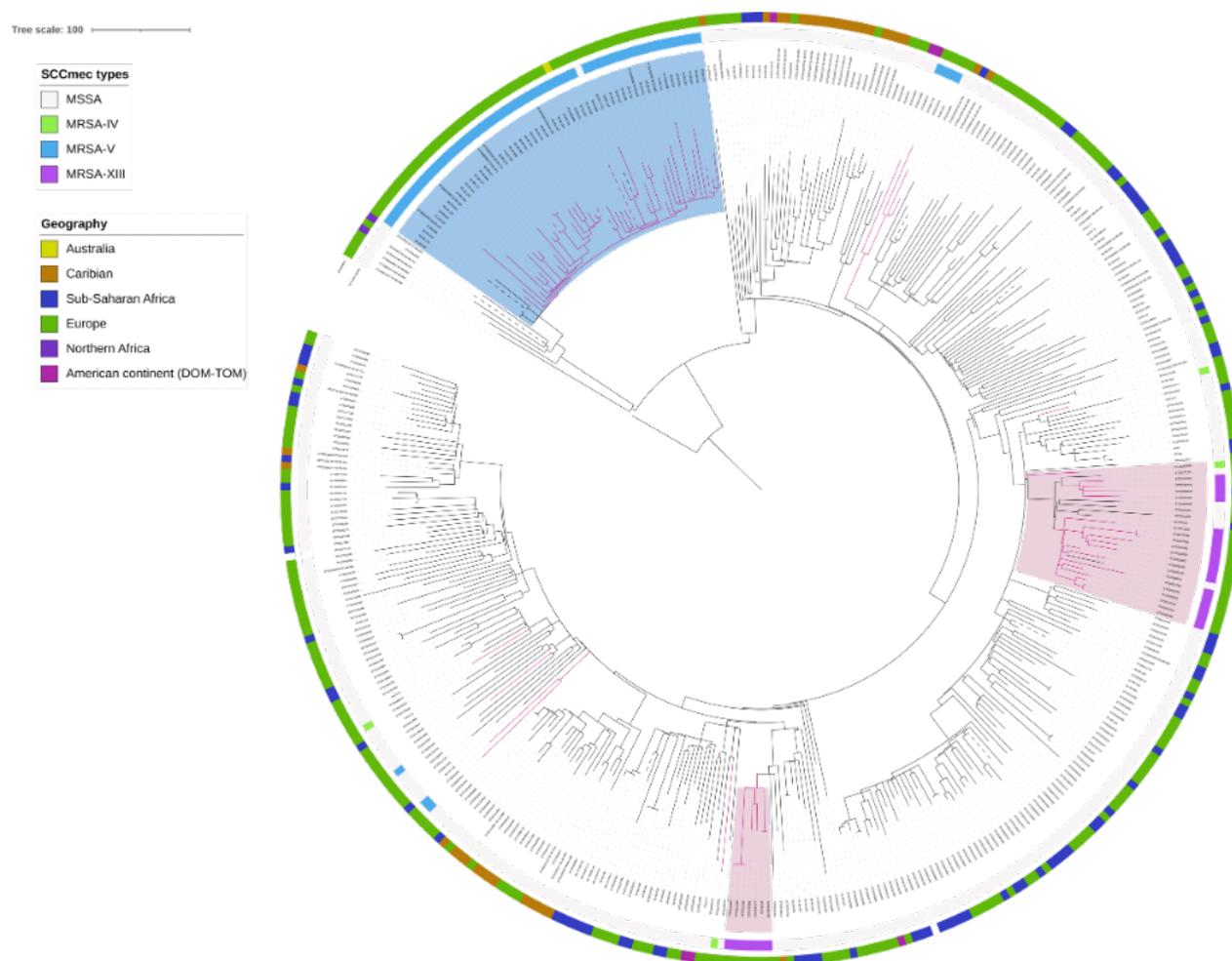


**Figure 29-** Phylogénie de 197 souches CC152-MSSA et CC152-MRSA PVL+, incluant 48 souches Françaises et 149 isolats de 28 pays différents sur une période de 17 ans<sup>8</sup>. Les souches du CNR sont indiquées en gris. Les branches rouges indiquent les SARM et les branches vertes indiquent les SASM.

Le CNR continue le suivi de la diffusion de ce clone et, depuis 2018, nous observons une augmentation des souches CC152 MRSA PVL+ dont il convient également de surveiller la diffusion dans les prochaines années. Le séquençage systématique des souches reçus au CNR SARM et SASM PVL+, depuis 2020, a permis l'observation

<sup>8</sup> Baig S et al. Evolution and Population Dynamics of Clonal Complex 152 Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. mSphere. 2020 Jul 1;5(4):e00226-20.

de l'émergence d'un nouveau clone ST152-SARM-XIII, en France métropolitaine. Une deuxième étude génomique est en cours pour décrire ce clone et son émergence (Figure 30).



**Figure 30-** Phylogénie de 410 souches CC152-MSSA et CC152-MRSA PVL+, incluant 261 souches françaises et 149 isolats de 28 pays différents sur une période de 17 ans<sup>14</sup>.

Les branches roses indiquent les SARM et les branches en tiret indiquent les souches PVL-. Le clade correspondant au clone ST152-MRSA-V décrit par Baig et al. est surligné en bleu et les 2 clades SARM avec un élément SCCmec-XIII sont surlignés en rose. Vers 3h, la présence de souches SASM semble suggérer la perte de l'élément SCCmec dans une sous-lignée.

Un article est en cours de rédaction sur ces données.

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Se reporter au paragraphe 4. « Alertes » pour Santé Publique France

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

Le CNR des Staphylocoques a su établir des interactions fortes avec de nombreux réseaux de laboratoires qu'il s'agisse de laboratoires hospitaliers ou privés et nationaux (Métropole et Outre-Mer) 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 touristiques ou migratoires pourraient constituer des réservoirs et/ou sources 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 il est capital de disposer dans le cadre des missions confiées au CNR (Cf paragraphe 5.2 Activités d'expertise auprès de structures européennes (ECDC, ...)).

Par ailleurs, depuis la dernière mandature conformément au cahier des charges établis par SpF, le CNR a développé des relations privilégiées avec le CNR des résistances aux antibiotiques et est membre du réseau constitué autour de ce dernier (cf. Paragraphes 8.3.1 et 8.3.2). Cette collaboration étroite voulue par SpF s'est avérée particulièrement intéressante et fructueuse avec, par exemple, le lancement d'une étude nationale commune sur la résistance aux oxazolidinones chez les staphylocoques et les entérocoques qui a permis de collecter des données dans 37 CHU et CHG sur plus de 200 000 antibiogrammes de SASM, 40 000 de SARM, 200 000 de SCN entre 2014 et 2021. Ces données sont en cours d'exploitation et de valorisation par un article et nous ont servi de données de base pour concevoir et dimensionner le projet LINESTAPH qui vise à réaliser une collecte prospective des souches de staphylocoques résistantes aux oxazolidinones afin de caractériser les clones circulants ainsi qu'évaluer la prévalence des différents mécanismes de résistance.

Le CNR a aussi établi une collaboration étroite avec le réseau SPIADI auquel il a apporté son expertise en réalisant le séquençage et l'analyse (MLST, clones, phylogénie, résistome, virulome) des souches de *S. aureus* collectées par ce réseau en 2022. De la même façon, le CNR a réalisé le même type de collaboration avec le réseau CRIOGO (Centre de Référence en Infections Ostéo-Articulaires du Grand Ouest) sur une large collection de souches de *S. epidermidis* résistantes aux oxazolidinones impliquées dans des IOA sur matériel<sup>9</sup>.

<sup>9</sup> Coustillères F et al. Clinical, Bacteriological, and Genetic Characterization of Bone and Joint Infections Involving Linezolid-Resistant *Staphylococcus epidermidis*: a Retrospective Multicenter Study in French Reference Centers. *Microbiol Spectr*. 2023 May 3:e0419022.

## 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

### 3.5.1 Surveillance en santé humaine

#### Projet SARMPac- Surveillance des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dans le Pacifique avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie<sup>10</sup>

*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.

Depuis 2016, la résistance à la méticilline de *Staphylococcus aureus* augmente rapidement en Nouvelle-Calédonie et est associée à des répercussions cliniques potentiellement graves. Nous avons donc étudié l'épidémiologie des SARM en Nouvelle-Calédonie. 171 SARM ont été isolés dans les laboratoires médicaux de Nouvelle-Calédonie en août et septembre 2019 et analysés par le CNR. Plusieurs complexes clonaux ont été retrouvés mais le ST6-MRSA est le clone majoritaire (70%). Ce clone est résistant à l'acide fusidique. Il serait intéressant d'étudier en parallèle la consommation d'acide fusidique pour voir si ce clone pourrait être sélectionné par un mésusage de cet antibiotique et ainsi recommander l'arrêt de son utilisation topique pour réduire l'expansion de ce clone de SARM PVL+.

En parallèle, la phylogénie du clone ST6 est en cours au CNR. Le séquençage de 236 souches ST6 SARM et SARM, dont 57 de la Nouvelle-Calédonie, a permis la construction d'une première phylogénie montrant 2 clones ST6-SARM-IV et l'acquisition d'un deuxième élément SCC portant le gène *fusC*, responsable de la résistance à l'acide fusidique, dans le clade SARM comprenant les souches de Nouvelle Calédonie (clade surligné en mauve) (Figure 31).

<sup>10</sup> Bourles A et al. A fusidic acid-resistant (PVL+) clone is associated with the increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Caledonia. J Glob Antimicrob Resist. 2022 Sep;30:363-369.

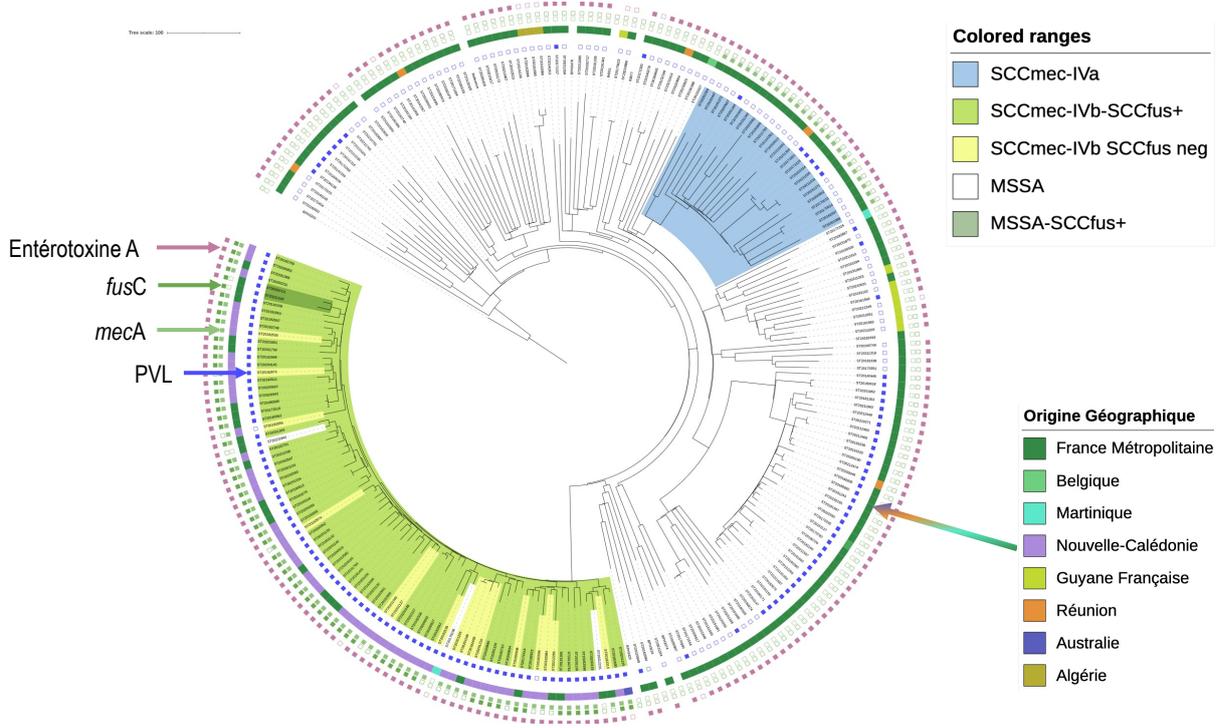


Figure 31- Phylogénie de ST6-SARM et SARM

En 2023, le CNR va approfondir cette analyse afin de finaliser la phylogénie du ST6. De plus, une nouvelle collecte de souches de SARM afin d'observer l'impact de l'arrêt gouvernemental du 23/02/2021 suspendant les autorisations de mise sur le marché de médicaments à base d'acide fusidique et de fusidate sodique par voie topique est en cours. Les données de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie pour 2021 et 2022 sont plutôt encourageantes avec une nette diminution des SARM (Figure 32).

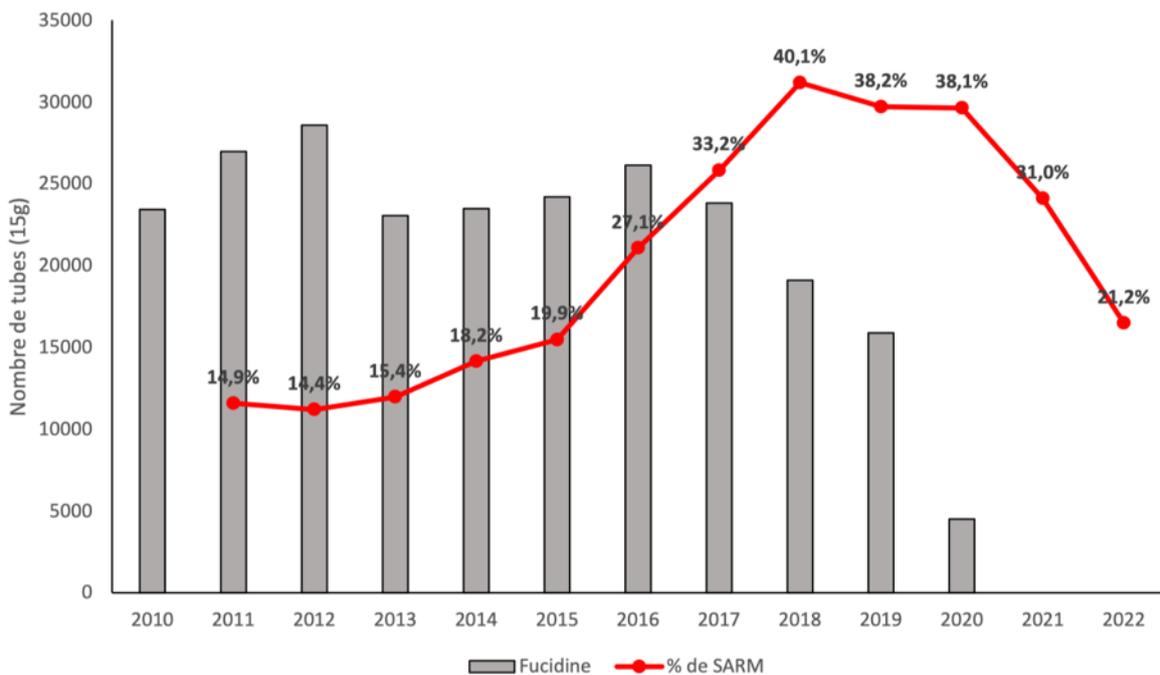


Figure 32- Évolution du pourcentage de SARM et de la consommation de fucidine en Nouvelle Calédonie entre 2010 et 2022 (données fournies par Dr Julien Colot Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie).

## IPro-CTSM : Identification des signes cliniques prodromiques du choc toxique staphylococcique menstruel

Le choc toxique staphylococcique menstruel (CTSm) est une pathologie rare (environ 100 cas/an en France) mais sévère, nécessitant dans plus de 80% des cas, une prise en charge en unité de soins intensifs. Le CTSm se développe en période péri-menstruelle, chez les jeunes femmes en bonne santé (âge médian : 19 ans) colonisées par une souche vaginale de *S. aureus* sécrétant la toxine TSST-1 et non immunisées contre cette dernière, dans un environnement favorable à savoir le port de protections menstruelles intravaginales (tampon, coupe menstruelle). La rareté du syndrome, sa présentation clinique polymorphe et l'absence d'examen biologique totalement spécifique font du CTSm une pathologie difficile à diagnostiquer. Les critères cliniques de référence (CDC 2011) correspondent au tableau avancé de défaillance multiviscérale, permettant de classer les cas *a posteriori*, mais participent au retard diagnostique et manquent de sensibilité. Des témoignages de patientes suggèrent la présence de symptômes dans les jours précédant le développement du choc toxique et aussi au cours des cycles menstruels précédents. L'identification de symptômes prodromiques pourrait permettre une prise en charge plus précoce du CTSm par le retrait de la protection périodique intravaginale, facteur de risque principal, avant que la maladie s'installe définitivement et nécessite une prise en charge en réanimation.

L'objectif principal est d'identifier chez les femmes âgées de 13 à 30 ans des symptômes cliniques précoces annonciateurs de la survenue de choc toxique staphylococcique menstruel à partir d'une étude cas-témoins comparant les symptômes ressentis pendant les règles les jours précédant la survenue de choc toxique menstruel et au cours des règles précédentes.

Les objectifs secondaires seront la recherche de lien entre le type de symptômes ressentis pendant les règles les jours précédant la survenue de choc toxique menstruel et : (i) la symptomatologie observée pendant les cycles précédents, (ii) la présentation clinico-biologique du choc, (iii) les caractéristiques de la souche de *S. aureus* responsable du choc.

Le projet a commencé en mars 2022 avec l'inclusion de 12 patientes et se poursuivra sur 2023/2024. L'inclusion des témoins est prévu début d'été 2023.

## Staphylocoques et services de néonatalogie

Plusieurs services de réanimations néonatales (RN) en France sont actuellement confrontés à des cas groupés d'infections ou colonisations à *Staphylococcus haemolyticus*. La mission SPIADI de surveillance des bactériémies sur cathéters centraux retrouve d'ailleurs une augmentation entre 2020 et 2021 de la part des bactériémies à *S. haemolyticus* en secteur de néonatalogie (27,7% versus 18,4%).

Le CNR des Staphylocoques a également observé une augmentation globale du nombre de souches de *S. haemolyticus* transmises depuis 2019. Une analyse sur génome complet NGS incluant le typage MLST des souches et une analyse SNPs a permis d'identifier différents *Sequence Type* ST (notamment ST29 et ST25) et au sein de ces ST endémiques en France, d'identifier des clusters géographiques et/ou au sein de certains services présentant des spécificités génétiques.

Le CNR, en lien avec SpF, a recueilli des souches de *S. haemolyticus* afin de mieux caractériser les clones diffusant en France dans les services de néonatalogie tant sur le plan de la virulence que de la résistance mais aussi sur leur capacité de survie dans l'environnement comme cela avait été effectué pour le clone NRCSA de *S. capitis* (Cf paragraphe 4. Alertes). De plus le CNR a présenté les résultats obtenus à plusieurs reprises (différentes journées des CPias, CORUSS) (Cf paragraphe 4. Alertes).

## Projet LINESTAPH : Etude de la résistance au LINEzolidé chez les STAPHylocoques

L'apparition de souches multirésistantes (notamment au sein des staphylocoques à coagulase négative) entraîne une augmentation de la prescription des anti-staphylococciques de recours comme le linézolide, la daptomycine ou la ceftaroline. Les souches résistantes à ces antibiotiques restent pour l'instant rares mais elles peuvent apparaître dès que la consommation, et donc la pression de sélection d'antibiotique, augmente ; c'est notamment le cas pour le linézolide. Nous souhaitons donc mettre à profit la position du CNR afin d'étudier l'épidémiologie et les mécanismes de ces nouvelles résistances. Le CNR a maintenant un accès plus facile aux appareils de séquençage, ce qui nous permet de séquencer ces souches possédant des résistances phénotypiques rares et de potentiellement identifier des gènes ou des mutations à l'origine des résistances.

Le projet LINESTAPH porte sur la résistance aux oxazolidinones (OXZ, comprenant le linézolide, le plus utilisé, et le tédizolide) qui ont été classés par l'OMS comme antibiotiques d'importance critique, qui doivent être préservés et utilisés en « dernier recours ». L'OMS a également catégorisé les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) comme bactéries de priorité élevée pour lesquelles l'évolution des résistances doit être maîtrisée. Dans le même temps, la résistance aux OXZ a émergé depuis une dizaine d'années chez les staphylocoques et les entérocoques à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Au regard des recommandations de l'OMS, il s'agit donc d'un réel problème de santé publique et l'ensemble des acteurs mobilisés contre l'antibiorésistance doit s'employer à préserver l'efficacité de cette famille d'antibiotiques en optimisant leur usage et en cherchant à comprendre les mécanismes de cette émergence. La résistance acquise aux OXZ est associée à différents mécanismes incluant i) des mutations au niveau de la cible ribosomale (ARNr 23S, protéines ribosomales L3, L4 et L22) et ii) des gènes portés par des plasmides tels que *cf*, *optrA* ou *poxtA*. C'est ce deuxième groupe de mécanismes qui est le plus inquiétant car ces gènes sont transférables entre bactéries de la même espèce mais aussi d'espèces ou de genres différents, et ils sont responsables de résistance croisée entre les antibiotiques de la famille des OXZ et d'autres antibiotiques utilisés notamment en médecine vétérinaire (phénicolés principalement). Dans ce contexte, l'objectif premier du projet est de dresser un état des lieux de la prévalence de la résistance aux OXZ chez les staphylocoques en France et d'investiguer les mécanismes de résistance impliqués, leurs prévalences respectives, ainsi que leurs capacités de transfert à d'autres souches.

Les objectifs du projet LINESTAPH sont :

1. réaliser une étude descriptive nationale, portant sur 7 années, de la prévalence de la résistance aux OXZ chez les staphylocoques au moyen d'un questionnaire adressé à un réseau de laboratoires hospitaliers,
2. réaliser un recueil d'environ 200 souches de staphylocoques résistantes au linézolide dans ce même réseau de laboratoires afin de caractériser leur résistance au linézolide au niveau phénotypique et au niveau moléculaire afin de déterminer les mécanismes de résistance au linézolide circulant en France,
3. étudier les mécanismes de transfert des résistances plasmidiques au linézolide et déterminer si certains clones de staphylocoques sont plus à risque de transmettre ou d'acquérir ces résistances.

Cette étude est réalisée en collaboration avec le Pr Vincent Cattoir qui est membre du CNR des résistances en charge de la résistance chez les entérocoques, ce genre bactérien présentant également une augmentation du taux de résistance au linézolide depuis plusieurs années. En effet, l'enquête de prévalence (objectif 1) et le recueil de souches (objectif 2) seront menés en parallèle sur les staphylocoques et les entérocoques.

Le premier axe de ce projet est donc une étude descriptive nationale, portant sur 7 années, de la prévalence de la résistance aux OXZ chez *S. aureus* et les SCN (notamment *S. epidermidis*) et les entérocoques au moyen d'un questionnaire adressé à un réseau de laboratoires hospitaliers maillant le territoire national (recueil de données quantitatives avec évaluation des dynamiques d'évolution temporelles (2014-2020) et spatiales). Cette enquête a été initiée en juin 2021 et diffusée via les réseaux **Azay, ColBVH et GMC**. Chaque laboratoire souhaitant participer était d'abord invité à remplir un formulaire en ligne sur ses pratiques concernant la détection de la résistance au linézolide : technique d'identification des staphylocoques utilisée, technique d'antibiogramme pour déterminer la sensibilité au linézolide, critères d'interprétation (concentration critique utilisée, durée d'incubation). Chaque participant devait ensuite réaliser un recueil rétrospectif de données quantitatives microbiologiques à partir

de son système informatique de laboratoire ou son logiciel expert d'antibiogramme : pour chaque année entre 2014 et 2020, il était demandé de quantifier le nombre de souches sur lesquelles avait été testé le linézolide et le nombre de souches détectées résistantes pour différents populations bactériennes (*S. aureus*, les SARM, *S. epidermidis*, les SCN, *E. faecalis*, *E. faecium* et les autres entérocoques), avec élimination des doublons. Au total, **42 laboratoires** ont participé (21 CHU/20 CH/1 HIA ; 40 en France métropolitaine et 2 dans les DOM/TOM) et ont envoyé leurs réponses entre fin 2021 et novembre 2022. L'analyse de l'enquête de pratiques et du recueil de données quantitatives de résistance est en cours et a pour but de déterminer la prévalence de la résistance au linézolide chez les staphylocoques et entérocoques et son évolution entre 2014 et 2020 : une analyse préliminaire montre une prévalence de la résistance au linézolide en 2020 <0,5 % chez *S. aureus* et entre 2 et 5 % chez les SCN.

Le deuxième axe de ce projet consiste en un recueil de souches de staphylocoques résistantes au linézolide isolées dans ce même réseau de laboratoires ayant participé à l'étude nationale de prévalence. Les laboratoires volontaires étaient invités à transmettre toutes les souches de staphylocoques et entérocoques résistantes au linézolide isolées entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 30 juin 2022. **36 des 42 centres** ont accepté de participer à cette deuxième phase de l'étude : 28 centres ont détecté des souches résistantes au linézolide sur la période d'étude et 314 souches de staphylocoques identifiées comme résistantes au linézolide ont été envoyées au CNR pour caractérisation complète (les dernières souches sont arrivées au CNR début 2023). Au CNR, les souches sont identifiées par Maldi-TOF Vitek@MS (bioMérieux) puis caractérisées phénotypiquement par antibiogramme en microdilution (Sensititre, ThermoFisher). Le mécanisme de résistance au linézolide est ensuite exploré grâce à la PCR multiplex ciblant les gènes *cf*, *optrA* et *poxxA* utilisée au CNR, puis par séquençage du génome complet Illumina (plateforme de séquençage GenEPII, Hospices Civils de Lyon). **291 souches** ont été confirmées comme étant des staphylocoques résistants au linézolide (dont aucun *S. aureus* et 266 *S. epidermidis* ; 9 souches sont porteuses du gène transférable *cf*). A partir des données de séquençage, les souches vont être ensuite caractérisées à l'aide de pipelines automatisés développés au CNR, avec typage MLST *in silico* (identification des clones), résistome complet (sur la base de ResFinder), recherche des mutations ARNr 23S/protéines ribosomales L3-L4-L22 (recherche de SNPs déjà décrits dans la littérature comme associés à la résistance au linézolide) et recherche/caractérisation des gènes *cf*, *optrA* et *poxxA* (BLAST sur les génomes assemblés). Les souches possédant des mécanismes de résistance transférables seront également séquencées par la technique Nanopore afin d'obtenir un séquençage hybride et de pouvoir caractériser et comparer les éventuels plasmides porteurs de ces gènes de résistance. En cas de souches résistantes au linézolide et/ou au tédizolide sans génotype de résistance connu, une recherche de mutations ribosomales et de gènes de résistance non encore décrits chez les staphylocoques sera réalisée. Enfin, une étude phylogénétique sera réalisée sur les souches appartenant à un même fond génétique (même espèce, même ST) et de différentes origines géographiques afin d'évaluer la capacité des clones de staphylocoques résistants au linézolide à diffuser ou non sur le territoire national.

Un versant plus fondamental du projet visera à explorer les mécanismes de transfert *in vitro* des résistances plasmidiques au linézolide et investiguer les facteurs environnementaux ou bactériens qui peuvent les influencer. Pour cela, nous avons déjà initié des travaux préliminaires dans l'équipe du CIRI afin de développer des méthodes d'études de ces transferts. Des discussions sont en cours avec l'Unité Antibiorésistance et virulence bactériennes du laboratoire ANSES de Lyon (Dr M. Haenni) et l'UMR1436 INRAE InTheRes (Innovations thérapeutiques et résistances, Dr E. Dortet-Frisoni) de Toulouse pour développer un projet commun d'étude de la dynamique des transferts horizontaux de gènes de résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques en incluant une approche One-Health (pathologie humaine/vétérinaire/environnement) afin de déposer une demande de financement de type ANR JC-JC.

Le but de ce projet est de mieux appréhender l'épidémiologie des bactéries concernées et d'adapter les mesures de contrôle de la dissémination des souches résistantes aux OXZ ainsi que la prise en charge des patients infectés/colonisés.

### 3.5.2 Surveillance en santé animale

#### S. *anaerobius* en collaboration avec l'école vétérinaire de Nantes.

Le CNR des Staphylocoques a été contacté par l'école vétérinaire de Nantes pour une collaboration et un apport d'expertise dans le cadre d'une étude de souches de *S. anaerobius* responsables de la maladie de Morel chez les caprins. L'expression clinique de la maladie dans les élevages caprins étudiés est assez variable. Cette variabilité s'explique probablement par les différentes pratiques d'élevages, mais il est possible que des différences génétiques entre les souches puissent aussi être à l'origine de ces différences. Le CNR a réalisé la caractérisation du virulome et du résistome des souches collectées et réalisé une phylogénie à partir du génome de ces souches ainsi qu'une analyse de génomique comparée entre les souches et avec les génomes disponibles dans les bases de données.

#### ANSES /Resapath

*Staphylococcus aureus* est considéré comme un pathogène et comme un commensal chez les animaux et de nombreuses études ont détaillé leur prévalence dans diverses populations animales.

Dans le cadre de la surveillance des SARM chez les animaux, le CNR des Staphylocoques a mis en place avec l'ANSES Lyon une collaboration de longue date, facilitée par la proximité géographique des deux structures. Cette coopération a pour objectif de suivre i) l'implication des souches de *S. aureus* à la fois dans la colonisation et les infections animales, ii) les transferts éventuels entre l'Homme et l'Animal.

## 4. Alertes

---

### 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, armées), cas groupés d'infections post-opératoires...) ou microbiologiques (détection de nouveaux clones, augmentation de prévalence de certains clones) fait l'objet d'une information auprès de nos correspondants de SpF par contacts téléphoniques directs ou par mail. S'en suit la mise en place d'une cellule d'aide à la décision à laquelle peuvent participer selon les situations, l'ARS, la Cire, SpF – 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 SpF pour ses intervenants en région.

Les objectifs de la collaboration entre le CNR des Staphylocoques et SpF 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 SpF sur l'apparition de 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. 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.

En 2022, Le CNR a été impliqué dans l'investigation des cas groupés et/ou phénomènes anormaux de différents types détaillés ci-après :

- cas groupés/épidémies dans la communauté et dans les classes professionnelles à risque (comme les militaires), notamment d'infections cutanées par des souches de *S. aureus* productrices de facteurs de virulence comme la PVL ou les exfoliatines
- cas groupés/épidémies dans des établissements de santé, principalement dans les services de réanimation néonatale

Par ailleurs, le développement des techniques de séquençage permet au CNR d'appliquer ces analyses de clonalité à l'échelle individuelle pour répondre à de plus en plus de sollicitations de comparaison de plusieurs souches isolées chez un même patient pour documenter notamment une récurrence d'une infection (n=35 souches expertisées en 2022 pour 13 patients, incluant 16 souches de *S. aureus* et 19 souches de staphylocoques à coagulase négative).

## 4.2 Contribution à l'alerte et l'investigation de cas groupés et/ou phénomènes anormaux dans la communauté

Au total, 9 souches de *S. aureus* ont été séquencées pour la confirmation de liens de clonalité pour 3 épisodes différents de cas groupés d'infections cutanées dans la communauté :

- 3 souches isolées d'enfants d'une même école ayant présenté des lésions d'impétigo (CC121-MRSA-V producteur d'exfoliatines A et B)
- 4 souches isolées de militaires ayant présenté des lésions d'impétigo (CC121-MSSA producteur d'exfoliatines A et B)
- 2 souches isolées de membres d'une même famille ayant présenté une pyodermite étendue du cuir chevelu (CC121-MRSA-V producteur d'exfoliatines A et B)

## 4.3 Contribution à l'alerte et l'investigation de cas groupés et/ou phénomènes anormaux dans les établissements de santé

### 4.3.1 Réanimations néonatales

En 2022, le CNR a participé en lien avec SpF à l'investigation de nombreuses épidémies d'infections à staphylocoques dans différents services de néonatalogie en France. Cette année a notamment été marquée par une saisine nationale pour l'investigation de la recrudescence des cas d'infections à *S. haemolyticus*. Au total, 312 souches (dont 79 *S. aureus*, 1 *S. epidermidis* et 232 *S. haemolyticus*) issues de services de réanimation néonatale ont été séquencées en 2022. Par ailleurs, certaines de ces investigations sont étalées sur plusieurs années et/ou encore en cours avec des cas en 2022 (notamment l'épidémie de Lens entre 2014-2022).

#### 4.3.1.1 Investigation de la recrudescence des cas d'infections/colonisations à *S. haemolyticus* à l'échelle nationale

Depuis 2021, le CNR a constaté une augmentation des cas de bactériémies sur cathéter à *S. haemolyticus* dans les services de réanimation néonatales en France. À la suite d'un phénomène épidémique avec décès dans un CHU pour lequel l'expertise du CNR a été sollicitée, ce dernier a informé SpF en avril 2022 de cette recrudescence de bactériémies afin de voir s'il y avait une augmentation du nombre de signalements au niveau national sans pour autant avoir un envoi de souches au CNR. Le CORRUSS a organisé un point de situation dès mai 2022 auquel le CNR a été

convié. Dans les suites, il a été décidé de prévoir une réunion trimestrielle CNR/SpF, au sujet de ces épidémies. En juin, le CNR a participé à la réunion des responsables signalement des CPias pour faire une information sur la situation et SpF a ainsi informé ses interlocuteurs des CPias afin qu'ils incitent les EOH, d'une part, à signaler dans e-SIN, ces différentes situations et d'autre part, d'envoyer rapidement les souches au CNR. En parallèle, la Mission nationale Surveillance et Prévention des Infections Associées aux Dispositifs Invasifs (SPIADI) a constaté une augmentation des bactériémies à *S. haemolyticus* : 27,7% en 2021 vs 18,4% en 2020, liées à un KT central en néonatalogie chez des patients présentant une grande prématurité et un faible poids de naissance. La DGS a saisi la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H), la Société Française de Néonatalogie (SFN) ainsi que la Société Française de Microbiologie (SFM) pour qu'elles puissent élaborer des recommandations sur les bonnes pratiques de soins, les points critiques et les points à investiguer afin de limiter la diffusion de clusters nosocomiaux en néonatalogie et en réanimation néonatale. Ainsi, Anne Tristan en tant que membre de la SFM a participé à la rédaction des recommandations de la SFM « Avis relatif aux bonnes pratiques de dépistage des micro-organismes chez les patients de néonatalogie de niveau 3 » et à la relecture des recommandations de la SF2H et de la SFN. Par la suite, le CNR a été régulièrement sollicité pour présenter et expliquer les résultats obtenus (juillet 2022 et septembre 2022 : réunion CPIAS Île de France/SpF/Centres hospitaliers, décembre 2022 : CPias Bretagne/EOHs régionales, février 2023 : temps d'échange en région autour des nouvelles recommandations de dépistages (SFM et SFN) CPias Occitanie, février 2023 : CORRUSS, mai 2023 : Journée Signalement des infections associées aux soins Réunion des responsables signalement des CPias).

#### Bilan des résultats obtenus :

Le CNR a séquencé (Whole Genome Sequencing) 492 souches de *S. haemolyticus* (379 associées à la réanimation néonatale/113 hors réanimation néonatale incluant des souches de patients prématurés ou non, de soignants, d'environnement) reçues de toute la France, entre janvier 2017 et mars 2023 (Figures 33, 34, 35). Une caractérisation génomique (typage, résistome, virulome) a été réalisée pour caractériser les fonds génétiques circulant en France. Une analyse phylogénétique a été réalisée pour identifier des populations clonales et leur distribution géographique en incluant les génomes de 321 *S. haemolyticus* issus des bases publiques.

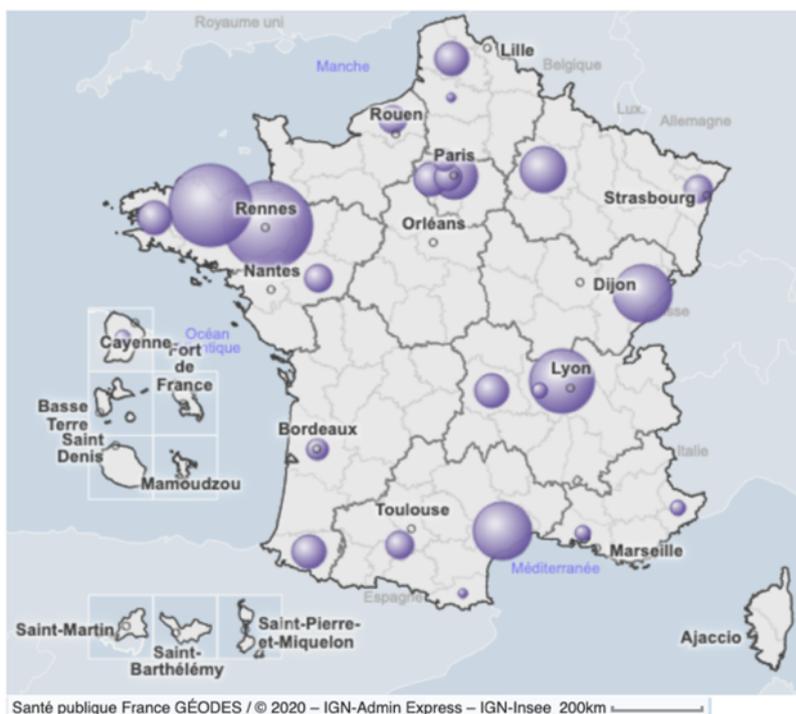


Figure 33- Répartition géographique des souches de *S. haemolyticus* reçues au CNR

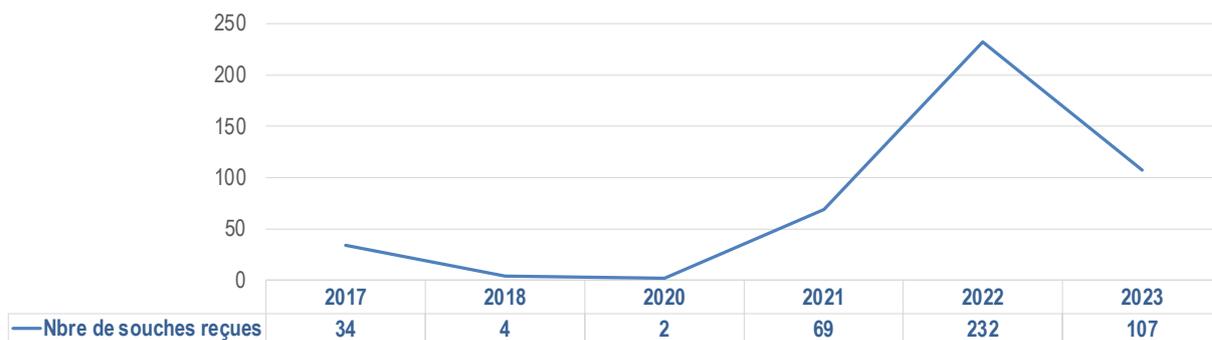


Figure 34- Évolution du nombre de souches de *S. haemolyticus* reçues au CNR au cours du temps

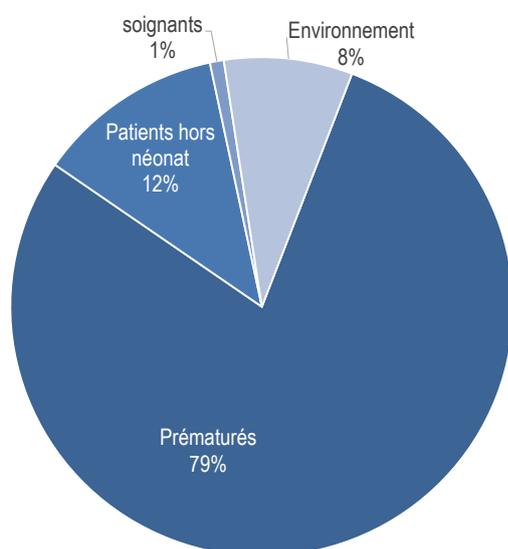


Figure 35- Origine des souches de *S. haemolyticus* reçues au CNR

Deux fonds génétiques ont disséminé dans les RN françaises : ST29 et ST25 (Figure 36). La comparaison phylogénétique montre que les 2 lignées françaises diffèrent de celles décrites récemment dans les réanimations néonatales en Norvège et en Suède<sup>11,12</sup> (Figure 37). Le ST29, clone majoritaire, est endémique dans les réanimations néonatales françaises et semble être bien implanté dans les services (présence dans l'environnement, manuportage). Il présente une capacité à s'adapter localement et des transferts entre services ont été mis en évidence (Figure 38A). Le ST25 a une distribution géographique moins large et dans les centres hospitaliers où il s'est établi, il est présent en dehors les réanimations néonatales (Figure 38B).

<sup>11</sup> Cavanagh JP et al. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Nov;69(11):2920-7.

<sup>12</sup> Westberg R et al. Molecular Epidemiology of Neonatal-Associated *Staphylococcus haemolyticus* Reveals Endemic Outbreak. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6):e0245222.

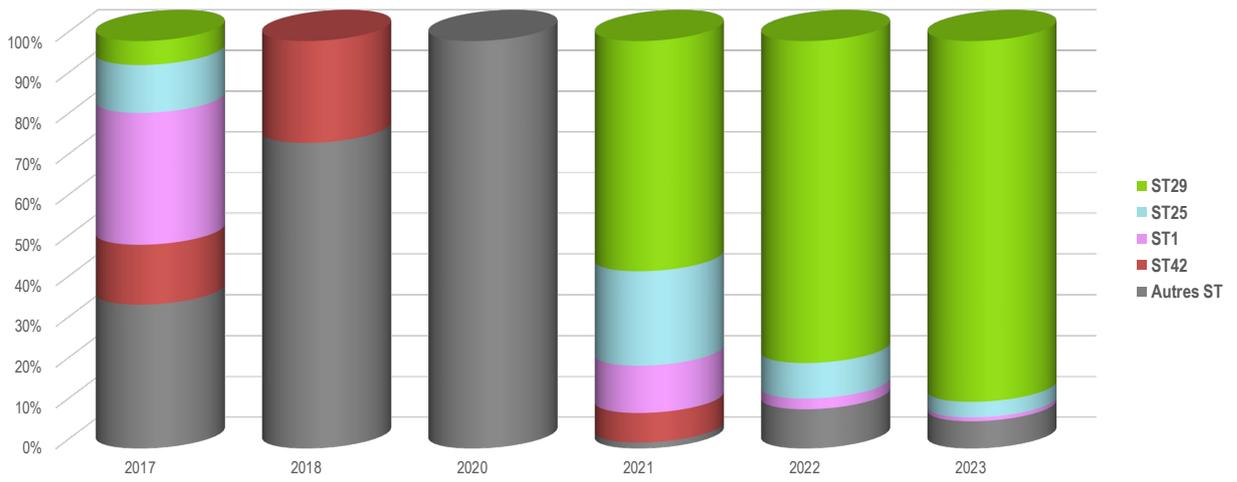


Figure 36- Différents sequence type retrouvés dans les souches de *S. haemolyticus* en France de 2017 à 2023

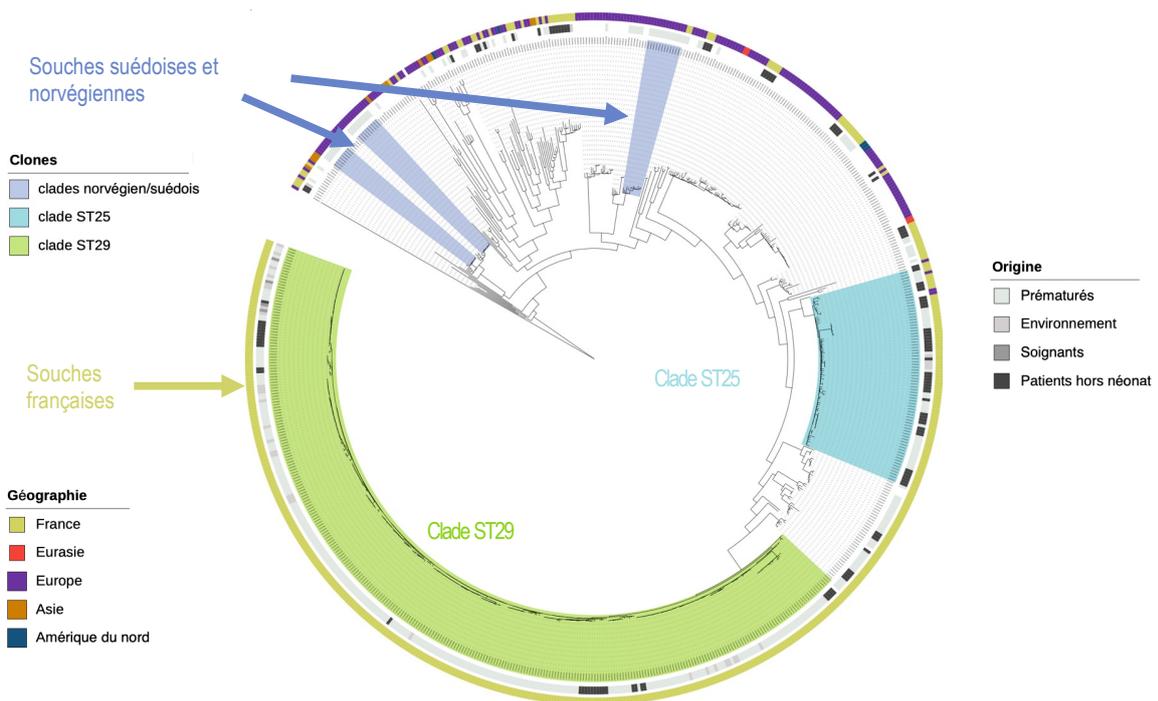
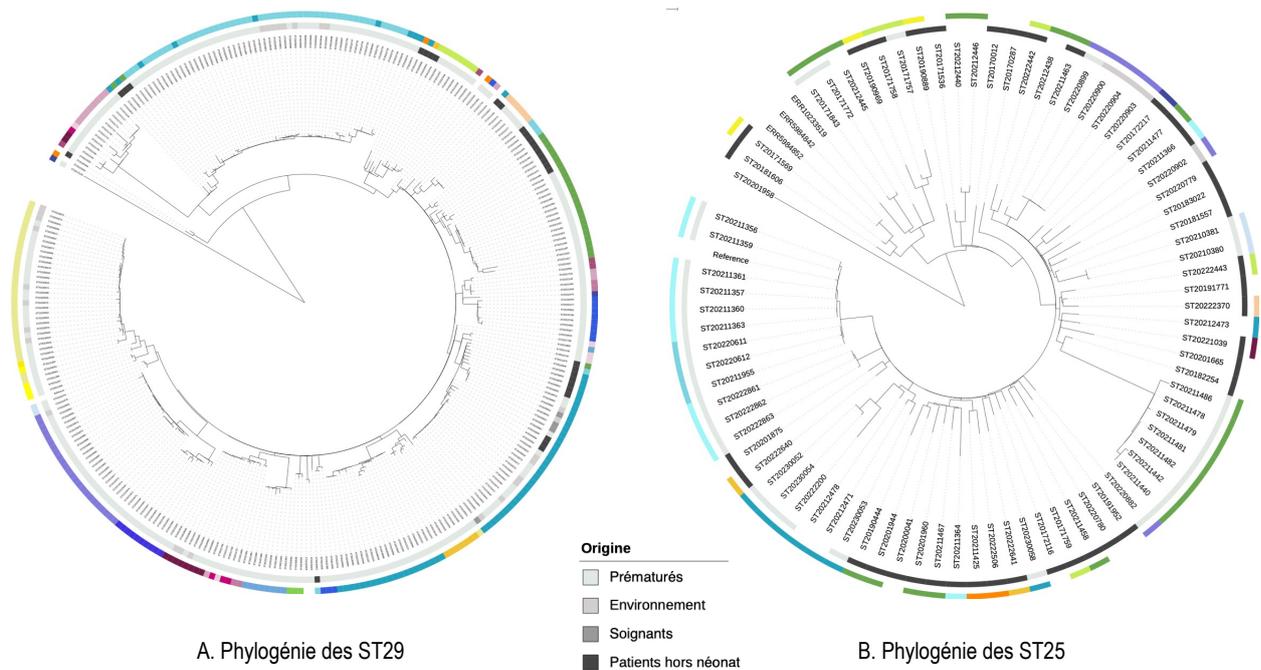


Figure 37- Phylogénie des souches de *S. haemolyticus* (publiques et CNR)



**Figure 38-** Phylogénie des souches de *S. haemolyticus* reçues au CNR de 23 centres hospitaliers en France. Chaque couleur sur le cercle extérieur correspond à une localisation géographique.

Ces 2 lignées ont un répertoire de gènes de virulence caractéristique des *S. haemolyticus* : cytotoxines, adhésines et capacité à produire du biofilm. Elles sont multirésistantes et présentent plus de marqueurs de résistance que les autres fonds génétiques présents en France : une résistance à la rifampicine, aux aminosides, à la mupirocine ainsi qu'une sensibilité diminuée aux glycopeptides, largement utilisés dans les réanimations néonatales.

Il convient de poursuivre l'expertise sur le pouvoir pathogène et les capacités d'adaptation des *S. haemolyticus* et maintenir une surveillance rapprochée dans les services de réanimations néonatales français mais aussi européens.

Un abstract a été soumis au congrès Microbes de la SFM et en article est en cours de rédaction en lien avec SpF.

#### 4.3.1.2 Investigation des autres épidémies en services de néonatalogie

Le CNR a principalement été sollicité pour l'investigation de cas de transmission croisée de souches de SARM isolées dans des prélèvements de colonisation ou d'infections de prématurés (Figure 39) représentant un total de 54 souches de SARM analysées dans ce contexte en 2022.

Les complexes clonaux CC5-MRSA et CC8-MRSA sont les plus représentés.

Les investigations correspondantes sont détaillées ci-dessous. Deux exemples d'arbres phylogénétiques utilisés pour l'investigation de ces cas groupés sont présentés dans les Figures 40 et 41 pour le CH de Lens et le CHU d'Angers.

Nous avons également reçu 15 souches de SASM isolées de deux services de réanimation néonatale (Chambéry n=13, Troyes n=2).

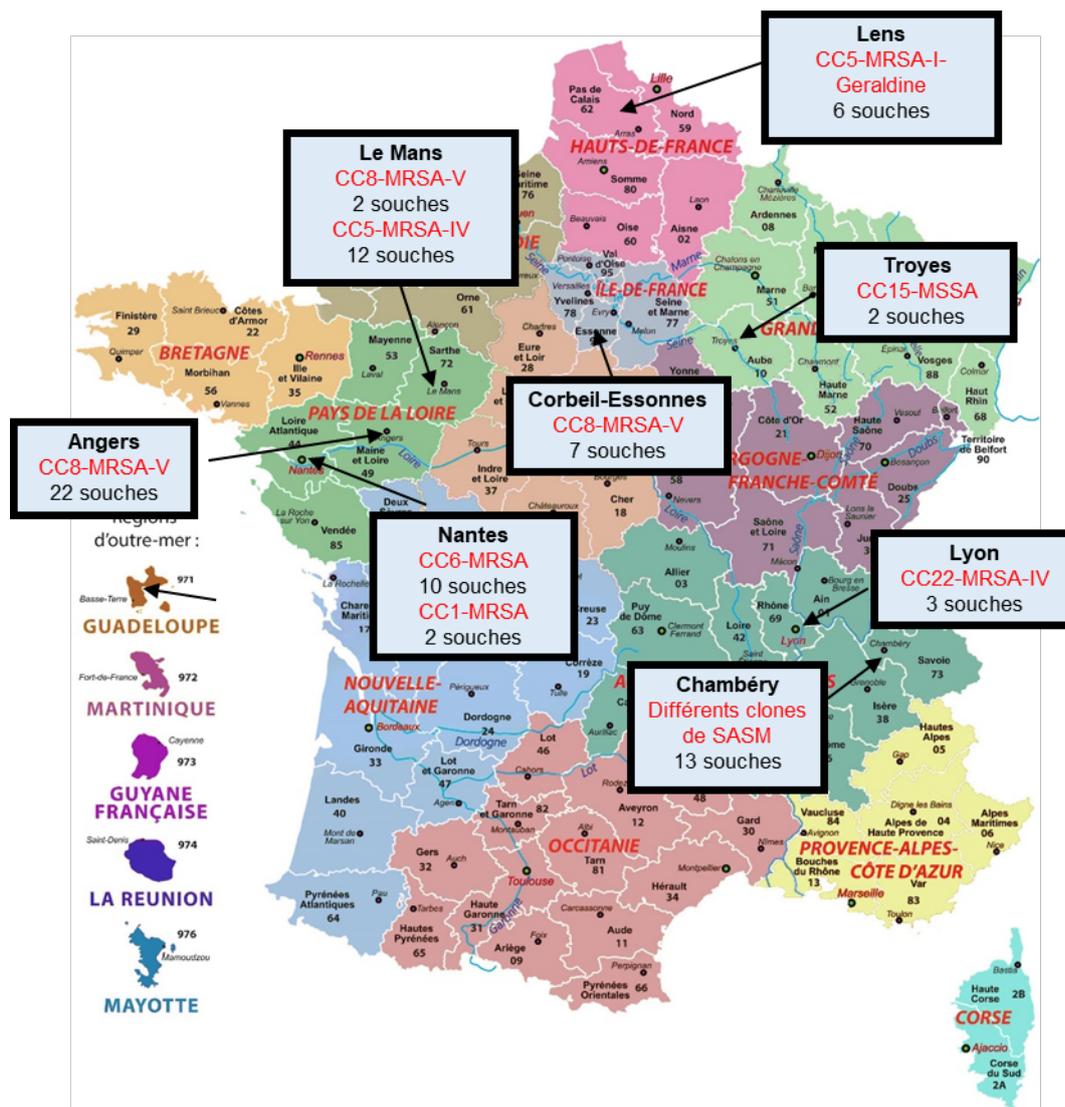


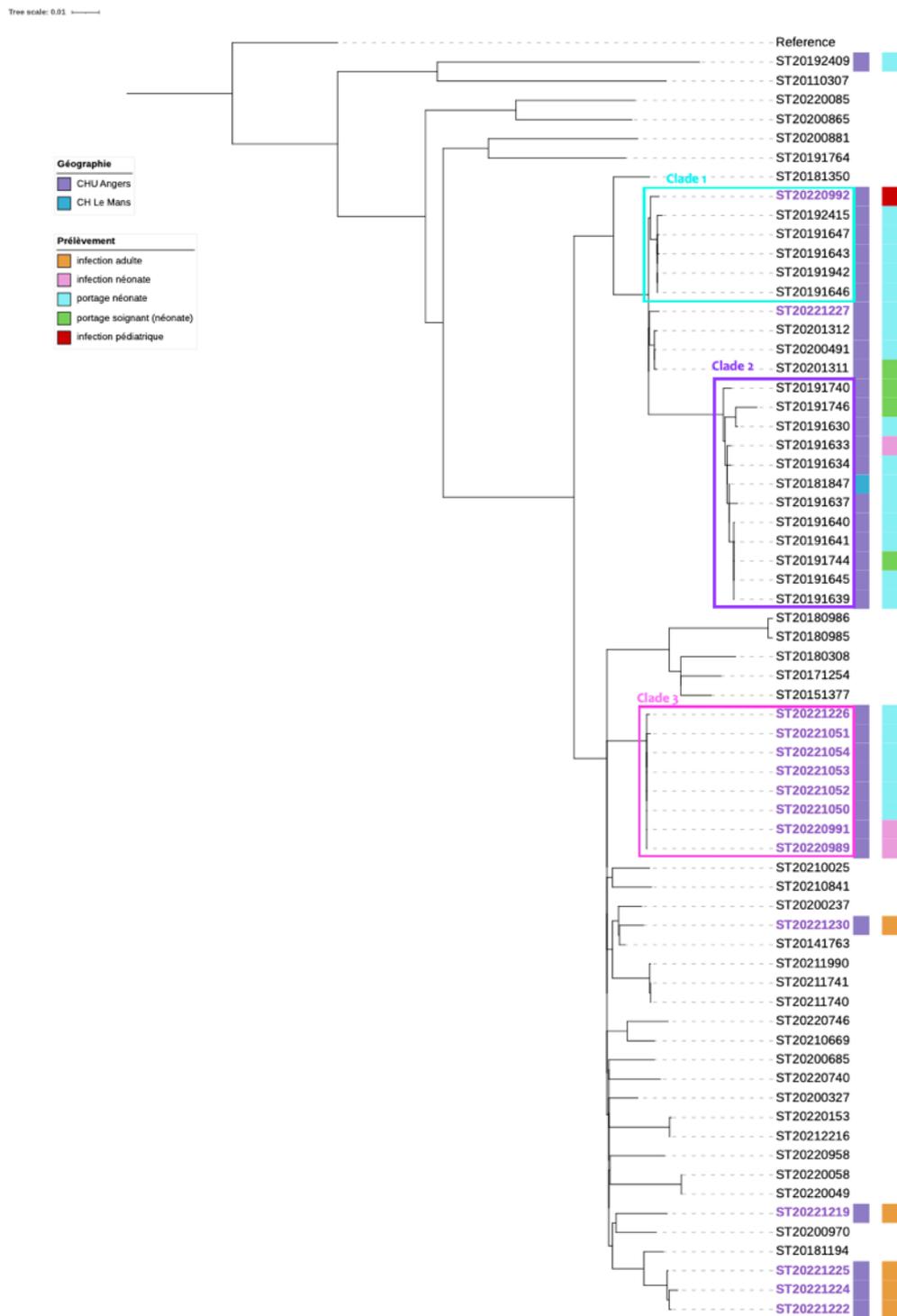
Figure 39- Investigation d'évènements de transmission croisée de souches de *S. aureus* dans les services de néonatalogie en France en 2022.

### CH Lens : CC5-MRSA-I clone Géraldine

Depuis 2015, le CNR poursuit l'investigation d'une épidémie toujours en cours dans le service de néonatalogie de Lens. Ainsi, en 2022, nous avons reçu 6 nouvelles souches isolées de 4 prélèvements de surveillance de colonisation, un prélèvement respiratoire et une hémoculture pour déterminer s'il s'agissait toujours de la même population bactérienne. Ces 6 souches ont été identifiées comme appartenant au clone Géraldine. 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) (Figure 40). Ces résultats corroborent l'endémie de cette souche Géraldine au sein du service de Néonatalogie de Lens.





**Figure 41-** Phylogénie des souches de *S. aureus* CC8-MRSA-V isolées dans le service de réanimation néonatale du CHU d'Angers en 2022 (indiquées en violet).

### CH Corbeil-Essonnes : CC8-MRSA-V

Nous avons reçu 7 souches isolées de 3 prélèvements de dépistage chez des nouveaux nés et de 4 prélèvements de lait maternels. Ces 7 souches appartenaient au CC8-MRSA-V producteur du gène codant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Les souches présentaient une très faible distance génétique entre elles pouvant indiquer des événements de transmission croisée entre lait maternel et les enfants.

### 4.3.2 Hors réanimation néonatale

Le CNR a principalement été sollicité pour la comparaison de souches de *S. aureus* (n=38 souches pour 36 patients) associées à des infections de sites opératoires dans 6 hôpitaux différents. Dans tous ces cas, nos analyses ont conclu à une absence d'évènements de transmission entre patients. Nous avons cependant pu établir un lien de clonalité entre 2 souches de *S. aureus* responsables d'infections cutanées chez deux patientes partageant la même chambre d'hôpital malgré l'absence de productions de facteurs de virulence associés aux infections cutanées (CC7-MSSA).

Enfin, nous avons également été impliqués dans l'investigation de suspicions de cas groupés d'infections à staphylocoques à coagulase négative (n=12 souches).

## 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

---

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

La rétro-information et la diffusion aux professionnels et vers l'ensemble des partenaires sont faites via différents canaux qui assurent la diffusion des données générées dans le cadre des missions confiées par SpF au CNR des Staphylocoques afin de faire connaître les données épidémiologiques collectées et les résultats des travaux conduits en lien avec ces missions.

La transmission des données auprès de SpF et de ses correspondants peut revêtir deux formes distinctes :

- la transmission de données de nature épidémiologiques construites par agrégation de données de surveillance épidémiologiques et qui sont totalement anonymes. La transmission de ces données n'est donc pas soumise à des précautions particulières relevant de la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel,

- pour la transmission de données non anonymisées, les biologistes du CNR possèdent tous une adresse sécurisée de santé via MonSisra

- la transmission de données associées à un ou plusieurs patients. Le CNR, en lien avec la Direction du Système d'Information (DSII) des HCL met en place un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la DSII pour la Direction Générale des HCL. Ce système permet un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un serveur sécurisé « HYBRID » qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des résultats. Ce serveur de résultats spécifique (HYBRID) est disponible pour tous les établissements extérieurs. L'accès au serveur de résultats HYBRID peut être demandé auprès du service clientèle joignable par mail à l'adresse suivante : [relationclient.lbmms@chu-lyon.fr](mailto:relationclient.lbmms@chu-lyon.fr). Ce serveur ne se substitue pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au site internet du CNR.

#### Site Internet

Le CNR dispose d'un site internet <https://cnr-staphylocoques.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. Ce site internet va être amené à évoluer au cours du prochain mandat afin de devenir plus interactif.

#### Interventions en séminaires FMC/DPC et Congrès

Les membres du CNR répondent chaque année à un nombre important de sollicitations dans le cadre de séminaires de formation continue à travers toute la France ou de congrès nationaux afin de présenter (i) la diversité des situations cliniques associées aux infections staphylococciques, (ii) les données cliniques et épidémiologiques

collectées par le CNR, (iii) les outils de diagnostic ou de typage disponibles. (Voir liste des publications et communications).

### Organisations de FMC spécifiques

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

- Bioformation « Résistance aux antibiotiques » – module de base (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- Bioformation « Résistance aux antibiotiques » – module de perfectionnement (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- Atelier FMC bioMérieux « Infections ostéo-articulaires »
- Laurent F. DU Antibiothérapie, Paris XI. « Mécanisme de résistances des staphylocoques » (2h) Nov 2022.

### Organisation de colloques et congrès

Les membres du CNR organisent chaque année les journées régionales du CRIOAc Auvergne Rhône Alpes.

En 2023, le colloque annuel « PHAGES.fr in ... » aura lieu 27 au 29/11 à Lyon

### 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).

### Guides élaborés

**Anne Tristan** a participé en 2022 à l'élaboration des recommandations de la SFM (société française de microbiologie) sur « les bonnes pratiques de dépistage des micro-organismes chez les patients de néonatalogie de niveau 3 » en réponse à la saisine de la DGS.

**Gérard Lina** a participé à l'élaboration des CA-SFM EUCAST, 2022 et EUCAST 2022 (<http://www.eucast.org/>)

**François 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*.

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, SpF). 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 par

an). 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.

## Accueil de stagiaires

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

Dans le cadre d'un accord cadre du ministère des affaires étrangères entre la France et l'Afghanistan et sous l'égide des facultés de pharmacie de Kaboul et de Lyon, en 2018, le CNR a accueilli entre 2018 et 2022, le Dr Haji Mohammad NAIMI pour réaliser une thèse de doctorat à temps partagé (6 mois en France /6 mois en Afghanistan chaque année). Le projet de thèse porte à la fois sur i) sur la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de SASM et de SARM circulants en Afghanistan au sein des hôpitaux (souches nosocomiales), mais aussi dans la communauté (souches de ville), et chez les animaux, ii) sur l'étude des mécanismes de transferts horizontaux SCN-SA de la résistance au linézolide<sup>13</sup>. Le Dr NAIMI a soutenu sa thèse de doctorat en septembre 2021. À la suite des événements politiques en Afghanistan, le Dr NAIMI n'a pu regagner son pays et a obtenu le statut de réfugié en France et a été accueilli en 2022 dans notre laboratoire dans le cadre d'une bourse du ministère des affaires étrangères.

Ainsi, en 2023, nous accueillerons une stagiaire algérienne (Cf paragraphe 8. Programme d'activité pour les années suivante).

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

## 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

### INVS-Santé Publique France

Des liens étroits ont été tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR des Staphylocoques et SpF, notamment l'équipe d'Anne Berger-Carbonne 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. Ainsi, en 2022, le CNR a travaillé de concert avec SpF dans le contexte de la saisine en lien avec

<sup>13</sup> Naimi HM et al. Antibiotic resistance profile and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals in Kabul, Afghanistan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021 May;40(5):1029-1038.

des cas groupés d'infections ou colonisations à *Staphylococcus haemolyticus* en réanimation néonatale et néonatalogie (Cf paragraphe 4. Alertes).

### Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Dans le cadre de son expertise sur la résistance aux antibiotiques, le CNR avait adressé un document de synthèse au CA-SFM en 2018 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 blancs aux glycopeptides. Le CA-SFM avait alors pris en compte l'ensemble des remarques et recommandations du CNR.

### Instances Judiciaires

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

### 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 issus de 23 pays. Son comité exécutif est formé de 5 personnes dont F. Laurent a été désigné Chair/Président en 2022 pour les 3 prochaines années.

Parmi les multiples missions de ce groupe, l'organisation d'un contrôle de qualité externe pour les laboratoires de référence européens revêt une importance majeure et a permis de créer un réseau de collaboration au niveau Européen et qui tend même à s'étendre au-delà. Ce CQE a été organisé par notre CNR depuis 2017.

### 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, déterminer des diamètres ou concentrations critiques pour des antibiotiques n'en disposant pas encore et disposer des ECOFFS (Epidemiological Cut-Off values). Ainsi, il n'existe pas actuellement 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 2020-2021 à une étude multicentrique organisée sous l'égide de 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. Les résultats des différents laboratoires ayant participé à cette étude ont été compilés et des analyses complémentaires par NGS sont en cours avant publication. De plus, en 2023, le CNR participera à la définition des ECOFFS des staphylocoques vis-à-vis de la pristinamycine en raison de l'arrêt de la commercialisation de la dalfopristine-quinupristine.

Le Pr Frédéric Laurent est responsable du pilotage de l'EUCAST Subcommittee for phage Susceptibility Testing.

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

### Communication dans les médias

Depuis 2015, pour donner suite à un fait divers ayant animé les réseaux sociaux concernant le **choc menstruel staphylococcique**, le CNR (Dr Anne Tristan et Pr Gérard Lina) est régulièrement sollicité par les médias afin de communiquer sur le sujet dans des émissions de télévision. De même, le CNR (Pr Frédéric Laurent, Pr Tristan Ferry)

a été régulièrement sollicité (articles, reportage radio et télé, film) sur les thématiques en lien avec la **phagothérapie** et la **production de phages thérapeutiques**.

### **Pr Gérard Lina**

Parole d'Expert Pr LINA : « Pour prévenir le syndrome du choc toxique menstruel », 11/04/2022, TLMFMCC  
<https://tlmfmc.com/parole/pr-lina-pour-prevenir-le-syndrome-du-choc-toxique-menstruel.html,216>

« Choc toxique menstruel : le connaître pour l'éviter », 24/10/22, Planète Santé  
<https://www.planetesante.ch/Magazine/Grossesse/Sante-des-femmes/Choc-toxique-menstruel-le-connaître-pour-l-eviter>

Syndrome du choc toxique lié aux règles, 03/02/2022, Site internet des HCL  
<https://www.chu-lyon.fr/syndrome-du-choc-toxique-lie-aux-regles-tampons>

### **Pr Frédéric Laurent**

Santé. « Les bactériophages, ces virus qui nous soignent », 02/05/2022, Ouest France  
<https://www.ouest-france.fr/sante/sante-les-bacteriophages-ces-virus-qui-nous-soignent-8bdffef6-bcb2-11ec-a567-e86cf18d060a>

« Phagothérapie : Des virus pour soigner des infections résistantes aux antibiotiques », 20/09/2022, Site internet des HCL  
<https://www.chu-lyon.fr/phagothérapie-des-virus-pour-soigner-des-infections-resistantes-aux-antibiotiques>

## 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

#### Sensitivity of the PBP2a SA Culture Colony Test on shortly incubated subcultures of methicillin-resistant staphylococci from positive blood cultures.

Munier C, Dupieux C, Kolenda C, Ranc AG, Dauwalder O, Bes M, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023 May;106(1):115917. PMID: 36907018.

La caractérisation rapide de la résistance à la méticilline des staphylocoques isolés d'hémocultures est un enjeu majeur du diagnostic en raison de l'impact thérapeutique de ce diagnostic. La sensibilité d'un test immunochromatographique pour la détection de la résistance à la méticilline (PBP2a SA Culture Colony Test, Alere-Abbott) sur des sub-cultures de staphylocoques incubées brièvement à partir d'hémocultures positives a été évaluée par le CNR. Le test est très sensible pour la détection des SARM après une sous-culture de 4 heures, mais nécessite une incubation de 6 heures pour les staphylocoques coagulase-négatifs résistants à la méticilline. **L'échantillonnage des souches testées a été réalisé grâce aux biobanques et à l'expertise du CNR permettant des conclusions robustes indépendantes de l'épidémiologie locale.**

#### Targeted proteomics links virulence factor expression with clinical severity in staphylococcal pneumonia.

Pivard M, Bastien S, Macavei I, Mouton N, Rasigade JP, Couzon F, Youenou B, Tristan A, Carrière R, Moreau K, Lemoine J, Vandenesch F.

*Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Apr 3;13:1162617. PMID: 37077532

*Staphylococcus aureus* héberge de nombreux facteurs de virulence qui contribuent à la sévérité des infections dont il est responsable. Au-delà de la présence ou de l'absence de gènes de virulence, on sait que le niveau d'expression des protéines de virulence varie selon les lignées et les isolats de *S. aureus*. Cependant, l'impact du niveau d'expression sur la sévérité de l'infection est mal compris en raison du manque de méthodes de quantification à haut débit des protéines de virulence. Notre laboratoire a développé dans le cadre du RHU IDBIORIV porté par F. Vandenesch une approche protéomique ciblée capable de quantifier 42 protéines staphylococciques en une seule expérience. En utilisant cette approche, nous avons comparé les virulomes quantitatifs de 136 isolats de *S. aureus* provenant de la cohorte nationale de patients français atteints de pneumonie staphylococcique communautaire sévère, tous nécessitant des soins intensifs<sup>14</sup>. Nous avons utilisé des modèles de régression multivariés ajustés à l'état de santé de base du patient (score de comorbidité de Charlson) pour identifier les facteurs de virulence dont le niveau d'expression in vitro prédit les marqueurs de gravité de la pneumonie, à savoir la leucopénie et l'hémoptysie, ainsi que la survie du patient. Nous avons constaté que la leucopénie était prédite par une expression plus élevée de HlgB, Nuc et TSST-1 et une expression plus faible de Blal et HlgC, tandis que l'hémoptysie était prédite par une expression plus élevée de BlaZ et HlgB et une expression plus faible de HlgC. Enfin, la mortalité était prédite de manière indépendante et dose-dépendante par un seul facteur de virulence, la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL), à la fois dans les modèles de régression logistique (OR 1,28 ; 95%CI [1,02;1,60]) et de survie (HR 1,15 ; 95%CI [1,02;1,30]). **Le CNR est partenaire de ce projet puisque les souches de la cohorte pneumonie et leur données associées sont issues du CNR ; par ailleurs, le développement technologique de la protéomique hautement multiplexée est en cours de standardisation pour une utilisation routinière et un rendu patient rapide.**

<sup>14</sup> Gillet Y et al. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. *Eur Respir J*. 2021 Nov 11;58(5):2004445.

### All *Staphylococcus aureus* bacteraemia-inducing strains can cause infective endocarditis: Results of GWAS and experimental animal studies.

Bastien S, Meyers S, Salgado-Pabón W, Giulieri SG, Rasigade JP, Liesenborghs L, Kinney KJ, Couzon F, Martins-Simoes P, Moing VL, Duval X, Holmes NE, Bruun NE, Skov R, Howden BP, Fowler VG Jr, Verhamme P, Andersen PS, Bouchiat C, Moreau K, Vandenesch F.

J Infect. 2023 Feb;86(2):123-133. PMID: 36603774.

Nous avons cherché à déterminer si des souches spécifiques de *S. aureus* sont associées à la survenue d'une endocardite infectieuse (EI) au cours d'une bactériémie à *Staphylococcus aureus* (SAB). Une étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) comprenant 924 génomes de *S. aureus* provenant de patients atteints d'EI (274) et de SAB sans EI (650) issus de cohortes internationales a été réalisée, et un sous-ensemble de souches a été testé avec deux modèles animaux expérimentaux d'endocardite infectieuse, l'un étudiant l'étape précoce de l'adhésion bactérienne aux valves de souris enflammées, l'autre évaluant le processus de développement local et systémique de l'endocardite infectieuse sur des valves de lapin endommagées mécaniquement. Le profil génétique des souches d'EI et de SAB-non EI ne diffère pas si l'on considère les SNPs, les séquences codantes et les k-mères analysés dans le cadre de l'étude d'association pangénomique. Dans le modèle murin d'EI induite par l'inflammation, aucune différence n'a été observée entre les souches d'EI et non IE en termes d'adhésion aux valves cardiaques et de propension à provoquer l'EI ; dans le modèle de lapin d'EI induit par altération valvulaire mécanique, aucune différence n'a été observée entre les souches d'EI et de SAB non EI en ce qui concerne la taille de la végétation et les CFU. Nous en avons conclu que toutes les souches de *S. aureus* isolées chez des patients atteints de SAB doivent être considérées comme capables de provoquer cette complication non exceptionnelle et très sévère une fois qu'elles ont accédé à la circulation sanguine.

Ce travail collaboratif international **associe au CNR des laboratoires Danois, US, et Australiens permettant de réunir plusieurs cohortes (pour la France, VIRSTA, dont les souches sont au CNR)** et de conduire l'analyse génomique d'un très grand nombre de souches/patients.

### Linezolid resistance: detection of the *cfr(B)* gene in French clinical MRSA strains.

Youenou B, Martins Simoes P, Tristan A, Farfour E, Beuruelle C, Kolenda C, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Dupieux C.

J Antimicrob Chemother. 2023 Feb 1;78(2):445-449. doi: 10.1093/jac/dkac411. PMID: 36509546

La résistance aux oxazolidinones chez *S. aureus* reste un phénomène rare mais c'est une menace potentielle qui doit être surveillée. A ce titre nous décrivons deux souches de SARM résistantes au linézolide et porteuses du gène ***cfr(B)*** **détectées au CNR**. Ces souches ont été isolées chez des patients atteints de mucoviscidose dans deux hôpitaux français différents en 2017 et 2019 et leurs mécanismes de résistance au linézolide explorés. La sensibilité aux antimicrobiens a été testée en utilisant la microdilution en bouillon et les gradients E-tests. Les déterminants génétiques de la résistance au linézolide ont été évalués par une PCR multiplex ciblant les gènes *cfr/cfr(B)*, *optrA* et *poxtA*, par amplification et séquençage des gènes codant l'ARNr 23S et enfin par WGS en utilisant à la fois les technologies Illumina et Nanopore. Les deux souches de SARM étaient résistantes au linézolide mais sensibles au tédizolide, et positives par PCR pour *cfr/cfr(B)*. L'analyse WGS a indiqué qu'elles appartenaient à deux ST différents (ST8-MRSA-IV et ST5382-MRSA-IV) et qu'elles hébergeaient toutes deux le gène *cfr(B)* sur le même transposon chromosomique de 9,7 kb de type Tn6218, une découverte uniquement rapportée auparavant chez *Enterococcus* sp. et *Clostridioides difficile*. À notre connaissance, il s'agit de la première description de la présence de *cfr(B)* chez les staphylocoques, et plus particulièrement chez les souches de SARM résistantes au linézolide. Cette découverte illustre le risque de transfert horizontal inter-genres de gènes de résistance à l'oxazolidinone chez *S. aureus* et souligne l'importance de surveiller cette émergence chez cette espèce.

### Environmental Persistence of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in Neonatal Intensive Care Units: Role of Biofilm Formation, Desiccation, and Disinfectant Tolerance.

Chavignon M, Coignet L, Bonhomme M, Bergot M, Tristan A, Verhoeven P, Josse J, Laurent F, Butin M. Microbiol Spectr. 2022 Dec 21;10(6):e0421522. PMID: 36409142.

Le clone de *Staphylococcus capitis* NRCS-A est responsable de bactériémies tardives dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN) du monde entier. Au fil du temps, ce clone a évolué en trois sous-groupes qui sont de plus en plus adaptés à l'environnement des USIN. Cette étude visait à décrypter les mécanismes impliqués dans la persistance de NRCS-A dans les USIN. Vingt-six souches de *S. capitis* appartenant à chacun des trois sous-groupes du clone NRCS-A et à deux autres groupes non NRCS-A provenant de nouveau-nés (clone alpha) ou de patients adultes (« autres souches ») ont été comparées sur la base de leur cinétique de croissance et de leur capacité à former un biofilm, ainsi que de leur tolérance à la dessiccation et à différents désinfectants. La formation du biofilm de *S. capitis* a été favorisée dans un milieu riche et a diminué dans des conditions de stress nutritif pour toutes les souches. Cependant, dans des conditions de stress nutritif, les souches NRCS-A ont présenté une capacité accrue à adhérer et à former un biofilm mince contenant plus de bactéries viables et cultivables (moyenne 5,7 log<sub>10</sub> CFU) que les souches du clone alpha (moyenne 1,1 log<sub>10</sub> CFU) et les « autres souches » (moyenne 4,2 log<sub>10</sub> CFU) (P < 0,0001). Le biofilm est composé d'agrégats bactériens avec une matrice principalement composée de polysaccharides. Le clone NRCS-A a également montré une meilleure persistance après une dessiccation de 48 heures. Cependant, la tolérance aux désinfectants n'a pas été améliorée dans le clone NRCS-A par rapport à celle des souches provenant de patients adultes. En conclusion, la capacité à former un biofilm en cas de stress nutritionnel et à survivre à la dessiccation sont deux avantages majeurs du clone NRCS-A qui pourraient expliquer sa capacité à persister et à s'installer dans l'environnement spécifique des unités de soins intensifs néonataux. Ces résultats sont essentiels pour fournir des indices en vue du développement ultérieur de méthodes ciblées pour lutter contre NRCS-A et arrêter sa dissémination. **Le CNR est intervenu dans cette étude pour caractériser au niveau moléculaire les souches de *S. capitis* et fournir l'expertise microbiologique.**

### Targeted Proteomics Analysis of Staphylococcal Superantigenic Toxins in Menstrual Fluid from Women with Menstrual Toxic Shock Syndrome (mTSS).

Courçon M, Badiou C, Louwagie M, Etievant S, Jaquinod M, Lina G, Brun V. Toxins (Basel). 2022 Dec 19;14(12):886. PMID: 36548783.

Le syndrome du choc toxique menstruel (SCTM) est une maladie fébrile rare, potentiellement mortelle, qui survient chez les femmes utilisant une protection menstruelle intravaginale. Il est causé par la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) produite par *Staphylococcus aureus*, qui déclenche une éruption cutanée et une hypotension soudaines, entraînant par la suite une défaillance de plusieurs organes. La détection de la TSST-1 et des facteurs de virulence de *S. aureus* dans les sécrétions menstruelles pourrait accélérer le diagnostic et améliorer la prise en charge thérapeutique du syndrome de stress post-traumatique. Cependant, le liquide menstruel est une matrice très complexe, ce qui rend la détection des toxines bactériennes difficile. Nous présentons ici une approche protéomique basée sur la spectrométrie de masse pour l'analyse quantitative ciblée de quatre toxines superantigéniques de *S. aureus* dans les fluides menstruels (TSST-1, SEA, SEC et SED). Cette méthode a été appliquée pour caractériser les niveaux de toxines dans les fluides menstruels prélevés chez des patientes atteintes de mTSS et chez des femmes en bonne santé. Les toxines ont été détectées dans les échantillons de patientes atteintes de STM et d'une donneuse saine à des concentrations allant de 0 à 0,46 µg/ml pour le TSST-1 et de 0 à 1,07 µg/ml pour le SEC. SEA et SED n'ont jamais été détectés dans les échantillons cliniques, même si de nombreuses souches de *S. aureus* étaient positives pour les gènes correspondants. La méthode présentée ici pourrait être utilisée pour explorer la production de toxines in vivo chez les utilisatrices de dispositifs intravaginaux afin d'améliorer le diagnostic, la compréhension et la prévention du mTSS. Dans ce travail, **le CNR est intervenu pour organiser l'enquête prospective nationale entre mars 2014 et juin 2017 chez les femmes en période d'activité génitale**. Les échantillons recueillis ont permis de conduire différentes études dont celle-ci.

### Phage Therapy against *Staphylococcus aureus*: Selection and Optimization of Production Protocols of Novel Broad-Spectrum Silviavirus Phages.

Kolenda C, Medina M, Bonhomme M, Laumay F, Roussel-Gaillard T, Martins-Simoes P, Tristan A, Pirot F, Ferry T, Laurent F, PHAGEinLYON Study Group.

Pharmaceutics. 2022 Sep 6;14(9):1885. PMID: 36145633.

Contexte : La thérapie par les phages est une stratégie antimicrobienne prometteuse pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens dans les infections causées par *Staphylococcus aureus*. Le développement de phages thérapeutiques à usage humain doit respecter les normes pharmaceutiques, y compris la sélection de bactériophages strictement lytiques à fort potentiel thérapeutique et l'optimisation de leur processus de production. Résultats : Nous décrivons ici trois nouveaux phages Silviavirus actifs contre 82% d'une large collection de souches (n = 150) représentatives de diverses lignées de *S. aureus* sensibles et résistants à la méticilline circulant dans le monde et **constituée grâce à l'expertise et aux biobanques du CNR**. Nous avons également étudié l'optimisation de l'efficacité et de la sécurité des protocoles d'amplification des phages. Pour ce faire, nous avons sélectionné une souche bactérienne bien caractérisée afin de (i) maximiser les rendements de production de phages, atteignant des titres de 10<sup>11</sup> PFU/mL en seulement 4 heures ; et (ii) faciliter la pureté des phages tout en minimisant le risque de présence de contaminants provenant de l'hôte bactérien, c'est-à-dire des facteurs de virulence sécrétés ou des phages tempérés induits. Conclusions : En résumé, nous proposons une approche de qualité par conception pour l'amplification de phages anti-*S. aureus* à large spectre, facilitant les étapes suivantes du processus de fabrication, à savoir la purification et le contrôle de la qualité.

### SARS-CoV-2 with Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* healthcare-associated pneumonia in the Indian Ocean.

Allou N, Allyn J, Traversier N, Baron M, Blondé R, Dupieux C, Coolen-Allou N, Jabot J, Miltgen G.

Heliyon. 2022 Sep;8(9):e10422. PMID: 3609194.

A la mi-2022, la littérature ne rapportait qu'un seul cas de surinfection par *Staphylococcus aureus* producteur de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) chez un patient atteint du syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère secondaire à une pneumonie à coronavirus 2 (SRAS-CoV-2). Nous rapportons ici les deux premiers cas de pneumonie associée aux soins à *S. aureus* producteur de PVL chez des patients hospitalisés pour une pneumonie due au SRAS-CoV-2 dans la région de l'océan Indien. **Les deux souches de *S. aureus* caractérisées au CNR** appartiennent au clone ST152/t355, un clone connu de *S. aureus* producteur de PVL qui circule en Afrique et est responsable d'infections importées en Europe. Nos deux cas renforcent l'hypothèse selon laquelle l'infection par le SRAS-CoV-2 favorise la survenue d'une pneumonie à *S. aureus* producteur de PVL. La production de PVL doit être recherchée chez les patients revenant de la région de l'océan Indien et présentant une pneumonie sévère à SARS-CoV-2 compliquée d'une surinfection à *S. aureus*, même en cas de pneumonie associée aux soins de santé d'apparition tardive.

### A fusidic acid-resistant (PVL+) clone is associated with the increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Caledonia.

Bourles A, Tristan A, Vandenesch F, Bes M, Laurent F, Ranc AG, Kainiu M, Gourinat AC, Biron A, Cazarola C, Goarant C, Colot J.

J Glob Antimicrob Resist. 2022 Sep;30:363-369. PMID: 35835352.

Depuis 2014, la résistance à la méticilline de *Staphylococcus aureus* augmente rapidement en Nouvelle-Calédonie et est associée à des répercussions cliniques potentiellement graves. Dans la présente étude, nous avons étudié l'épidémiologie du *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) en Nouvelle-Calédonie et l'émergence possible d'une souche clonale particulière. Une vue d'ensemble de la distribution du SARM en Nouvelle-Calédonie en 2019 est présentée. Nous avons collecté et analysé 171 isolats cliniques de SARM provenant de laboratoires médicaux de Nouvelle-Calédonie au cours des mois d'août et septembre 2019. Parmi cette collection, **49 isolats représentatifs ont été analysés par le CNR** à l'aide de la puce à ADN StaphyType et par WGS, permettant la caractérisation

généétique des isolats. Parmi les 1144 *S. aureus* isolés sur l'année 2019, 442 isolats (39%) étaient résistants à la méticilline, et 62% de ces isolats étaient résistants à l'acide fusidique (AF). Au cours de la période d'inclusion, le taux de résistance à l'AF était similaire (60 %). La caractérisation génétique a montré que le CC6 était le complexe clonal prédominant (70 %) avec 26 isolats (53 %) identifiés comme CC6-MRSA-[IV+fus] (PVL+). Ces résultats démontrent une faible diversité de SARM en Nouvelle-Calédonie, avec la prédominance d'un complexe clonal qui n'avait pas été rapporté auparavant. La résistance fréquente à l'acide fusidique (AF) chez les SARM était associée à une forte prévalence du gène *fusC*, ce qui suggère qu'une mauvaise utilisation de l'AF a contribué à la sélection de ce clone. Nos résultats suggèrent de recommander l'arrêt de l'utilisation topique de l'AF afin de contrôler l'émergence de ce clone sévère de SARM et de diminuer le taux de SARM en Nouvelle-Calédonie.

### **Persistence of a multidrug-resistant worldwide-disseminated methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone harbouring the *cfr* linezolid resistance gene in a French hospital with evidence of interspecies transfer to several *Staphylococcus aureus* lineages.**

Côrtes MF, André C, Martins Simões P, Corvec S, Caillon J, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Figueiredo AMS, Dupieux C, Laurent F.

J Antimicrob Chemother. 2022 Jun 29;77(7):1838-1846. PMID: 35425984.

La résistance au linézolide est devenue une préoccupation mondiale car il s'agit de l'un des antibiotiques de dernier recours pour traiter les infections à staphylocoques et à entérocoques multirésistants. **Nous avons étudié et caractérisé au CNR** 16 isolats de *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* résistants au linézolide *cfr*-positifs issus d'infections documentées dans un hôpital universitaire français de 2015 à 2018. La sensibilité antimicrobienne des isolats a été testée par microdilution en bouillon et bandes de gradient. Les déterminants génétiques de la résistance au linézolide (y compris le gène *cfr* et les mutations de l'ARNr 23S) ont été évalués par PCR et WGS ; ce dernier a également été utilisé pour caractériser les plasmides porteurs de *cfr* chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, et pour explorer la relation clonale des isolats. Tous les isolats de staphylocoques résistants au linézolide hébergeaient le même plasmide porteur de *cfr*, partageant 99 % d'identité avec le pSA737 précédemment décrit. Les trois isolats de *S. aureus* appartenaient à des ST différents (ST8, ST72, ST2416) ; les 13 *S. epidermidis* résistants à la méticilline (MRSE) appartenaient au ST2 et portaient à la fois le *cfr* et des mutations dans les gènes codant l'ARNr 23S et les protéines ribosomiques. L'analyse phylogénétique a regroupé les isolats MRSE en deux groupes, dont l'un (n = 12 isolats) appartenait aux lignées de *S. epidermidis* multirésistantes disséminées dans le monde entier et récemment signalées. Les résultats présentés ici mettent en évidence la persistance et la propagation efficace d'un plasmide porteur de *cfr* dans un hôpital, liées à la fois à la dissémination d'un clone de *S. epidermidis* multirésistant et au transfert inter-espèces *in vivo* de *cfr* entre *S. epidermidis* et *S. aureus*. L'émergence de souches résistantes au linézolide doit être surveillée de près et les mécanismes impliqués doivent être systématiquement explorés afin de limiter la propagation de la résistance à médiation plasmidique.

### **Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* does not predict development of vancomycin resistance upon vancomycin pressure.**

Gaillard T, Dupieux-Chabert C, Butin M, Dumitrescu O, Naceur O, Bouveyron C, Martra A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Lina G, Laurent F, Rasigade JP.

J Antimicrob Chemother. 2022 Mar 31;77(4):1032-1035. PMID: 35022718

On ne sait pas si les *Staphylococcus aureus* présentant une résistance intermédiaire hétérogène à la vancomycine (hVISA) peuvent développer une résistance à la vancomycine plus rapidement que les souches de *S. aureus* sensibles à la vancomycine (VSSA). Ainsi, **nous avons comparé au CNR** la cinétique de l'augmentation de la CMI de la vancomycine pendant 15 jours d'exposition soutenue à la vancomycine *in vitro* pour des isolats cliniques hVISA (n = 12) et VSSA (n = 24), ainsi que pour les souches de référence Mu3 (hVISA) et ATCC 29213 (VSSA). Les isolats cliniques ont été classés comme hVISA à l'aide de la méthode du profil d'analyse de la population. Les CMI ont été contrôlées pendant 15 jours et le taux d'augmentation de la CMI sous exposition, pour chaque souche, a été évalué

dans un modèle de régression linéaire en fonction du temps. Tous les isolats ont acquis une résistance à la vancomycine après exposition. Les CMI de la vancomycine ont augmenté plus rapidement pour les isolats VSSA que pour les isolats hVISA ( $P < 0,01$ ). Ainsi, le phénotype hVISA ne correspond pas à un potentiel d'adaptation accru à la pression in vitro de la vancomycine. Ce travail remet également en question la pertinence de considérer le hVISA comme un phénotype distinct plutôt que comme une légère élévation de la CMI de la population et **pose la question de la détermination du phénotype hVISA en routine par le CNR.**

#### **MRSA surveillance programmes worldwide: moving towards a harmonised international approach.**

Baede VO, David MZ, Andrasevic AT, Blanc DS, Borg M, Brennan G, Catry B, Chabaud A, Empel J, Enger H, Hallin M, Ivanova M, Kronenberg A, Kuntaman K, Larsen AR, Latour K, Lindsay JA, Pichon B, Santosaningsih D, Schouls LM, Vandenesch F, Werner G, Žabicka D, Žemličková H, Seifert H, Vos MC; MRSA Surveillance Worldwide Study Group (ISAC), the ESCMID Study Group for Nosocomial Infections (ESGNI), the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS).

Int J Antimicrob Agents. 2022 Mar;59(3):106538. PMID: 35091055.

Les programmes multinationaux de surveillance des SARM dépendent des structures nationales pour la collecte des données. Cette étude avait pour but d'appréhender la diversité des programmes nationaux de surveillance des SARM et de proposer un cadre pour l'harmonisation de leur surveillance. Le groupe de travail sur le SARM de la Société internationale de chimiothérapie antimicrobienne (ISAC) a mené une enquête structurée sur les programmes de surveillance du SARM et a organisé un webinaire pour discuter des forces et des défis des programmes ainsi que des lignes directrices pour l'harmonisation. Les questionnaires remplis représentaient **24 programmes de surveillance du SARM dans 16 pays dont la France représentée par le CNR.** Plusieurs pays ont fait état d'une surveillance épidémiologique et microbiologique séparée. L'information des cliniciens et des décideurs nationaux était l'objectif le plus courant de la surveillance. La surveillance des bactériémies (BSI) était présente dans tous les programmes. D'autres infections invasives étaient souvent incluses. Trois pays ont fait état d'une surveillance active du portage de SARM. La méthodologie et les rapports sur la sensibilité aux antimicrobiens, les facteurs de virulence, le génotypage moléculaire et les métadonnées épidémiologiques varient considérablement. Les programmes actuels de surveillance du SARM reposent sur des systèmes de collecte de données hétérogènes, ce qui entrave la surveillance épidémiologique et la recherche au niveau international. Pour harmoniser la surveillance du SARM, nous suggérons d'améliorer l'intégration des données microbiologiques et épidémiologiques, de mettre en place des biobanques centrales pour la collecte d'isolats de SARM et d'inclure un échantillon représentatif de cas d'infections de la peau et des tissus mous en plus de tous les cas de bactériémies. Ces conclusions vont dans le sens de ce que le **CNR** cherche à mettre en place avec les différents réseaux et partenaires.

#### **Menstrual Toxic Shock Syndrome: A French Nationwide Multicenter Retrospective Study.**

Contou D, Colin G, Travert B, Jochmans S, Conrad M, Lascarrou JB, Painvin B, Ferré A, Schnell D, La Combe B, Coudroy R, Ehrmann S, Rambaud J, Wiedemann A, Asfar P, Kalfon P, Guérot E, Préau S, Argaud L, Daviet F, Dellamonica J, Dupont A, Fartoukh M, Kamel T, Béduneau G, Canoui-Poitaine F, Boutin E, Lina G, Mekontso Dessap A, Tristan A, de Prost N; French m-TSS Study Group.

Clin Infect Dis. 2022 Jan 29;74(2):246-253. PMID: 33906228.

On manque d'études décrivant les caractéristiques cliniques et le pronostic à court terme des patientes admises en unité de soins intensifs (USI) pour un syndrome de choc toxique menstruel (SCTM). Il s'agit d'une étude de cohorte rétrospective multicentrique de patientes avec un diagnostic clinique de m-TSS admises entre le 1er janvier 2005 et le 31 décembre 2020 dans 43 unités de soins intensifs pédiatriques ( $n = 7$ ) ou adultes ( $n = 36$ ) françaises. L'objectif de l'étude était de décrire les caractéristiques cliniques et le pronostic à court terme, ainsi que d'évaluer les critères diagnostiques des Centers for Disease and Control (CDC) de 2011, chez les patients gravement malades atteints de m-TSS. Au total, 102 patients atteints de m-TSS (âge médian, 18 ans ; intervalle interquartile, 16-24 ans) ont été admis dans l'une des unités de soins intensifs participantes. Toutes les hémocultures ( $n = 102$ ) étaient stériles.

*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline s'est développé dans 92 des 96 échantillons vaginaux. **La caractérisation de l'habillage toxinique des souches (notamment la détection du gène codant la TSST-1) a été effectué au CNR** pour 76 des 92 échantillons vaginaux positifs pour *S. aureus* (83 %), et le gène codant la TSST-1 a été isolée à partir de 66 souches (87 %). Lors de l'admission à l'USI, aucune patiente ne répondait aux critères des CDC de 2011 pour un SCTM confirmé, et seulement 53 (52 %) répondaient aux critères pour un SCTM probable. Quatre-vingt-une patientes (79 %) ont été traités par une antibiothérapie antitoxinique et 8 (8 %) ont reçu des immunoglobulines intraveineuses. Quatre-vingt-six patientes (84 %) ont eu besoin de vasopresseurs et 21 (21 %) d'une intubation trachéale. Aucune patiente n'a dû être amputée d'un membre ou n'est décédé aux soins intensifs. Dans cette grande série multicentrique de patients inclus dans des unités de soins intensifs pour un m-TSS, aucun patient n'est décédé ou n'a dû subir une amputation de membre. Les critères du CDC ne doivent pas être utilisés pour le diagnostic clinique du syndrome de stress post-traumatique à l'admission en réanimation.

## 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

Dans la mesure où il existe un continuum entre recherche clinique et fondamentale au sein de notre équipe, seules ont été exclues les publications qui relèvent de la biologie fondamentale de *S. aureus* (régulation de l'expression génique, mécanistique cellulaire ou moléculaire) ainsi que toutes les publications cliniques ou clinico-biologiques qui ne sont pas thématiques sur les staphylocoques.

### (i) Publications nationales et internationales

Article « Staphylocoques » pour la revue EMC Biologie Médicale en cours de rédaction par Kolenda C.

Coustillères F, Renault V, Corvec S, Dupieux C, Simões PM, Lartigue MF, Plouzeau-Jayle C, Tande D, Lamoureux C, Lemarié C, Chenouard R, Laurent F, Lemaignen A, Bémer P; CRIOGO (Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest) Study Team.

Clinical, Bacteriological, and Genetic Characterization of Bone and Joint Infections Involving Linezolid-Resistant *Staphylococcus epidermidis*: a Retrospective Multicenter Study in French Reference Centers. *Microbiol Spectr.* 2023 Jun 15;11(3):e0419022.

Sensitivity of the PBP2a SA Culture Colony Test on shortly incubated subcultures of methicillin-resistant staphylococci from positive blood cultures.

Munier C, Dupieux C, Kolenda C, Ranc AG, Dauwalder O, Bes M, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2023 May;106(1):11591. PMID: 36907018

Targeted proteomics links virulence factor expression with clinical severity in staphylococcal pneumonia.

Pivard M, Bastien S, Macavei I, Mouton N, Rasigade JP, Couzon F, Youenou B, Tristan A, Carrière R, Moreau K, Lemoine J, Vandenesch F.

*Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Apr 3;13:1162617. PMID: 37077532

Disinfection of incubators in neonatal intensive care units: impact of steam pulverization on bacterial colonization.

Reboux M, Chavignon M, Tristan A, Plaisant F, Laurent F, Butin M.

*Antimicrob Resist Infect Control.* 2023 Mar 16;12(1):18. PMID: 36927466.

All *Staphylococcus aureus* bacteraemia-inducing strains can cause infective endocarditis: Results of GWAS and experimental animal studies.

Bastien S, Meyers S, Salgado-Pabón W, Giulieri SG, Rasigade JP, Liesenborghs L, Kinney KJ, Couzon F, Martins-Simoes P, Moing VL, Duval X, Holmes NE, Bruun NE, Skov R, Howden BP, Fowler VG Jr, Verhamme P, Andersen PS, Bouchiat C, Moreau K, Vandenesch F.

J Infect. 2023 Feb;86(2):123-133. PMID: 36603774.

Linezolid resistance: detection of the *cfz(B)* gene in French clinical MRSA strains.

Youenou B, Martins Simoes P, Tristan A, Farfour E, Beauvue C, Kolenda C, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Dupieux C.

J Antimicrob Chemother. 2023 Feb 1;78(2):445-449. PMID: 36509546

Environmental Persistence of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in Neonatal Intensive Care Units: Role of Biofilm Formation, Desiccation, and Disinfectant Tolerance.

Chavignon M, Coignet L, Bonhomme M, Bergot M, Tristan A, Verhoeven P, Josse J, Laurent F, Butin M.

Microbiol Spectr. 2022 Dec 21;10(6):e0421522. PMID: 36409142.

Targeted Proteomics Analysis of Staphylococcal Superantigenic Toxins in Menstrual Fluid from Women with Menstrual Toxic Shock Syndrome (mTSS).

Courçon M, Badiou C, Louwagie M, Etievant S, Jaquinod M, Lina G, Brun V.

Toxins (Basel). 2022 Dec 19;14(12):886. PMID: 36548783.

Nasal microbiome disruption and recovery after mupirocin treatment in *Staphylococcus aureus* carriers and noncarriers.

Baede VO, Barray A, Tavakol M, Lina G, Vos MC, Rasigade JP.

Sci Rep. 2022 Nov 17;12(1):19738. doi: 10.1038/s41598-022-21453-4. PMID: 36396730.

Bacteriophage-based decontamination to control environmental colonization by *Staphylococcus capitis* in neonatal intensive care units: An in vitro proof-of-concept.

Chavignon M, Kolenda C, Medina M, Bonhomme M, Blazere L, Legendre T, Tristan A, Laurent F, Butin M.

Front Cell Infect Microbiol. 2022 Nov 16;12:1060825. PMID: 36467721.

Phage Therapy against *Staphylococcus aureus*: Selection and Optimization of Production Protocols of Novel Broad-Spectrum Silviavirus Phages.

Kolenda C, Medina M, Bonhomme M, Laumay F, Roussel-Gaillard T, Martins-Simoes P, Tristan A, Pirot F, Ferry T, Laurent F, PHAGEinLYON Study Group.

Pharmaceutics. 2022 Sep 6;14(9):1885. PMID: 36145633.

SARS-CoV-2 with Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* healthcare-associated pneumonia in the Indian Ocean.

Allou N, Allyn J, Traversier N, Baron M, Blondé R, Dupieux C, Coolen-Allou N, Jabot J, Miltgen G.

Heliyon. 2022 Sep;8(9):e10422. PMID: 3609194.

A fusidic acid-resistant (PVL+) clone is associated with the increase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Caledonia.

Bourles A, Tristan A, Vandenesch F, Bes M, Laurent F, Ranc AG, Kainiu M, Gourinat AC, Biron A, Cazarola C, Goarant C, Colot J.

J Glob Antimicrob Resist. 2022 Sep;30:363-369. PMID: 35835352.

Activity of Exebacase (CF-301) against Biofilms Formed by *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Prosthetic Joint Infections.

Souche A, Kolenda C, Teoli J, Schuch R, Ferry T, Laurent F, Josse J.  
Antimicrob Agents Chemother. 2022 Aug 16;66(8):e0058822. PMID: 35861539.

Persistence of a multidrug-resistant worldwide-disseminated methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone harbouring the *cf* linezolid resistance gene in a French hospital with evidence of interspecies transfer to several *Staphylococcus aureus* lineages.

Côrtes MF, André C, Martins Simões P, Corvec S, Caillon J, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Figueiredo AMS, Dupieux C, Laurent F.  
J Antimicrob Chemother. 2022 Jun 29;77(7):1838-1846. PMID: 35425984.

Expected phenotypes and expert rules are important complements to antimicrobial susceptibility testing.

Gatermann S, Das S, Dubreuil L, Giske CG, Kahlmeter G, Lina G, Lindemann C, MacGowan A, Meletiadis J, Rossolini GM, Turnidge J, Cantón R.  
Clin Microbiol Infect. 2022 Jun;28(6):764-767. PMID: 35306191.

Linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* isolate.

Ibrahim R, Waked R, Choucair J, Aubry A, Laurent F, Simoes PM, Dupieux-Chabert C, Haddad E.  
Infect Dis Now. 2022 May;52(3):176-177. PMID: 34757234.

Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* does not predict development of vancomycin resistance upon vancomycin pressure.

Gaillard T, Dupieux-Chabert C, Butin M, Dumitrescu O, Naceur O, Bouveyron C, Martra A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Lina G, Laurent F, Rasigade JP.  
J Antimicrob Chemother. 2022 Mar 31;77(4):1032-1035. PMID: 35022718

MRSA surveillance programmes worldwide: moving towards a harmonised international approach.

Baede VO, David MZ, Andrasevic AT, Blanc DS, Borg M, Brennan G, Catry B, Chabaud A, Empel J, Enger H, Hallin M, Ivanova M, Kronenberg A, Kuntaman K, Larsen AR, Latour K, Lindsay JA, Pichon B, Santosaningsih D, Schouls LM, Vandenesch F, Werner G, Žabicka D, Žemličková H, Seifert H, Vos MC; MRSA Surveillance Worldwide Study Group (ISAC), the ESCMID Study Group for Nosocomial Infections (ESGNI), the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS).  
Int J Antimicrob Agents. 2022 Mar;59(3):106538. PMID: 35091055.

Evaluation of CHROMagar™ LIN-R for the Screening of Linezolid Resistant *Staphylococci* from Positive Blood Cultures and Nasal Swab Screening Samples.

Girlich D, Mihaila L, Cattoir V, Laurent F, Begasse C, David F, Metro CA, Dortet L.  
Antibiotics (Basel). 2022 Feb 25;11(3):313. PMID: 35326776.

Sub-Inhibitory Concentrations of Oxacillin, but Not Clindamycin, Linezolid, or Tigecycline, Decrease Staphylococcal Phenol-Soluble Modulin Expression in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Hodille E, Beraud L, Périan S, Berti V, Bes M, Tristan A, Blond E, Lina G, Dumitrescu O.  
Microbiol Spectr. 2022 Feb 23;10(1):e0080821. PMID: 35044221.

Bacteriophages Combined With Subtherapeutic Doses of Flucloxacillin Act Synergistically Against *Staphylococcus aureus* Experimental Infective Endocarditis.

Save J, Que YA, Entenza JM, Kolenda C, Laurent F, Resch G.  
J Am Heart Assoc. 2022 Feb;11(3):e023080. PMID: 35043655.

Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics.

Larsen J, Raisen CL, Ba X, Sadgrove NJ, Padilla-González GF, Simmonds MSJ, Loncaric I, Kerschner H, Apfalter P, Hartl R, Deplano A, Vandendriessche S, Černá Bolfíková B, Hulva P, Arendrup MC, Hare RK, Barnadas C, Stegger M, Sieber RN, Skov RL, Petersen A, Angen Ø, Rasmussen SL, Espinosa-Gongora C, Aarestrup FM, Lindholm LJ, Nykäsenoja SM, Laurent F, Becker K, Walther B, Kehrenberg C, Cuny C, Layer F, Werner G, Witte W, Stamm I, Moroni P, Jørgensen HJ, de Lencastre H, Cercenado E, García-Garrote F, Börjesson S, Hæggman S, Perreten V, Teale CJ, Waller AS, Pichon B, Curran MD, Ellington MJ, Welch JJ, Peacock SJ, Seilly DJ, Morgan FJE, Parkhill J, Hadjirin NF, Lindsay JA, Holden MTG, Edwards GF, Foster G, Paterson GK, Didelot X, Holmes MA, Harrison EM, Larsen AR.  
Nature. 2022 Feb;602(7895):135-141. PMID: 34987223.

Menstrual Toxic Shock Syndrome: A French Nationwide Multicenter Retrospective Study.

Contou D, Colin G, Travert B, Jochmans S, Conrad M, Lascarrou JB, Painvin B, Ferré A, Schnell D, La Combe B, Coudroy R, Ehrmann S, Rambaud J, Wiedemann A, Asfar P, Kalfon P, Guérot E, Préau S, Argaud L, Daviet F, Dellamonica J, Dupont A, Fartoukh M, Kamel T, Béduneau G, Canouï-Poitrine F, Boutin E, Lina G, Mekontso Dessap A, Tristan A, de Prost N; French m-TSS Study Group.  
Clin Infect Dis. 2022 Jan 29;74(2):246-253. PMID: 33906228.

Evaluation of the MRSA/SA ELITe MGB Assay for the Detection of *Staphylococcus aureus* in Bone and Joint Infections.

Labetoulle R, Rigail J, Lleres-Vadeboin M, Grattard F, Pozzetto B, Cazorla C, Botelho-Nevers E, Boyer B, Dupieux-Chabert C, Laurent F, Verhoeven PO, Carricajo A.  
J Clin Microbiol. 2022 Jan 19;60(1):e0083521. PMID: 34788112.

(ii) Communications nationales (CA : communication affichée – CO : communication orale)

Evolutionary and Functional Analysis of Fibronectin Binding-like proteins and related adhesion and internalization among the Staphylococci (CA)

Crepin D, Bonhomme M, Sinel C, Bergot M, Faure A, Dyon-Tafari V, Maali Y, Diot A, Laurent F, Josse J  
Congrès Microbes 2022 (SFM), Montpellier, Oct 2022

Caractérisation des persisters intracellulaires de *Staphylococcus aureus* : Ressuscitation, Localisation et *Small Colony Variants*. (CO)

Marro FC, Brocard J, Laurent F, Blocker AJ, Josse J  
Congrès Microbes 2022 (SFM), Montpellier, Oct 2022

Evaluation de la galerie VITEK2 P668 pour la CMI daptomycine des staphylocoques (CA)

Dupieux C, Kolenda C, Beghidja J, Jeanne E, Vuillot C, Youenou B, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F.  
Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Déc 2022.

Dépistage de la résistance au linézolide : évaluation d'un milieu chromogène sélectif. (CA)

Dupieux C, Kolenda C, Martins-Simoes P, Jeanne E, Vuillot C, Ranc AG, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F.  
Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Déc 2022.

(iii) Communications internationales (CA : communication affichée – CO : communication orale)

First report of the *cfb* oxazolidinone resistance gene in two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates (CO)  
Youenou B, Martins-Simoes P, Tristan A, Kolenda C, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Dupieux-Chabert C.  
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal, Avr 2022.

Emerging methicillin-resistance undetected by reference methods due to a loss of function of the GdpP protein in growth deficient staphylococci strains lacking *mec* gene (CA)

Durand G, Dupieux-Chabert C, Fruiquière B, Fulchiron C, Munoz L, Rivat S, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A, Martins-Simoes P.  
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal, Avr 2022.

Validation of an optimized whole genome sequencing workflow for the detection of virulence factors and resistance to methicillin of *Staphylococcus aureus* strains in a national reference laboratory (CO)

Kolenda C, Martins-Simoes P, Dupieux-Chabert C, Ranc AG, Youenou B, Beraud L, Ginevra C, Jeanne E, Laurent F, Vandenesch F, Tristan A.  
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal, Avr 2022.

Directed in vitro evolution of anti-*Staphylococcus aureus* therapeutic phages: host range expansion against multi-drug resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates (CO)

Kolenda C, Medina M, Bonhomme M, Rousseau C, Laumay F, Legendre T, Blazere L, Helluin E, Briot T, Leboucher G, Pirot F, Ferry T, Laurent F.  
European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal, Avr 2022.

Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus* growth rates monitoring via automated microscopy and fluorescence dilution under antibiotics challenges: highlighting drug tolerant persisters (CA)

Marro FC, Brocard J, Laurent F, Josse J, Blocker AJ

Gordon research conference "New antibacterial discovery and Development", Lucca (Barga), Italy, juin 2022

(iv) Conférences sur invitations

Laurent F. « Phagothérapie : passé, présent et futur »

Université Ouverte, Université Claude Bernard Lyon (Conférence grand public), France, Lyon, mars 2022

Vandenesch E. « *Staphylococcus aureus* and the skin: toxins involvement in primary skin infections ».

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Lisbonne, Portugal, Avr 2022

Tristan A. « Infections cutanéomuqueuses bactériennes à staphylocoques : du prélèvement à l'interprétation ? ». Congrès BIOMEDJ, France, Issy-les-Moulineaux, mai 2022

Vandenesch E. « CA-MRSA why such a failure in Europe? ». Congrès SF2H. France, Lyon, juin 2022

Laurent F. « Activité de la délafloxacine sur les staphylocoques en France ». Journées Nationales d'Infectiologie (JNI) 2022, France, Bordeaux, juin 2022

Laurent F. « PHAGEinLYON: Phage therapy program in Lyon ». Symposium PhageSwiss « Phage Therapy: a Reality at the Bedside », Suisse, Lausanne, sep 2022

Lina G., Stefanie Schmid-Schlager. «Safe menstrual products and facts about TSS». Outlook 2022 by Edana international, Malta, oct 2022

Kolenda C. « Compréhension des phénomènes évolutifs phages/bactéries et phagothérapie 2.0. ». Congrès Microbes 2022 (SFM), France, Montpellier, Oct 2022

Laurent F. « PHAGEinLYON / PHAG-ONE: Optimization of pharmaceutical production of anti-*S. aureus* therapeutic phages using in silico and experimental approaches. ». Phages.fr Workshop, France, Paris, Oct 2022

Tristan A. « Les toxines bactériennes à impact cutané. Exemple de *Staphylococcus aureus* ». Congrès ANEMCOLI, France, Lille, Nov 2022

Laurent F. « Nouveaux outils diagnostiques ». Congrès annuel de la Société Française de Chirurgie orthopédique et Traumatologique (SOFCOT), France, Paris, 10 nov 2022

Vandenesch E. « CA-MRSA: "Pourquoi cela n'a pas marché ?" ». Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). France, Paris, Déc 2022

Laurent F. « Phage training et phagothérapie : Comment faire et pourquoi faire ? ». Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). France, Paris, Déc 2022

En 2022, Anne Tristan a été invitée à présenter à différentes occasions les résultats de l'expertise du CNR dans le cadre des bactériémies à *S. haemolyticus* dans les services de réanimations néonatales en France (paragraphe 4. Alertes)

## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, 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.

Le CNR va collaborer avec l'ANSES de Ploufragan, le CHU de Rennes et le CH de Saint Briec sur l'étude des *S. aureus* appartenant au complexe clonal CC398 (Cf Paragraphe 8. Programme d'activité pour les années suivantes)

Le CNR a fourni une souche de référence au Laboratoire National de Référence Staphylocoques à coagulase positive, y compris *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques en 2023.

## 8. Programme d'activité pour les années suivantes

---

### 8.1 Activités d'expertise

#### 8.1.1 Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Le CNR a développé au fil des ans une relation de confiance et d'échange avec un nombre important de correspondants (plus de 450 par exemple en 2022). Il s'agit pour la majorité de laboratoires de microbiologie et de cliniciens des CHU et des CHR mais aussi de laboratoires privés qui desservent des établissements de soins ou des patients directement. La rétro-information systématique auprès des demandeurs par le biais de courriers personnalisés, les contacts téléphoniques directs auprès des biologistes et des cliniciens dans les situations d'urgence et/ou inhabituelles ont certainement contribué à entretenir une relation de confiance entre les partenaires. Au cours des prochaines années, nous souhaitons fidéliser ces partenaires et renforcer ces collaborations en améliorant la rapidité, la sécurité et la traçabilité des avis rendus grâce à la transmission électronique sécurisée des comptes rendus.

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

##### Séquençage NGS

En 2019, le CNR a réalisé, à visée de recherche, les premiers séquençages de souches de staphylocoques avec la technologie Oxford Nanopore. Tout d'abord, ces séquençages ont été réalisés avec un séquenceur Minlon impliquant le « basecalling » et le démultiplexage déportés sur des serveurs de calcul de la plateforme commune des HCL. En 2021, l'arrivée d'un séquenceur Gridlon dédié à l'activité de la plateforme NGS-IAI/GenEPII (GHN), a permis la réalisation de ces 2 étapes localement et en temps réel (pendant le déroulement du run de séquençage). Le séquençage avec la technologie Nanopore présente un avantage majeur par rapport à la technologie Illumina déjà utilisée en routine au CNR qui est l'obtention de « long reads ». Ceci facilite l'étape de traitement bio-informatique d'assemblage (meilleure reconstruction du chromosome et plasmides bactériens) et est donc utilisé ponctuellement en complément du séquençage « short reads » Illumina pour aboutir à la fermeture de génomes ou de plasmides dans différentes indications (description de mécanismes de résistance sur des éléments génétiques mobiles, analyses phylogénétiques). Cependant, le taux d'erreurs de séquençage de cette technologie et l'absence d'automatisation possible pour des runs multiplexant un nombre important d'échantillons, limitent son utilisation en routine au CNR.

Deux voies d'évolution des technologies de séquençages susceptibles d'améliorer les performances de ces technologies de séquençage sont annoncées par ces deux fabricants Oxford Nanopore et Illumina et seront donc testées en 2022-2023 par le CNR pour faire évoluer si nécessaire leurs positionnements dans l'utilisation en routine du séquençage. Tout d'abord, une nouvelle génération de cellules de séquençage incluant une amélioration des pores en cours de développement par Oxford Nanopore permettrait de réduire le taux d'erreur de séquençage et obtenir une précision comparable à celle de la technologie Illumina. En parallèle, les évolutions techniques d'Illumina vers la production de long reads (technologie Infinity) sera également étudiée par le CNR. Cette nouvelle technologie est annoncée comme étant compatible avec le parc de séquenceurs déjà existants et permettrait de détecter des régions de grandes insertions et/ou délétions d'insertion et d'obtenir des génomes quasi-fermés avec une nette amélioration des problèmes d'assemblage dus aux régions répétées.

## Développement de pipeline : Migration des analyses bio-informatiques depuis la suite BioNumerics® vers le cluster de calcul de la plateforme GenEPII

La société BioMérieux commercialisant la suite d'outils bio-informatiques BioNumerics® a annoncé l'arrêt de son développement et support en décembre 2024. En parallèle, la mise en place d'un cluster d'outils de calcul développés et entretenus au sein de la plateforme de séquençage NGS-IAI/GenEPII commun pour toutes les applications du séquençage en microbiologie, avec des adaptations spécifiques à chaque pipeline pour chaque analyse, va nécessiter une adaptation des procédures utilisées au CNR.

Cette nouvelle organisation permettra la réalisation des analyses bio-informatiques dans un délai de temps plus court, avec une architecture simplifiée entre les serveurs de démultiplexage, de calcul et de stockage des analyses (architecture actuellement mixte entre les serveurs HCL et gérés par BioNumerics®).

La migration sera aussi l'occasion d'ajouter de nouvelles analyses/pipelines sur les serveurs de calcul, actuellement déployés uniquement en local au CNR : le pipeline de détection de mutations ponctuelles dans l'unité 23S de l'ARNr associées à la résistance au linézolide et le pipeline d'analyse de liens de clonalité.

## Construction de base de données de virulence spécifiques des différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative

La place du séquençage NGS a évolué depuis une analyse ponctuelle vers une utilisation en routine pour la majorité des souches de staphylocoques reçues au CNR (toutes les souches reçues pour caractérisation de la virulence ; séquençage ciblé des souches reçues pour expertise de la résistance aux antibiotiques).

Cette évolution a concerné le séquençage des souches de *S. aureus* dont les outils de typage sont déjà répandus, mais aussi de différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative pour lesquelles il sera important, dans le cadre du mandat 2023-2027, de renforcer les collections de génomes permettant des analyses phylogénétiques plus précises, et de développer des bases de données spécifiques notamment pour le typage de facteurs de virulence.

## Développement des techniques de phagogramme pour la détermination de la sensibilité des souches de staphylocoques aux bactériophages

Le CNR est un des partenaires du projet ANR PHAG-ONE obtenu en 2020 dans le cadre de l'AAP Antibiorésistance visant à développer une production hospitalière au sein des HCL de bactériophages et leur utilisation clinique. Un des enjeux de l'essor de la phagothérapie est le développement de techniques de phagogramme permettant de tester l'activité des bactériophages sur les souches bactériennes avant leur administration. En effet, si les techniques d'antibiogrammes permettant de tester l'activité des antibiotiques sont très répandues dans les laboratoires de biologie médicale avec des protocoles semi-automatisés, les techniques de phagogramme nécessitent une expertise spécialisée. Les protocoles de phagogramme reposent actuellement sur une association de techniques en milieu solide (technique EOP) et en milieu liquide (Technique LAS) mais nécessitent la validation d'une méthode de référence selon les normes EUCAST/CLSI.

Dans le cadre d'un partenariat avec la société BioMérieux, le CNR va participer en 2023 à la validation d'une telle méthode de référence pour la détermination de la sensibilité aux phages anti-*Staphylococcus* en fournissant des souches de référence et une sélection de souches cliniques représentatives de la diversité des infections à staphylocoques. Les enjeux de ce projet sont la standardisation des protocoles (milieu, inoculum, conditions d'incubations, etc...) et la proposition de modalités d'interprétation en lien avec l'EUCAST (définition de seuils permettant de différencier les souches sensibles et résistantes aux phages par analogie avec les « breakpoints » de CMI pour les antibiotiques).

### 8.1.3 Le mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections

Les modes de constitution et de stockage de la collection sont décrits dans le paragraphe 3.1.2. (Gestion des Collections). Ces processus ont été adaptés à la démarche d'accréditation de la norme ISO 15 189 avec notamment la traçabilité complète de l'ensemble des températures de stockage avec mise en place d'enregistreurs de température et d'alarmes en cas de panne. La traçabilité des souches de collection a été réorganisée dans le cadre du déploiement du logiciel BioNumerics®.

Les conditions de mise à disposition des souches représentatives des grands clones de SARM/SASM, des souches porteuses de certains facteurs de virulence ou associées à des formes cliniques particulières d'infections staphylococques ou présentant des mécanismes de résistance d'intérêt restent identiques et donc 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.

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

Le CNR des Staphylocoques continuera, comme au cours des mandatures précédentes, à assurer une veille technologique et une démarche d'évaluation des outils/kits d'identification des staphylocoques, de diagnostic des infections staphylococques ou de mesure de la sensibilité aux antibiotiques en cours de développement, en amont de leur commercialisation ou dès leur mise à disposition sur le marché français, et ce, en total indépendance vis à vis des fabricants et fournisseurs. Cette démarche vise à pouvoir :

(i) disposer rapidement des outils innovants et utiles pour l'étude des staphylocoques / des infections staphylococques au sein du CNR,

(ii) informer les utilisateurs potentiels des performances de ces nouveaux tests.

Le CNR poursuivra, comme au cours des mandatures précédentes en adéquation avec les missions des CNR confiées par SpF, l'évaluation des nouvelles techniques et des nouveaux kits mis sur le marché.

Il est ainsi d'ores et déjà envisagé d'évaluer les performances et l'intérêt de divers réactifs, automates et antibiotiques.

**Évaluation de nouveaux antibiotiques.** Comme récemment avec la ceftaroline (AstraZeneca) ou le ceftobiprole (Basilea), le CNR mettra en place les techniques assurant la mesure de la sensibilité des souches de *S. aureus* et *S. non-aureus* vis-à-vis de toutes les nouvelles molécules qui obtiendront une autorisation d'accès compassionnel (anciennement ATU) ou une AMM en France. En utilisant sa vaste collection de souches cliniques de staphylocoques, le CNR sera en mesure de réaliser l'évaluation de l'activité des nouveaux antibiotiques afin de pouvoir donner aux tutelles et à la communauté médicale une photographie des niveaux de sensibilité à ces nouvelles molécules et de guider leur positionnement dans l'arsenal thérapeutique en France. Il développera aussi les outils permettant de façon prospective de suivre l'évolution de la résistance à ces molécules dans le cadre d'études au fil de l'eau ou d'études ponctuelles à un niveau national voire européen. De même, il s'engage à assurer un suivi de l'émergence éventuelle de souches résistantes et une étude des mécanismes moléculaires impliqués dans ces résistances.

Ainsi, en 2023, le CNR va évaluer l'activité de la délafloxacinine *in vitro* dans le contexte des infections ostéo-articulaires (IOA). La délafloxacinine est une nouvelle fluoroquinolone, récemment mise sur le marché, qui présente une activité élargie sur les souches de staphylocoques résistantes aux autres fluoroquinolones comme la lévofloxacinine.

Or, les fluoroquinolones sont un des antibiotiques clés dans le traitement des IOA à staphylocoques et à l'heure actuelle, de nombreuses souches de staphylocoques responsables d'IOA (notamment les staphylocoques non-*aureus*) sont résistantes à la lévofloxacine, ce qui empêche son utilisation. Pour cela, le CNR, en lien avec le Centre de Référence des IOA complexes (CRIOAc) de l'Hôpital de la Croix-Rousse, se propose d'évaluer l'activité de la délafloxacine en déterminant les CMI de cette molécule sur 300 souches de staphylocoques responsables d'IOA (150 *S. aureus* et 150 staphylocoques non-*aureus*) dont 1/3 de souches sensibles et 2/3 de souches résistantes à la lévofloxacine et en les comparant aux CMI des fluoroquinolones déjà disponibles (ofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine). Des analyses par NGS seront réalisées afin de comprendre les bases moléculaires de la résistance à la délafloxacine et pourquoi certaines souches résistantes à la lévofloxacine sont sensibles à la délafloxacine et d'autres résistantes. Cette molécule étant présentée comme ayant une forte diffusion tissulaire et cellulaire, des travaux complémentaires seront menés en collaboration avec l'équipe de recherche du CIRI afin i) d'évaluer l'activité intracellulaire de la délafloxacine versus la lévofloxacine dans un modèle d'ostéoblastes avec des souches de *S. aureus* sensibles et résistantes à la lévofloxacine, et ii) d'évaluer la capacité de la délafloxacine versus la lévofloxacine à prévenir la formation de biofilms et à éradiquer des staphylocoques à l'intérieur du biofilm en utilisant des souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* sensibles et résistantes à la lévofloxacine.

De même, de nouvelles molécules appartenant à la famille des oxazolidinones sont en cours de développement. Dès que certaines seront en voie de commercialisation, le CNR a pour projet de tester leur activité sur sa collection de souches résistantes au linézolide. En effet, nous disposons d'une large collection de souches de staphylocoques de différentes espèces et avec divers mécanismes et différents niveaux de résistance et il serait donc intéressant d'évaluer l'activité de nouvelles oxazolidinones sur des souches déjà résistantes au linézolide.

### 8.1.5 Les projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

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

Nous souhaitons continuer à accueillir comme nous l'avons fait très régulièrement toute personne souhaitant acquérir les technologies disponibles ou développées au CNR qu'il s'agisse de collègues français ou étrangers.

- En 2023, nous accueillerons pour un mois une doctorante algérienne qui effectue une thèse portant sur la caractérisation de la résistance des souches de staphylocoques isolées de l'Homme et d'animaux domestiques. Cette thèse comporte deux volets : (i) Un volet clinique humaine, où l'on travaille sur une collection de SARM et de SCNRM isolés d'infections diverses. Le but de l'étude est de surveiller la résistance des SARM ainsi que de déterminer leur évolution épidémiologique, notamment le clone ST80 dont la prédominance recule. (ii) un volet animal : étude de portage à la recherche de souches de staphylocoques à coagulase positive et de SCNRM auprès d'animaux domestiques : cheval, chien et chat.

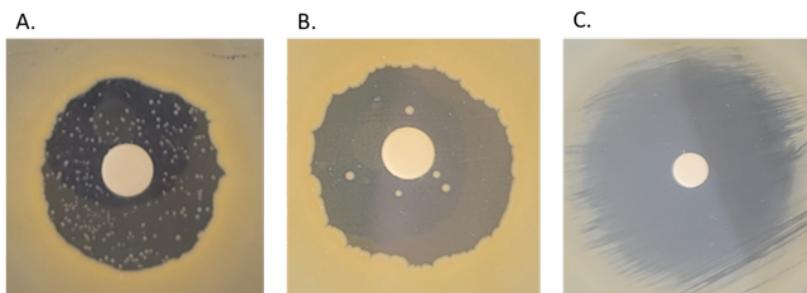
### 8.1.6 Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.

#### Détection de bactéries persistantes dans le cadre d'infections récidivantes

Dans certains cas de récurrence d'infection, les souches bactériennes peuvent présenter des phénotypes de sensibilité aux antibiotiques n'expliquant pas l'échec du traitement. Ces récurrences peuvent alors être liées à la présence de bactéries persistantes ou tolérantes au sein de la population bactérienne infectieuse. Ces bactéries persistantes

ont la capacité de survivre à un traitement antibiotique sans être pour autant résistantes mais par une diminution drastique de leur métabolisme et de leur croissance (dormance transitoire). Généralement, cette propriété de persistance ne concerne pas la totalité de la population bactérienne responsable de l'infection mais une sous population de proportion largement minoritaire. En raison du risque d'échecs thérapeutiques liés à la colonisation de patients par des populations bactériennes hébergeant des persisters, le CNR projette la mise en place de la détection de ces bactéries chez des patients en récurrence d'infection (Ex : endocardite infectieuse, infection ostéo-articulaire). Cette détection sera réalisée en deux temps :

(i) Criblage rapide de la présence de bactéries persistantes / tolérantes par méthode de « Tolerance Disk Test » (TDtest)<sup>15</sup>. Cette méthode permet la visualisation des bactéries persistantes et tolérantes dans la zone d'inhibition générée par l'action de l'antibiotique en 48h à 72h. Des expérimentations préliminaires réalisées au CNR ont montré des résultats prometteurs et ont permis une première mise en évidence de bactéries persistantes / tolérantes dans le cadre d'une rechute d'endocardite infectieuse (Figure 42). Cependant, cette première étape ne permet pas de distinguer la présence de bactéries persistantes de celle de bactéries tolérantes.

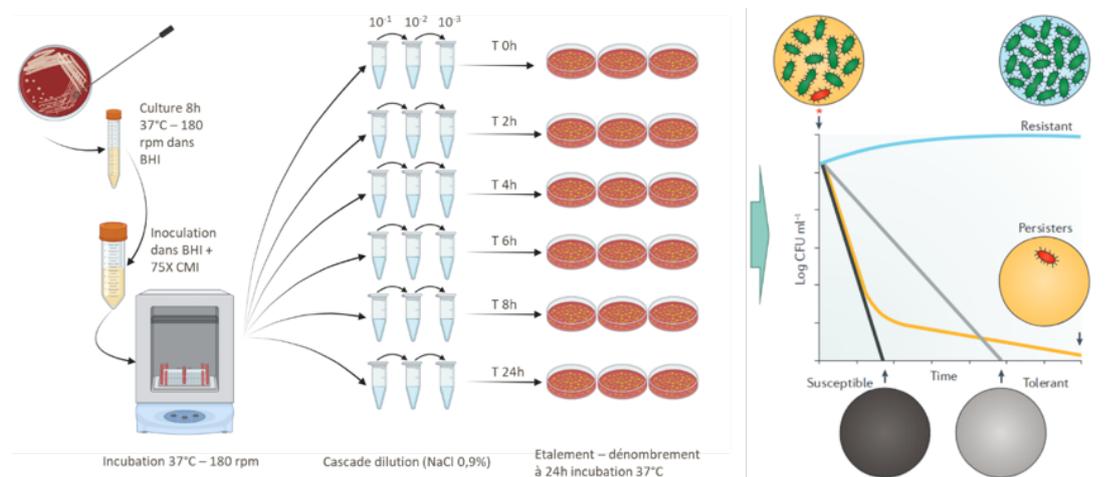


**Figure 42-** Résultats préliminaires de criblage de bactéries persistantes / tolérantes par technique du TDtest.

Les colonies ont été obtenus en 48h à la suite de la levée de l'inhibition de croissance (antibiotique : céfazoline) et l'ajout de glucose. A. forte concentration de bactéries persistantes / tolérantes. B. Faible concentration de bactéries persistantes / tolérantes. C. Absence de sous population persistante / tolérante.

(ii) Différenciation du caractère persistant / tolérant des souches identifiées en TDtest

Dans un deuxième temps, afin de déterminer si les souches présentent un caractère persistant ou tolérant, des cinétiques de survie seront réalisées par dénombrement des UFC en cultures liquides supplémentées par 50 à 100 fois les CMI d'antibiotiques à tester. L'allure de la courbe de survie obtenue permettra de déterminer la nature persistante ou tolérante de la souche étudiée (Figure 43)

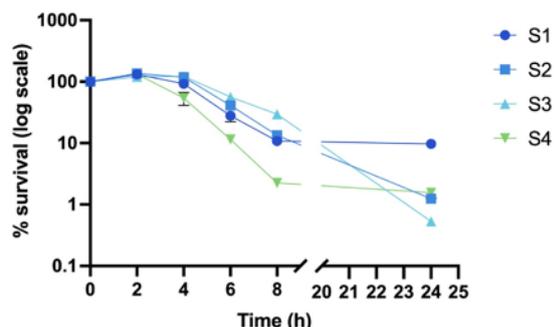


**Figure 43-** Protocole de réalisation de cinétiques de survie et interprétation des résultats (adapté de Fisher et al.<sup>16</sup>).

<sup>15</sup> Gefen O et al. TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. Sci Rep. 2017 Feb 1;7:41284.

<sup>16</sup> Fisher RA et al. Persistent bacterial infections and persister cells. Nat Rev Microbiol. 2017 Aug;15(8):453-464.

Des expérimentations préliminaires ont été réalisées au CNR et ont permis de mettre en évidence des populations persistantes et tolérantes au sein des 4 souches étudiées (Figure 44).



**Figure 44-** Courbes de survie obtenues sur cinétique de 24H en présence d'une CMI x75 de céfazoline.

Les souches S1 et S4 présentent une allure évoquant la présence de persisters. Les souches S2 et S3 ont une allure de bactéries tolérantes.

Au cours de la prochaine année, les expérimentations et mises au point seront poursuivies afin d'évaluer la faisabilité et l'intérêt de la mise en place de la détection de persisters dans le cadre des activités de routine du CNR.

### Choc toxique staphylococcique : rôle neutralisant des anticorps ?

80 à 90% des femmes en période de menstruations ont des anticorps anti TSST-1<sup>17</sup>. Cependant il est admis que les femmes développant un choc toxique menstruel n'ont pas d'anticorps protecteurs contre cette toxine<sup>18</sup>. Ceci s'explique par le fait que les anticorps antitoxines semblent être la principale protection contre les infections à toxines superantigéniques<sup>19</sup>. L'absence de séroconversion après un choc est d'ailleurs considérée comme un risque individuel de récurrence<sup>20</sup>. De plus, la séropositivité ne semble pas suffisante puisqu'il faut que les anticorps soient neutralisants pour être efficaces<sup>21</sup>.

Le but de ce projet est donc d'explorer la capacité neutralisante des anticorps anti TSST-1 et de regarder l'impact sur la survenue du choc toxique menstruel. L'objectif à long terme serait le développement d'un test présupposant la susceptibilité individuelle au choc toxique menstruel. L'avidité des anticorps sera étudiée par technique ELISA sur des sérums de patientes ayant développé ou non un choc toxique staphylococcique menstruel.

### Protéomique ciblée à haut débit : étude des associations clinico-biologiques

Le transfert au CNR des méthodes développées dans le cadre du RHU IDBIORIV a déjà permis d'identifier des associations pertinentes entre sévérité et protéome. Ainsi la PVL apparaît comme déterminant la sévérité des pneumonies communautaires à *S. aureus* de manière dose-dépendante. Les souches de bactériémies ont un protéome très largement différent de celui des souches de pneumonies et les souches de dermohypodermites expriment de façon significativement importante la protéine HlgA qui est un immunomodulateur. Au cours de l'année 2023 et tout au long du mandat du CNR, nous aurons l'objectif d'investiguer la présence de nouvelles associations entre l'expression des facteurs de virulence et les formes cliniques d'infections à *S. aureus*. Nous souhaitons caractériser en particulier (i) le protéome des souches de portage versus celui des souches d'infections cutanées, (ii)

<sup>17</sup> Parsonnet J et al. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *J Clin Microbiol.* Sept 2005;43(9):4628-34.

<sup>18</sup> Parsonnet J et al. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)-producing strains of *Staphylococcus aureus* and antibody to TSST-1 among healthy Japanese women. *J Clin Microbiol.* août 2008;46(8):2731-8.

<sup>19</sup> Spaulding AR et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev.* juill 2013;26(3):422-47.

<sup>20</sup> Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire. Disponible sur : [http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2018/2/2018\\_2\\_1.html](http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2018/2/2018_2_1.html)

<sup>21</sup> Kansal R et al. Structural and functional properties of antibodies to the superantigen TSST-1 and their relationship to menstrual toxic shock syndrome. *J Clin Immunol.* mai 2007;27(3):327-38.

le protéome des souches d'infections ostéo-articulaires aiguës versus chroniques afin de déterminer s'il existe une modification de l'expression associée à la chronicité, (iii) le protéome des souches de pneumonies nosocomiales versus celui des souches de pneumonies communautaires et de bactériémies, et inclure par ailleurs plus de souches d'infections cutanées nécrosantes afin de confirmer l'observation initiale d'une hyperproduction d'HlgA. Ces travaux devraient permettre d'identifier les profils pathogéniques potentiels de chacune des souches de *S. aureus* reçues au CNR et de contribuer à orienter la prise en charge des patients pour lesquels l'avis du CNR est demandé. Ainsi, par exemple, nous pourrions proposer une attitude de décolonisation nasale « agressive » chez les sujets porteurs de souches qui présentent un profil pathogénique de pneumonie nécrosante (hyperproduction de PVL) ou de dermohypodermite (hyperproduction d'HlgA), sans présager d'autres associations pertinentes que nous pourrions découvrir dans les mois et années à venir.

### Projet ANR NeoSCap

Le projet ANR NeoSCap porté par Marine BUTIN est original par son approche translationnelle puisqu'il s'efforce de répondre à la fois à des questions scientifiques (physiopathologique, génomique) et cliniques (pratiques de décontamination, devenir du patient) portant sur le clone NRCS-A, appartenant à l'espèce *Staphylococcus capitis* qui a été décrit par le CNR comme un clone multirésistant endémique à l'échelle mondiale et impliqué dans les infections néonatales tardives (INT, survenant après 3 jours de vie). Le projet vise à évaluer dans sa globalité la problématique de la diffusion mondiale et de l'impact chez les grands prématurés du clone multi-résistant NRCS-A et constitue donc un enjeu de santé publique à l'échelle nationale mais aussi internationale. Les déterminants génétiques de l'affinité particulière de NRCS-A pour les services de réanimation néonatale et les prématurés seront explorés par une approche originale de transcriptomique, testée dans les conditions réelles environnementales de réanimation néonatale. Le rôle des gènes mis en évidence sera ensuite confirmé par invalidation dirigée par la technique CRISPR-cas9 puis le phénotype des souches délétées sera comparé à celui des souches sauvages.

Par ailleurs, sur la base de données scientifiques suggérant que le réservoir des souches NRCS-A pourrait être le tube digestif, les mécanismes permettant la colonisation, la translocation puis l'INT seront explorés. Pour cela, une approche originale combinera des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Ces modèles prendront en compte les facteurs possiblement impliqués dans la colonisation et la translocation que sont l'immaturation du tube digestif du nouveau-né, la composition du microbiote digestif, la possible inflammation locale, l'effet d'une exposition à la vancomycine, l'influence de l'imprégnation par hormones stéroïdes chez les nouveau-nés.



De plus, le projet NeoSCap s'intéressera à l'éradication du clone NRCS-A des services de réanimation

néonatale, question qui constitue un problème clinique majeur. Les différentes étapes de la diffusion et de la persistance de NRCS-A dans l'environnement seront explorées (biofilm, résistance aux antiseptiques) afin d'identifier des pistes et stratégies pour les prévenir. Différentes méthodes (notamment basées sur les combinaisons d'antiseptiques et la désinfection par la vapeur) seront testées sur des incubateurs en fonctionnement. Nos résultats pourraient modifier directement les pratiques en réanimation néonatale, en proposant de nouveaux protocoles ou approches de désinfection. Plusieurs articles en lien avec ce travail ont été publiés en 2022 (Cf paragraphe 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR)<sup>22, 23, 24</sup>.

Enfin, les facteurs de risque et le pronostic des enfants colonisés par *S. capitis* seront étudiés. La collaboration avec l'équipe d'Epipage 2 et l'accès à la base de données de cette cohorte prospective seront une opportunité pour répondre à ces questions cliniques.

## Projet ANR PHAG-ONE

Dans le cadre d'une collaboration scientifique avec la société Pherecydes (FUI PHOSA 2015-2018), le CNR des Staphylocoques a participé à la sélection et la validation de bactériophages anti-*Staphylococcus aureus*. Avec l'accord de l'ANSM, ces phages ont été utilisés chez plus d'une trentaine de patients le cadre de traitements compassionnels qui ont permis des améliorations cliniques significatives.

Sous l'égide de l'IAI, du CIRI et du CNR des Staphylocoques, le projet ANR PHAG-ONE sélectionné dans le cadre du PPR Antibiorésistance, fédère des expertises microbiologiques, technologiques, pharmacologiques, pharmaceutiques et cliniques d'équipes académiques expérimentées dans le domaine des phages ou de la production de médicaments pour créer la première plateforme française permettant d'isoler, caractériser, produire et fournir des phages thérapeutiques à coût maîtrisé utilisable chez l'homme et disponibles pour l'ensemble de la communauté médicale française. *S. aureus* et *S. epidermidis* font partie des trois espèces modèle ciblées avec *E. coli*.

Ce projet, débuté en septembre 2021, est développé autour de neuf axes :

- 1. Constitution d'une collection de bactériophages lytiques afin :** (i) de couvrir >90% des souches cliniques des espèces cibles, (ii) d'investiguer *in vitro* et/ou *in vivo* les phénomènes de coévolution phage/bactérie et de développer *in vitro* des protocoles d'évolution dirigée des phages afin de comprendre les mécanismes génétiques associés à l'émergence de la résistance bactérienne aux phages et à l'élargissement des spectres des phages.
- 2. Optimisation et validation de protocoles de production des phages incluant la sélection de souches** (i) exemptes de prophages/facteurs majeurs de virulence, (ii) modifiées génétiquement (CRISPR-Cas9) pour bloquer leurs productions.
- 3. Validation et mise en œuvre de processus de purification des phages et de contrôles qualité** *via* la plateforme de production pharmaceutique FRIPHARM-HCL
- 4. Modélisation PK/PD des phages à partir de données *in vitro* et *in vivo* afin :** (i) de comprendre la dynamique et les interactions phage/bactérie sur bactéries planctoniques et sessiles, (ii) d'optimiser les protocoles expérimentaux et cliniques.
- 5. Développement de modèles cunicoles d'infections à *S. aureus* incluant** (i) modèle « Tissu-Cage » : études *ex*

<sup>22</sup> Chavignon M et al. Bacteriophage-based decontamination to control environmental colonization by *Staphylococcus capitis* in neonatal intensive care units: An *in vitro* proof-of-concept. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Nov 16;12:1060825.

<sup>23</sup> Chavignon M et al. Environmental Persistence of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in Neonatal Intensive Care Units: Role of Biofilm Formation, Desiccation, and Disinfectant Tolerance. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6):e0421522.

<sup>24</sup> Reboux M et al. Disinfection of incubators in neonatal intensive care units: impact of steam pulverization on bacterial colonization. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2023 Mar 16;12(1):18.

*vivo/in vivo* de PK/PD et d'efficacité, (ii) modèle d'infections osseuses sur matériel : étude d'efficacité.

**6. Développement d'un référentiel de réalisation des préparations magistrales extemporanées de phages incluant l'évaluation :** (i) des process, de la traçabilité, (ii) de la stabilité des préparations de phages, (iii) des interactions/inactivations phages-matériel médical utilisé en clinique.

**7. Mise en place et suivi de cohortes de cas compassionnels** pour (i) disposer de données de pharmacovigilance, (ii) définir les indications et les paramètres pour les essais cliniques.

**8. Développement d'outils innovants d'imagerie des phages pour** (i) mesurer le titre phagique (ii) disposer d'un phagogramme standardisé, automatisé et rapide.

**9. Analyse socio-anthropologique de l'émergence d'une innovation biomédicale académique** (aspects socio-culturels, économiques, juridiques, réglementaires et politiques).

### **8.1.7 La possibilité de montée en charge de ses capacités pour répondre à une situation sanitaire exceptionnelle et les modalités effectives de mise en œuvre (réorganisation, transfert de ressources, mobilisation de partenaires...).**

Si le CNR des Staphylocoques devait faire face à une situation sanitaire exceptionnelle impliquant un afflux important de prélèvements et/ou de souches bactériennes nécessitant des ressources humaines et analytiques importantes, il bénéficie d'un environnement permettant une ré-allocation rapide de moyens techniques et humains au travers :

- des personnels des autres CNR (Légionelles, Entérovirus, Virus respiratoires) mais aussi au sein de l'Institut des Agents infectieux, des personnels des plateaux de cultures conventionnelles (52 ETP) et de biologie moléculaire (20 ETP) et du secrétariat (12 ETP) qui, bien que ne travaillant pas directement au CNR, partagent les mêmes outils informatiques d'enregistrement et de saisie des résultats, les mêmes locaux et les mêmes outils techniques (automates d'identification, d'antibiogramme, d'extraction d'ADN, d'amplification, etc.). Cette proximité et ce partage des outils doivent permettre de faire face dans l'urgence et si nécessaire dans le temps, à toute situation sanitaire même exceptionnelle.
- de la plateforme GenEPII de séquençage (l'analyse des génomes étant devenu pour le CNR des Staphylocoques une des technologies de routine) qui bénéficie d'un nombre d'automates d'extraction, de répartition, et de séquenceurs et a été dimensionnée, dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV2, pour faire justement face à une augmentation très importante de demandes d'analyses de génomique.

Il est à noter que cette mutualisation des personnels et des outils a été une des forces des HCL pour faire face à la pandémie de SARS-CoV2 pour le dépistage et le diagnostic du COVID mais aussi dans la gestion du CNR des virus respiratoires qui a été très fortement sollicité. Cette pandémie a aussi permis de démontrer la capacité de réorganisation rapide des CNR abrités à l'IAI y compris au niveau des locaux puisque le CNR des Staphylocoques a réalisé un déménagement et une relocalisation de l'ensemble de son activité en moins de 24 heures en avril 2020 (tout en maintenant ses accréditations) afin de libérer en urgence un espace de près de 200 m<sup>2</sup> au sein de l'IAI pour accueillir la première plateforme régionale MGI de dépistage du SARS-CoV2 qui a pu être mis en service à son arrivée en moins de 2 jours. Le CNR des Staphylocoques a pu retrouver ses locaux en juillet 2020, une fois que des locaux pérennes ont pu être aménagés pour la plateforme de dépistage MGI.

## 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 dans le cadre du DPC**, d'**interventions lors de congrès régionaux, nationaux ou internationaux**. Le CNR souhaite renouveler sa politique d'organisation d'un congrès en lien avec le GT Staphylocoques de la Société Française de Microbiologie dont l'objectif est de favoriser et catalyser les échanges entre les équipes françaises travaillant dans le champ de connaissance des Staphylocoques, en s'efforçant d'inclure dans les thèmes débattus l'ensemble du champ thématique du cahier des charges du CNR défini par SpF (<https://www.sfm-microbiologie.org/evenement/staphosium-2023/>).

Plusieurs membres du CNR des Staphylocoques se sont mobilisés sous l'égide de la SFM pour répondre à l'appel d'offre de l'agence de DPC portant sur les actions de formation « Pour la gestion de l'antibiorésistance » auprès des biologistes médicaux. Ces formations ont pour objectif (i) d'offrir aux biologistes médicaux un socle de connaissances actualisé dans le champ de la résistance et de la maîtrise de la dissémination des maladies infectieuses, un temps d'échange avec leurs confrères microbiologistes hospitaliers, des outils pour mettre en place, suivre, approfondir et pérenniser leur rôle et leur action dans le domaine de la prévention et du contrôle des infections mais aussi dans le bon usage des antibiotiques en soutien à la maîtrise de l'antibiorésistance, (ii) faire prendre conscience aux biologistes de l'importance de cette prévention des infections, de l'antibiorésistance et du rôle qu'ils peuvent/doivent jouer dans ce domaine aussi bien auprès de leurs interlocuteurs médicaux et paramédicaux qu'auprès des structures de soins dans lesquels ils interviennent ou de leur patientèle. Il nous a semblé important de participer en tant que CNR des Staphylocoques et membre associé du CNR des Résistance car les objectifs de ces formations mises en place dans le cadre de la Stratégie Nationale 2022-2025 de Prévention des Infections et de l'Antibiorésistance et mise en place par le ministère des Solidarités et de la Santé étaient en lien avec les missions confiées par SpF aux CNR.

Enfin, le CNR en tant que membre fondateur de l'European Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections de l'ESCMID (ESGS) et dont l'un de ses membres (Frédéric LAURENT) assure la présidence pour les 3 années à venir souhaite étendre sa politique de formation à l'échelle européenne en organisant à Lyon en 2023 et 2024 deux workshops consacrés aux infections à staphylocoques non-*aureus* (2023) et à la phagothérapie (2024) ainsi que la Summer School ESCMID en 2024 ou 2025.

### 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

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la rétro-information des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque-là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations aux prescripteurs des analyses afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées dans les situations de cas groupés. L'amélioration portera sur le mode de transmission de ces résultats et conseils qui fera appel à un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de

Télémédecine développé par la Direction des Systèmes d'Information pour la Direction Générale des HCL. Ce système permet un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un serveur sécurisé « HYBRID » qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des résultats. Ce serveur de résultats spécifique est disponible pour tous les établissements extérieurs. L'accès au serveur de résultats HYBRID peut être demandé auprès du service clientèle joignable par mail à l'adresse suivante : [relationclient.lbmms@chu-lyon.fr](mailto:relationclient.lbmms@chu-lyon.fr). Ce serveur ne se substituera pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au site internet du CNR qui permet la diffusion aux professionnels des modalités de fonctionnement du CNR, des diverses recommandations concernant le staphylocoque et les infections staphylococciques, des bilans d'activités et publications du CNR, des enquêtes et études cliniques conduites par le CNR ainsi que les informations sur les formations et congrès. Ce site est par ailleurs amené à évoluer au cours de la mandature afin de devenir plus interactif avec notamment une rubrique FAQ afin de répondre aux interrogations les plus fréquentes. Enfin, il pourrait être intéressant de développer une partie du site en commun avec nos collègues européens et donc de disposer d'une version anglaise de ce site. Un nouveau site internet devrait donc voir le jour au cours du prochain mandat.

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

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 national 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. Ainsi, le CNR a su apporter son expertise dans le cadre de la saisine sur les cas groupés d'infections et de colonisation à *S. haemolyticus* dans les services de réanimation néonatale en France.

Les membres du CNR engagés dans le développement de la phagothérapie ont initié des échanges avec l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pour apporter leur expertise :

- dans les discussions au sein de l'EUCAST sur les techniques spécifiques utilisables et/ou à privilégier pour assurer l'évaluation de l'activité des phages (phagogramme) mais aussi des lysines de phages (mesure de CMI) qui bénéficient déjà de critères CLSI pour *S. aureus* (les critères pour les autres staphylocoques étant en cours de validation)
- dans la définition des critères de sensibilité et de résistance aux phages qui, pour l'instant dans la littérature, manque d'homogénéité et de critères objectifs.

### **8.2.4 Le cas échéant, les contributions dans le cadre spécifique des activités portant sur des agents de la menace.**

Concernant les agents de la menace, le CNR apportera son expertise dans le domaine des toxines staphylococciques et plus spécifiquement de l'entérotoxine B (SEB) de *S. aureus* (inscrite dans la liste des agents) aux instances de santé publique, de défense et de sécurité nationale. Le CNR, qui dispose d'un stock résiduel d'entérotoxine B à but de recherche (dans le respect des règles de détention fixées par la loi), s'engage à fournir cette toxine aux laboratoires mandatés par ses instances et selon les règles et conditions régies par la loi, à des fins de calibration et contrôle des techniques de détection ou quantification. Par ailleurs, le CNR sera à même de fournir des souches productrices de SEB si une collection nationale de souches des agents de la menace pour les besoins de la biodéfense venait à être constituée.

## 8.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

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

Il a été décidé de façon consensuelle et unanime que l'ensemble des activités portant sur le Staphylocoque serait du ressort du CNR des Staphylocoques et que toute demande d'analyse, d'expertise, d'avis adressée au CNR « Résistance aux antibiotiques » concernant les staphylocoques serait redirigée vers le CNR des Staphylocoques qui assurera la mise en œuvre des démarches et des analyses requises en fonction de la nature de la demande. Afin de faciliter la lisibilité de ce fonctionnement et l'accès facile et rapide des demandeurs à l'expertise du CNR des Staphylocoques sur la résistance, le CNR « Résistance aux antibiotiques » fera figurer sur son site web, au côté des coordonnées des partenaires du CNR « Résistance aux antibiotiques », les coordonnées du CNR des Staphylocoques ainsi qu'un lien vers son site internet.

L'activité en relation avec les réseaux évoquée ci-après sera également partagée avec le CNR des Staphylocoques qui est associé à la démarche. Les CNR « Résistance aux antibiotiques » et le CNR des Staphylocoques font régulièrement appel à des laboratoires hospitaliers pour la collecte de souches résistantes, dans le cadre d'études multicentriques ponctuelles (e.g., GERPA 2022, EARS 2011, PRIMO 2020 et 2022). Cette collaboration s'établit sur la base d'un partenariat dans lequel les CNR apportent leur expertise pour l'analyse de phénomènes épidémiques en lien avec la résistance aux antibiotiques. Les laboratoires participants sont tenus informés des résultats des enquêtes et associés aux publications. Les données concernant leurs établissements respectifs sont communiquées à titre de rétro-information. Lors de la mandature précédente, nous avons discuté la formalisation de ces enquêtes en réseaux pour la collecte de données et de souches bactériennes représentatives de l'activité de ville, du secteur médico-social et de l'hôpital. Dans ce projet, s'il est retenu, il a été décidé avec l'aval de SpF :

- d'une part de s'associer à l'enquête nationale de prévalence des infections nationales qui est réalisées tous les 5 ans pour, au-delà des données qualitatives et cliniques de collecter outre les souches de BHRé et l'ensemble des souches de staphylocoques (SASM et SARM, soit environ 600 à 700 souches pour l'ensemble du territoire) impliquée dans des infections nosocomiales afin de pouvoir disposer d'une photographie des clones circulants en France,
- et d'autre part de s'insérer dans la logique des réseaux issus des deux missions nationales de surveillance de la résistance SPARES et PRIMO pour un suivi de la situation hospitalière, en ville et en établissements médico-sociaux.

Cette stratégie permet de s'intégrer dans la logique mise en place par SpF, améliore la cohérence des données et évite les redondances. Le contexte du recueil est différent pour la mission SPARES et PRIMO puisqu'il s'inscrit dans une logique institutionnelle pour les établissements hospitaliers impliqués dans SPARES et le volontariat pour la mission PRIMO. Aussi, le travail avec les missions PRIMO et SPARES reposera sur des logiques différentes ; à savoir une collecte institutionnelle à large échelle pour le secteur hospitalier, et une politique de sélection et incitatrice (démarchage téléphonique, label et financement) pour identifier au sein de PRIMO, un pool de laboratoires privés représentatifs dédiés à la surveillance en ville et dans les EMS. Plus de détails sont rapportés dans le paragraphe 8.3.2. La représentativité des données de ville et en EMS sera reliée aux densités de population régionales et l'effort de collecte au volume d'activité des laboratoires privés.

Le CNR s'engage à assurer une rétro-information globale et individualisée auprès des partenaires du réseau au travers de rapports écrits, de visioconférences et du partage des données. Ainsi, deux webinars ont été animés par les membres du CNR des résistances aux antibiotiques sur les carbapénémases et la résistance aux C3G chez les Entérobactéries dans le contexte du réseau « ville et secteur médico-social » ce qui apparaît comme un format intéressant permettant une interaction directe avec les collègues microbiologistes et cliniciens du secteur privé.

Les discussions ont été entamées en janvier 2022 avec le réseau PRIMO pour apporter l'expertise du CNR dans l'analyse des données déjà disponibles et pour co-construire une étude incluant le recueil prospectif de souches afin de disposer là encore d'une photographie en 2023 du niveau de résistances au sein de souches de *S. aureus* de ville mais aussi au sein des institutions de séniors dans lesquelles il est probable que les SARM aient une prévalence plus élevée. L'objectif est de réaliser un suivi annuel des évolutions des profils de résistance des *S. aureus* communautaires avec un recueil et une analyse des clones circulants tous les deux ans afin d'assurer un suivi épidémiologique. Une communication sous forme de webinars en live et enregistrés (un pour l'épidémiologie de ville, le second pour l'épidémiologie en institutions de séniors) sera mise en place.

Cette politique de communication et de formation sera poursuivie ainsi qu'une association des participants aux actions de valorisation. Sur la base du volontariat, les personnels médicaux et techniques des laboratoires partenaires pourront être formés par les CNR aux méthodes utilisées pour la caractérisation des mécanismes de résistance émergents ainsi qu'aux techniques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Des souches de référence leurs seront fournies afin d'aider à la mise en place de la démarche qualité en lien avec la réalisation des antibiogrammes et leur interprétation. Les techniques de diagnostic développées par les CNR pourront ainsi être transférées et évaluées par les laboratoires partenaires qui le souhaitent dans les conditions habituelles de fonctionnement d'un laboratoire de biologie médicale, afin de mieux cerner les applications et les limites de ces techniques en routine et de mesurer l'intérêt de leur utilisation locale. Par ailleurs, nous discutons avec SpF pour les laboratoires participants, notamment du secteur privé, d'un label faisant état de leur engagement dans des actions de santé publique. Les marges de progression les plus importantes en termes d'utilisation des antibiotiques sont en ville et en EMS. La diffusion de la résistance dans ces secteurs représente le risque le plus important en termes d'épidémiologie à cause de son caractère difficilement contrôlable. La surveillance de ces secteurs est donc stratégique bien que sous-représentée et uniquement basée sur le volontariat.

### 8.3.2 Les modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux

La surveillance de la résistance aux anti-infectieux sera réalisée dans un premier temps *via* les souches qui sont adressées de façon volontaire au CNR par nos correspondants. Il s'agit donc d'une surveillance passive mais pertinente car les profils atypiques ou inhabituels font l'objet d'une attention particulière à la fois des systèmes experts utilisés dans les laboratoires avec des messages d'alerte générés par ces systèmes sur la base du profil complet de résistance et incitant à un envoi au CNR, mais aussi des biologistes qui assurent une lecture attentive et interprétative des antibiogrammes. Les souches avec des profils atypiques ou inhabituels sont adressées pour expertise par les biologistes hospitaliers et privés compte tenu de notre labellisation par SpF en tant que CNR. Devant toute évolution épidémique ou endémique de certains profils ou mécanismes de résistance, le CNR prendra contact avec ses correspondants de SpF afin de les informer, de décrire les premières données disponibles et de mettre en place les mesures requises en fonction du contexte.

En dehors de cette surveillance passive, le CNR souhaite se doter comme évoqué ci-dessus d'un réseau de type « sentinelle » constitué en collaboration avec le CNR des résistances, qui permettra une étude dynamique des phénotypes de résistance aux antibiotiques au sein de structures représentatives au niveau français.

Dans le contexte décrit ci-dessus, un premier point de collaboration avec les réseaux SPARES et PRIMO sera de mettre en place un partage des données. Cela permettra un interfaçage de la surveillance des données de résistance issues des missions, avec la surveillance des bactéries résistantes réalisées par le CNR. La surveillance réalisée par les missions PRIMO et SPARES repose sur des indicateurs univariés (ex. taux de SARM, taux de résistance d'une espèce donnée à un antibiotique). Nous pourrions contribuer à une analyse multivariée des phénotypes de résistance pour identifier les phénotypes importants émergents et revenir vers les laboratoires

détenteurs des souches afin de réaliser une exploration génomique des isolats correspondants pour l'alerte (séquençage à haut débit pour analyse de la phylogénie et des gènes de résistance).

Un deuxième point concerne le recueil de souches pour la surveillance. La surveillance doit répondre à des événements rares. Leur importance relative est différente en secteur hospitalier, en EMS et en ville. De plus, la logique de recueil des souches mis en place est différente selon les CNR associés. Aussi, nous proposons des organisations distinctes pour ces missions de surveillance comme indiqué ci-dessous.

Pour le CNR des Staphylocoques :

- Stratégie de recueil des SARM : 1 isolat par épisode en secteur hospitalier, en ville et EMS.
- Participation à l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales

Dans le cadre de son activité de surveillance épidémiologique, le CNR s'engage à déterminer la sensibilité des *S. aureus* aux molécules antibiotiques dites « de dernier recours » (ex : linézolide, tédizolide, daptomycine, tigécycline, dalbavancine) afin de pouvoir identifier les alternatives thérapeutiques les plus efficaces pour le traitement des infections à *S. aureus* en rapport avec l'épidémiologie française. Un rendu systématique des CMI sera effectué en 72H maximum après réception de la souche pour ces molécules de dernier recours dont la détermination de sensibilité n'est pas possible pour tous les laboratoires. Une veille sanitaire régulière des nouveaux antibiotiques permettra si besoin d'adapter rapidement les plaques de détermination des CMI pour les molécules les plus pertinentes pour le traitement des infections à *S. aureus* (ex : eravacycline, omadacycline, délafloxacine).

Lors de la prochaine enquête de prévalence (1 jour/an), le CNR se propose, en accord avec SpF, de récupérer toutes les souches de *S. aureus* d'infections soit environ 600 souches (associées aux données de l'enquête) permettant d'avoir une photographie instantanée sur l'épidémiologie des *S. aureus* (SASM & SARM) en France.

Par ailleurs, comme décrit dans ce document, le CNR a établi une collaboration étroite avec l'ANSES Lyon qui pilote le réseau RESAPATH de surveillance des pathogènes isolés chez l'animal (animaux de rente et animaux de compagnie). Pour ce qui concerne les staphylocoques, le CNR assure une caractérisation moléculaire des souches recueillies par le RESAPATH et reçues par l'ANSES pour les souches présentant des profils particuliers ou dans le cadre de protocoles conduits par le RESAPATH. Cette collaboration permet au CNR de suivre l'épidémiologie des résistances des staphylocoques chez l'animal et de pouvoir les analyser au regard de l'épidémiologie humaine. Cette interface avec l'animal est intéressante et pourra permettre d'anticiper toute évolution spécifique chez l'animal et tout transfert de ces mécanismes ou souches en santé humaine.

Enfin, le CNR a entrepris de réaliser une large étude nationale de prévalence de la résistance au linézolide en recourant à des laboratoires volontaires via un appel à participation par les réseaux Azay, ColBVH et GMC. Cette étude est réalisée à l'initiative du CNR et en collaboration avec le laboratoire Entérocoques du CNR Résistances aux antibiotiques. Elle a pour but de réaliser une enquête nationale rétrospective de prévalence des souches de staphylocoques et d'entérocoques résistantes au linézolide sur les 5 dernières années (recueil de données sur le pourcentage de souches détectées résistantes au linézolide dans un réseau de laboratoires hospitaliers maillant le territoire national), puis d'organiser un recueil exhaustif des souches résistantes sur une période de quelques mois afin de caractériser les souches résistantes au linézolide, et de déterminer les mécanismes de résistance au linézolide qui circulent en France (voire d'identifier de nouveaux mécanismes) et les clones auxquelles appartiennent les souches résistantes par NGS. Dans un deuxième temps, en collaboration avec l'équipe de recherche, est prévue une analyse des capacités et fréquences de transfert entre SCN et *S. aureus* des mécanismes de résistance plasmidiques (par des techniques de filter-mating) en utilisant : i) des souches représentatives des clones de SCN porteurs de mécanismes transférables de résistance (*cfr*, *optrA*, *poxTA*) obtenues au cours de l'étude nationale, et ii) les clones de SARM/SASM les plus prévalents en Europe. Le coût biologique de la résistance sera aussi déterminé *in vitro* par comparaison des cinétiques de croissance des couples de souches avant/après acquisition des mécanismes transférables de

résistance, en absence et en présence d'antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices. Enfin, la stabilité de ces mêmes mécanismes après transfert chez les bactéries receveuses sera déterminée en présence et en absence de pression de sélection antibiotique. Les données obtenues permettront de disposer d'une cartographie globale (épidémiologique, phénotypique et génétique) de la résistance aux oxazolidinones chez les staphylocoques et entérocoques en France et d'anticiper le niveau de risque de dissémination des mécanismes transférables en fonction des souches réservoirs. Le but de ce projet est de mieux appréhender l'épidémiologie des bactéries concernées et d'adapter les mesures de contrôle de la dissémination des souches résistantes au linézolide ainsi que la prise en charge des patients infectés/colonisés. En effet, selon l'épidémiologie des mécanismes de résistance et leur caractère épidémiogène, nous pourrions être amenés à conseiller un typage systématique des mécanismes de résistance impliqués et une prise en charge différentielle des patients selon qu'ils portent une souche résistante au linézolide via un mécanisme chromosomique ou un mécanisme plasmidique.

### **8.3.3 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 paragraphes 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 SpF comme cela a été le cas lors des différentes épidémies présentées dans le présent dossier (Cf paragraphe 4. Alertes). 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, CLIN).

En outre, l'ensemble des souches d'origine humaine, animale ou environnementale adressées au CNR continueront de bénéficier d'une analyse par NGS et notre objectif est l'intégration de ces résultats et des métadonnées associées dans une base de données relationnelles gérée par le logiciel BioNumerics® (cf. chapitre 6. Description de l'infrastructure informatique). Le point fort de BioNumerics® réside dans sa capacité à combiner des informations de sources génomiques et phénotypiques diverses dans une base de données globale permettant des analyses croisées. Cet outil permettra de mettre en place des indicateurs et des outils de surveillance et d'alerte automatisés. Ces derniers devraient faciliter la détection de phénomènes inhabituels et permettre d'identifier l'émergence de nouveaux clones et/ou l'émergence de formes cliniques rares.

### **8.3.4 La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux**

Au niveau européen, le CNR continuera à faire appel au réseau des laboratoires de référence des staphylocoques (SRL) constitué dans le cadre de EARSS-Staph lorsque des phénomènes épidémiques ou endémiques sont identifiés en France afin de déterminer si une extension au-delà de nos frontières existe ou à l'inverse s'ils correspondent à l'introduction et la dissémination de souches venant d'autres pays.

Le CNR a porté au niveau européen un projet fédérateur portant sur les infections des prothèses articulaires à *S. aureus* (IPASA) représentant un problème majeur de santé publique car (i) leur incidence continue d'augmenter en Europe, (ii) elles sont une cause importante de morbidité (40%) et de mortalité (5%), (iii) elles induisent des surcoûts significatifs pour le système de santé. Les IPASA sont des infections difficiles à traiter et induisent des formes chroniques/récurrentes (>20% des cas) en raison (i) des facteurs de virulence spécifiques des *S. aureus*, (ii) de la résistance génotypique aux antimicrobiens, (iii) de l'échappement phénotypique *in vivo* aux antimicrobiens et à la

réponse immunitaire en raison des caractéristiques largement inconnues des *S. aureus*, notamment l'invasion variable et les divers trafics/devenirs intracellulaires à l'origine de la persistance des bactéries dans les cellules osseuses, et la capacité de former du biofilm sur les matériaux prothétiques. Il est donc urgent (i) de mieux identifier les principaux facteurs de la physiopathologie des IPASA, (ii) de mieux prédire le devenir des IPASA, (iii) de définir des traitements optimaux/alternatifs pour ces infections.

En effet, la réponse médicale aux agents pathogènes est souvent inadaptée par méconnaissance des déterminants génétiques de la virulence, de la résistance aux antimicrobiens et de leurs impacts sur l'évolution clinique. Historiquement, les approches systémiques visant à comprendre ces déterminants ont été limitées à l'évaluation des phénotypes de panels de mutants créés expérimentalement. Au-delà du séquençage du génome entier (qui permet désormais de capturer à grande échelle la diversité génétique des isolats cliniques) et des caractéristiques phénotypiques classiques (profils biochimiques /enzymatiques, croissance in vitro, activité des antibiotiques, etc.), la question est de savoir s'il est possible de proposer une analyse plus complète et plus intégrative des SAPJI afin de fournir une carte phénogénomique des isolats de *S. aureus*

Ainsi, le **projet MUSKETEERS**, porté par le CNR des Staphylocoques, propose sous l'égide et avec l'aide financière de l'ESCMID en s'appuyant i) sur un consortium de 10 laboratoires européens répartis dans 8 pays européens, et ii) sur le réseau des membres de 4 ESCMID study Groups (i.e., ESGS, ESGIAI, ESGB, ESGNTA) d'appliquer les analyses GWAS bactériennes et l'intelligence artificielle qui ont été déployés avec succès pour identifier les supports génétiques de la virulence et de la résistance aux antibiotiques des bactéries planctoniques chez *S. aureus*, de manière large et d'étendre leur champ d'utilisation (i) au mode de vie intracellulaire et au mode de vie du biofilm des isolats cliniques, (ii) à l'expression clinique et à l'outcome clinique des infections. En outre, le projet prévoit d'introduire une analyse computationnelle plus large tenant compte (i) des corrélations et interdépendances complexes des phénotypes, obscurcissant la causalité, (ii) de la présence d'un déséquilibre de liaison à l'échelle du génome conduisant à une ambiguïté sur la variante causale, nécessitant une modélisation précise des impacts fonctionnels des mutations, du fait que la plupart des phénotypes bactériens sont des traits complexes, ne s'expliquant pas par des caractéristiques monogénétiques, mais plutôt par des interactions fonctionnelles de groupes de protéines plus importants. Cette approche pourrait permettre (i) de révéler rapidement des gènes impliqués et « marqueurs prédictifs » de l'évolution cliniques (ii) de définir/identifier les voies critiques impliquées dans la virulence et l'échec du traitement dans les IPA.

Les techniques de mutant/silencing CRISPR seront ensuite appliquées pour valider nos résultats et identifier définitivement les facteurs de virulence cliniquement pertinents, illustrant la façon dont la phénogénomique peut permettre d'identifier des facteurs de virulence d'un pathogène majeur.

Le financement obtenu en fin 2022 sera utilisé pour financer la gestion et la validation des données cliniques (ESGIAI), pour mettre en place et gérer une collection européenne centralisée d'isolats cliniques d'IPASA (n=200-250) pendant 18 mois (CNR des Staphylocoques), pour effectuer une caractérisation phénotypique et génotypique extensive et à haut débit de tous les isolats (CNR des staphylocoques, ESGB) et pour étudier l'activité des phages et pour explorer l'intérêt des phages en tant qu'adjuvant ou thérapie alternative (ESGNTA incluant le CNR des staphylocoques)

L'objectif principal de ce projet utilisant une approche intégrative et innovante est (i) d'identifier des groupes spécifiques d'isolats, chacun avec des traits de virulence différents et associés à un résultat clinique différent, (ii) d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou des approches thérapeutiques innovantes, (iii) de prévoir (et donc d'essayer d'inverser/de changer) les trajectoires cliniques des patients.

## 8.3.5 Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance

### 8.3.5.1 Santé humaine

#### Mayotte

A la demande de nos collègues cliniciens et microbiologistes de Mayotte, le CNR va participer à une étude prospective sur 100 patients venus au CHM pour incision et mise à plat d'un abcès des tissus mous (essentiellement cutanés) avec la caractérisation des clones de *S. aureus* diffusant à Mayotte tant sur le plan de la virulence que de la résistance.

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

Poursuite du projet décrit au paragraphe 3.5.1 : au cours du prochain mandat, le CNR poursuit son expertise avec l'analyse de nouvelles souches reçues début 2023 afin de finaliser la phylogénie du ST6.

#### Staphylocoques et services de néonatalogie

Plusieurs services de réanimations néonatales en France sont actuellement confrontés à des cas groupés d'infections ou colonisations à *Staphylococcus haemolyticus*. La mission SPIADI de surveillance des bactériémies sur cathéters centraux retrouve d'ailleurs une augmentation entre 2020 et 2021 de la part des bactériémies à *S. haemolyticus* en secteur de néonatalogie (27,7% versus 18,4%).

Le CNR des Staphylocoques a également observé une augmentation globale du nombre de souches de *S. haemolyticus* transmises depuis 2019. Une analyse sur génome complet NGS incluant le typage MLST des souches et une analyse SNPs a permis d'identifier différents *Sequence Type* (ST) (notamment ST29 et ST25) et au sein de ces ST endémiques en France, d'identifier des clusters géographiques et/ou au sein de certains services présentant des spécificités/traits génétiques.

Compte tenu des évolutions récentes de l'épidémiologie des bactériémies au sein des services de réanimation néonatale et des bouffées épidémiques observées aussi bien liée à *S. aureus* qu'aux staphylocoques non-*aureus*, il apparaît important pour le CNR de suivre les infections nosocomiales à *S. haemolyticus* mais aussi à *S. aureus* et à *S. capitis* en néonatalogie car ces agents pathogènes s'adaptent aux environnements et aux antibiothérapies utilisés (par exemple, les données génétiques ont montré une augmentation de la CMI à la vancomycine et l'apparition d'un plasmide de résistance à l'acide fusidique en Nouvelle-Zélande chez le clone *S. capitis* NRCS-A lié à une forte consommation de cet antibiotique en topique cutané). L'analyse du CNR sur cette épidémie est présentée au paragraphe 4. Alertes.

Le CNR prévoit donc en lien avec SpF :

- dans un premier temps, la poursuite du suivi épidémiologique et la communication autour des résultats obtenus et à venir. Un article est en cours de rédaction sur cette thématique.
- dans un deuxième temps, un projet européen a été proposé par le Pr Marine Butin, Dr Sara Romano et Dr Anne Tristan intitulé « EuroNeoLOS : European Neonatal Late Onset Sepsis afin de confronter notre expérience avec celle de nos collègues européens.

#### PHRC DALICATH (Randomized open-label controlled trial evaluating a single-dose intravenous Dalbavancin versus standard antibiotic therapy during catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*)

Les infections sanguines liées aux cathéters sont les infections sanguines nosocomiales les plus courantes, avec une incidence de 8,5 à 19,8 infections pour 1 000 jours-cathéters. *S. aureus* est impliqué dans environ 20 % des

ICSR et est associé à une morbidité importante, à une mortalité (9,3 %), à un séjour hospitalier prolongé (+ 9 jours) et aux coûts des soins de santé (35 000 € à 65 000 € par cas). Les ICSR à *S. aureus* surviennent principalement chez les patients fragiles ayant un port de cathéter pour la chimiothérapie ou la nutrition parentérale.

Selon les directives internationales, la prise en charge des ICSR dues à *S. aureus* comprend le retrait et le remplacement du cathéter infecté et une antibiothérapie intraveineuse (IV) de 14 jours. Par conséquent, la prise en charge des ICSR dues à *S. aureus* nécessite l'insertion d'un nouveau cathéter intraveineux. Ce nouveau cathéter peut à son tour entraîner de nouvelles complications septiques et limiter l'autonomie des patients. Le non-respect de ces recommandations entraîne une surmortalité et des coûts... À la suite des résultats positifs de l'essai SABATO en 2021 visant à déterminer si le passage précoce à une antibiothérapie orale est sûr et efficace chez les patients atteints de BSA sans complication, le passage à l'antibiothérapie orale lors d'une bactériémie staphylococcique deviendra probablement la norme de soins. Il est donc justifié d'autoriser le passage à la voie orale dans le bras de contrôle. La pratique habituelle dans certains centres est déjà de passer aux antibiotiques par voie orale, après un minimum de 7 jours de traitement intraveineux.

La dalbavancine est un nouvel antibiotique glycopeptidique qui possède une excellente activité bactéricide contre les bactéries Gram positif, en particulier *S. aureus*, et une demi-vie prolongée de 14 à 15 jours. À titre de comparaison, la demi-vie des antibiotiques habituellement utilisés pour les ICSR dues à *S. aureus*, c'est-à-dire la pénicilline ou les glycopeptides, en fonction de la sensibilité à la méticilline, est beaucoup plus courte : de 1,5 à 9 heures. Cette demi-vie prolongée permet à une injection IV d'être suffisante et efficace pendant 14 jours de traitement. Cette caractéristique remarquable devrait permettre aux patients de quitter rapidement l'hôpital sans surveillance.

L'hypothèse est que chez les patients atteints d'une ICSR due à *S. aureus*, après l'ablation du cathéter, la dalbavancine pourrait être administrée par voie intraveineuse en une seule fois après l'ablation du cathéter et être aussi efficace qu'une antibiothérapie standard documentée pendant 14 jours, conformément aux directives nationales.

L'objectif est de démontrer la non-infériorité d'une administration unique de 1500 mg de dalbavancine par rapport à une antibiothérapie standard documentée pendant 14 jours conformément aux directives nationales.

### Étude MUCOLINE (réseau MucoMicrobes)

Le CNR travaille depuis plusieurs années sur les résistances des staphylocoques au linézolide afin de surveiller l'évolution de la sensibilité à cet antibiotique de dernier recours et d'explorer les mécanismes impliqués. La résistance au linézolide est rare chez *S. aureus* mais elle a déjà été décrite depuis de nombreuses années chez des patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, le CNR souhaite mener une étude sur la résistance aux oxazolidinones parmi les souches de *S. aureus* colonisant ou infectant les patients mucoviscidosiques afin de déterminer les mécanismes de résistance impliqués chez cette population particulière.

Pour cela, le CNR va faire appel au réseau MucoMicrobes qui regroupe des microbiologistes hospitaliers impliqués dans le suivi bactériologique des patients mucoviscidose. L'étude reposera sur un recueil rétrospectif de données afin d'évaluer le nombre de souches de *S. aureus* résistantes au linézolide isolées chez les patients atteints de mucoviscidose dans les laboratoires du réseau entre 2012 et 2022, puis un recueil rétrospectif de toutes les souches de *S. aureus* résistantes au linézolide isolées chez des patients atteints de mucoviscidose encore disponibles dans les laboratoires du réseau, afin d'analyser la nature et la fréquence des mécanismes de résistance aux oxazolidinones.

### Étude STA-LINE : étude multicentrique du portage humain et de la colonisation environnemental par des souches de staphylocoques (*S. aureus* et SCN) résistantes au linézolide dans les services de réanimation, soins critiques, hématologie et transplantation

L'augmentation rapide de la prévalence des infections à *S. aureus* et à staphylocoque à coagulase négative résistants au linézolide pose la question de la prévalence du portage chez les patients les plus fragiles, de la transmission nosocomiale et de l'existence de réservoirs dans l'environnement des patients. L'objectif de l'étude STA-

LINE est d'étudier cette question en utilisant un milieu sélectif chromogénique récemment commercialisé et dont le CNR a pu établir les excellentes performances sur un panel de souches présentant différents niveaux de résistance au linézolide (bas en lien avec les gènes *cfz* ou élevés en lien avec des mutations chromosomiques sur l'ARN 23S). Ce milieu n'est actuellement validé que sur des prélèvements cliniques. Le projet vise à : i) valider l'utilisation du milieu sur des prélèvements environnementaux avec une optimisation du protocole de recueil et d'enrichissement, ii) de réaliser une première étude de portage nasal et cutané chez des patients de réanimation dans deux hôpitaux des Hospices Civils de Lyon et dans leur environnement (chambres, zone commune des personnels médicaux et paramédicaux, appareillages médicaux communs), iii) de réaliser, sur la base de ces premiers résultats, une étude nationale multicentrique afin d'évaluer la prévalence et la distribution de la colonisation chez l'homme et dans l'environnement de telles souches.

### 8.3.5.2 Santé animale

#### Suivi du portage des souches de *S. aureus* chez les équidés

Dans la lignée des travaux conduits au cours de la dernière mandature du CNR sur le portage de *S. aureus* chez les équidés, le CNR souhaite réitérer l'étude BIORequi (Cf 3.3.5 – section santé Animale) afin d'analyser la dynamique des clones et s'assurer de l'absence d'émergence de clones SARM ou de clones SASM présentant une virulence spécifique présentant un danger pour les professionnels mais aussi pour le grand public qui est en contact étroit avec les chevaux au cours des activités de loisirs.

#### Analyse du portage de *S. aureus* et SARM chez les animaux sauvages

Les travaux conduits sur les hérissons et le portage de souches de SARM *mecC+* ont mis en évidence le rôle que peut jouer la faune sauvage en tant que réservoir de souches spécifiques de *S. aureus*. Dans ce contexte, il nous semble intéressant d'étudier le portage d'un panel d'animaux sauvages. Ces travaux seront conduits en lien avec l'école Vétérinaire de Lyon - VetAgo Sup notamment en direction des sangliers, des lièvres, des chauve-souris, et des oiseaux (en lien avec le parc des oiseaux situé dans les Dombes dans l'Ain à une trentaine de kilomètre au Nord de Lyon qui accueille et abrite de nombreux oiseaux notamment des oiseaux migrateurs à plusieurs périodes de l'année).

#### Étude des SARM CC398 responsables d'infections humaines et liens avec les souches animales.

Les infections à *S. aureus* sensibles à la méticilline CC398 sont connues et bien décrites en France, cependant, l'implication des SARM reste méconnue. Les données récentes suggèrent une augmentation de la circulation des SARM CC398 dans la population porcine en France. Le CNR a été sollicité par le CHU de Rennes à la suite d'un cas d'infection invasive à SARM CC398. L'objectif de ce travail collaboratif entre CHU de Rennes/CH de Saint-Brieuc//ANSES Ploufragan sera d'identifier et de caractériser des isolats identifiés dans les 2 centres hospitaliers de Bretagne, première région française pour l'élevage porcin et de les comparer aux souches animales isolées dans la région ainsi que de réaliser une phylogénie des toutes ces souches ainsi que les souches publiées dans les banques publiques afin de mettre en évidence les adaptations à l'hôte de ces souches.

## 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 particuliers 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 SpF 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. En effet, en 2021 et 2022, nous assistons à de nombreuses épidémies à *S. haemolyticus* dans les services de néonatalogie et échangeons actuellement sur ce point avec SpF. Par ailleurs, nous surveillons actuellement la diffusion du clone de SASM PVL+ CC152-MSSA qui est désormais 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 dont la prévalence tend à augmenter.

# 1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

---

## 1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

**Le CNR Staphylocoques s'engage à assurer les missions définies** par le décret n°2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté de mars 2022 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 multirésistantes 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 du plan gouvernemental NRBC de 2016, notamment dans sa spécificité Biotox, le CNR apportera son expertise spécifique aux instances concernées de santé publique et sécurité nationale. Il contribuera ainsi :

- en tant que membre d'appui et d'expertise analytique et technique du réseau national des laboratoires biotox, piratox et piratome (RNLB2P) ;
- en contribuant à la réponse analytique d'un événement « biotox » lors de l'activation du RNLB2P ;
- en contribuant, avec les instances chargées de leur pilotage, aux travaux et activités du RNLB2P ;
- en contribuant à l'élaboration d'une collection nationale de souches de référence ;
- en participant chaque année au séminaire du RNLB2P

### 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 nationaux (PRIMO, SPARES), 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

Sur le plan humain, l'IAI emploie environ 180 personnes réparties dans les différents secteurs et plateaux présentés ci-dessous. Au sein de cet institut, les personnels affectés au CNR des Staphylocoques comprennent des personnels affectés spécifiquement et exclusivement au CNR (techniciens et ingénieurs) 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 :

<b>Anne Tristan – Directrice</b> PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:anne.tristan@chu-lyon.fr">anne.tristan@chu-lyon.fr</a>
<b>Frédéric Laurent – Directeur adjoint</b> PH – IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : <a href="mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr">frederic.laurent@univ-lyon1.fr</a>
<b>François Vandenesch – Directeur adjoint</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:francois.vandenesch@univ-lyon1.fr">francois.vandenesch@univ-lyon1.fr</a>

### 1. Secteur virulence et épidémiologie

<b>Anne Tristan – Directrice</b> PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:anne.tristan@chu-lyon.fr">anne.tristan@chu-lyon.fr</a>
<b>François Vandenesch – Directeur adjoint</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:francois.vandenesch@univ-lyon1.fr">francois.vandenesch@univ-lyon1.fr</a>
<b>Camille Kolenda</b> AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:camille.kolenda@chu-lyon.fr">camille.kolenda@chu-lyon.fr</a>
<b>Gérard Lina</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : <a href="mailto:gerard.lina@chu-lyon.fr">gerard.lina@chu-lyon.fr</a>

## 2. Secteur résistance

<b>Frédéric Laurent – Directeur adjoint</b> PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : <a href="mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr">frederic.laurent@univ-lyon1.fr</a>
<b>Céline Dupieux-Chabert</b> PHC - IAI	E-mail : <a href="mailto:celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr">celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr</a>
<b>Anne-Gaëlle Ranc</b> PH - IAI	E-mail : <a href="mailto:anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr">anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr</a>

## 3. Secteur sérologie

<b>Frédéric Laurent – Directeur adjoint</b> PH - IAI PU - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon	E-mail : <a href="mailto:frederic.laurent@univ-lyon1.fr">frederic.laurent@univ-lyon1.fr</a>
<b>Céline Dupieux-Chabert</b> PHC - IAI	E-mail : <a href="mailto:celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr">celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr</a>

<b>Patricia Martins-Simoes</b> Ingénieur hospitalier - IAI	E-mail : <a href="mailto:patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr">patricia.martins-simoes01@chu-lyon.fr</a>
<b>Benjamin Youenou</b> Ingénieur hospitalier - IAI	E-mail : <a href="mailto:benjamin.youenou@chu-lyon.fr">benjamin.youenou@chu-lyon.fr</a>

<b>Yves Gillet</b> (Réfèrent infectiologue pédiatre) PH - Hôpital Femme Mère Enfant PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:yves.gillet@chu-lyon.fr">yves.gillet@chu-lyon.fr</a>
<b>Tristan Ferry</b> (Réfèrent infectiologue adultes) PH - Hôpital de la Croix-Rousse PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:tristan.ferry@chu-lyon.fr">tristan.ferry@chu-lyon.fr</a>
<b>Pascal Del Giudice</b> (Réfèrent dermatologie) PH - CHI Fréjus Saint Raphaël	E-mail : <a href="mailto:del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr">del-giudice-p@chi-frejus-saint-raphael.fr</a>
<b>Marine Butin</b> (Réfèrent néonatalogie) PH - Hôpital Femme Mère Enfant MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : <a href="mailto:marine.butin@chu-lyon.fr">marine.butin@chu-lyon.fr</a>

<b>Cadre</b> Laetitia Dubost FFCS	
<b>Techniciennes</b> Nadia Boulegroun (départ juin 23) Emelyne Jeanne Émilie Josse Roxane Schnel Charline Vuillot	
<b>Secrétaires</b> Yamina Lakehal / Imane Mohamadi	

## 1.3 Locaux et équipements

L'IAI 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 m<sup>2</sup> sont occupés 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+3 est occupé pour moitié par le plateau de Sérologies Infectieuses manuelles et automatisées et par le plateau de Biochimie-Hématologie 24h24
- le R+2 est occupé par le plateau de microbiologie automatisée 24/24,
- le R+1 héberge le CNR des Staphylocoques, le CNR des Légionelles, le laboratoire d'hygiène hospitalière et 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 (Staphylocoques et Légionelles), incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (Figure 45). 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 bio-informatique 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 numéro unique. En dehors des heures ouvrables et le week-end, ce numéro est basculé sur les numéros 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 45- 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. Le CNR a ainsi été sollicité à plusieurs reprises pendant la période 2017-2022 pour sélectionner et fournir des souches dans le cadre de la préparation de contrôles de qualité au niveau national et européen (Cf paragraphe 1.5. Description des démarches qualité et garanties mises en œuvre au sein du laboratoire).

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.

Par ailleurs, le laboratoire a cloné chez *E. coli* et produit sous forme recombinante la totalité des toxines superantigéniques staphylococciques, les différentes leucocidines et hémolysines de *S. aureus*. A l'exception de l'entérotoxine B dont la détention est soumise à autorisation, les autres toxines peuvent être mises à disposition de laboratoires académiques ou hospitaliers dans le cadre de collaborations.

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

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 en 2018 à la suite de notre déménagement en janvier 2017, audit COFRAC novembre 2019) mais également pour la recherche des gènes codant facteurs de virulence et la détection des gènes de résistance par PCR multiplex (ajout 2019) et séquençage du génome complet (ajout 2022) ainsi que pour la réalisation des antibiogrammes et détermination des concentrations minimales inhibitrices en lien avec le plateau de microbiologie 24/24 de l'Institut des Agents Infectieux.

### 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 46). Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur. Pour le CNR des Staphylocoques, il s'agit de Anne Tristan. Le CNR des Staphylocoques s'appuie également sur la technicienne qualité du Centre de Biologie Nord et celle de l'IAI. La Figure 47 représente l'organigramme qualité de l'IAI.

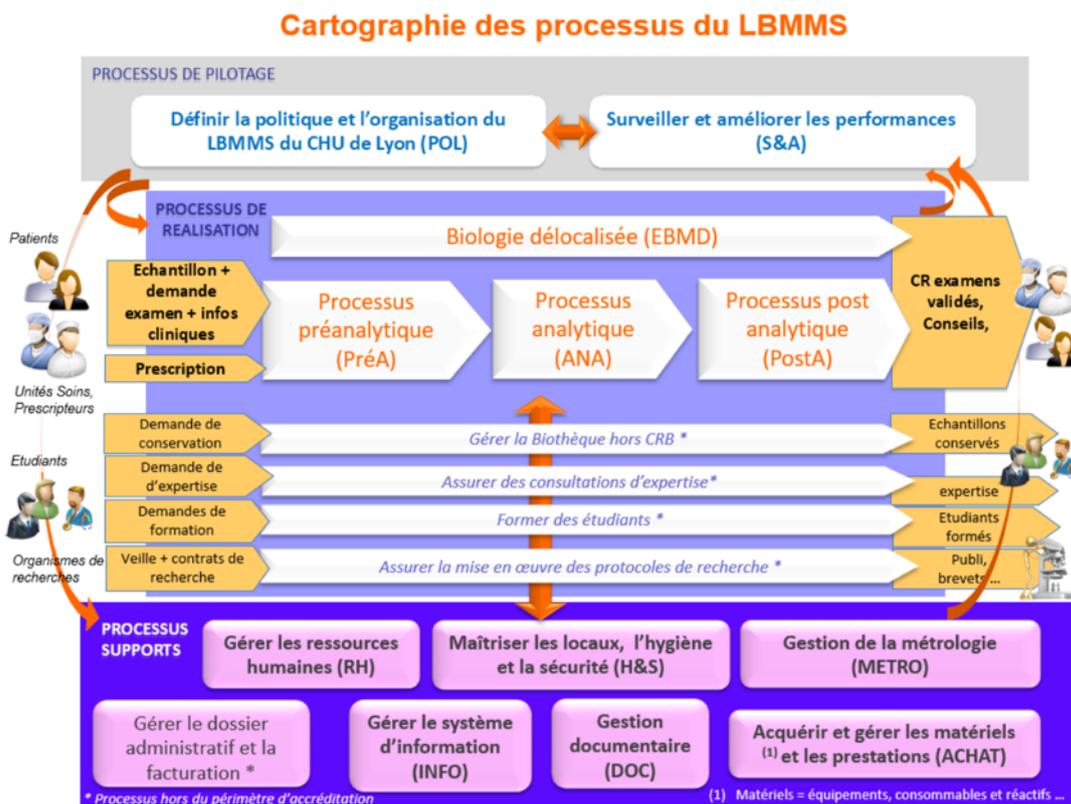


Figure 46- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001)

## Fonctions qualité et support du Service IAI

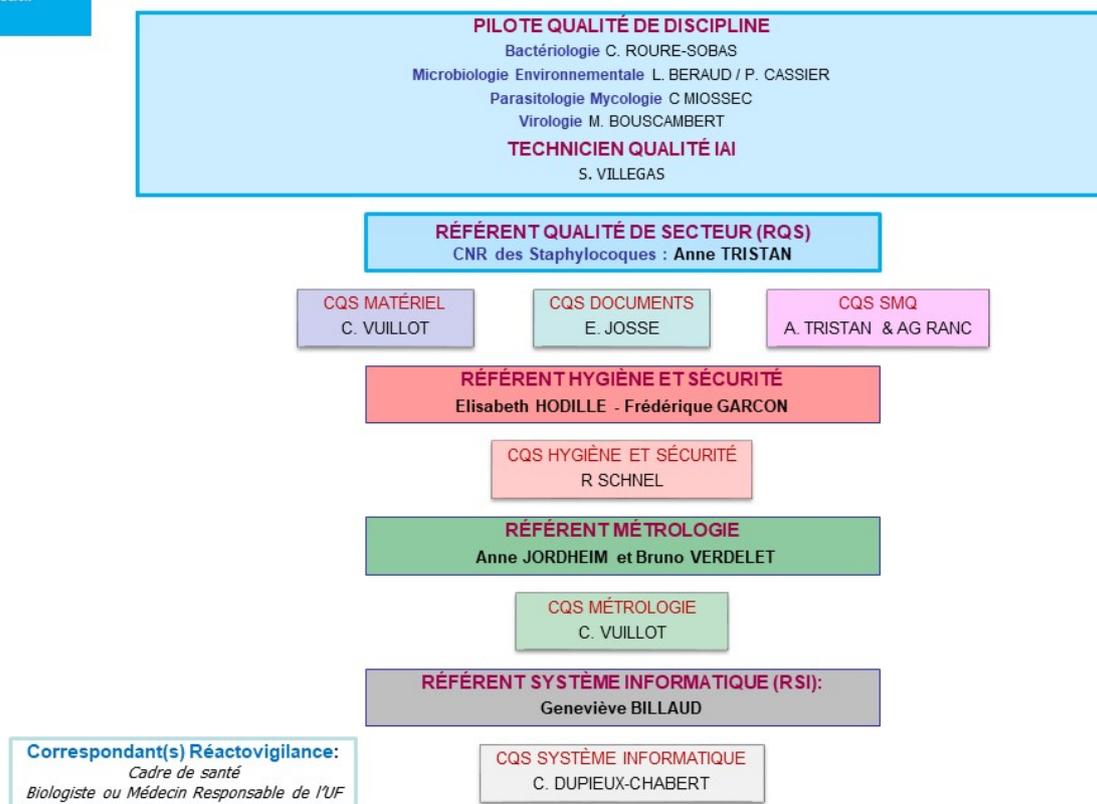


Figure 47- Organigramme qualité de l'IAI (d'après NE-RH-DE-012)

Le manuel qualité du LBMMS est disponible et détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale. Il est complété par la documentation spécifique du CNR des Staphylocoques (<https://www.chu-lyon.fr/sites/default/files/manuel-qualite-lbmms.pdf>).

### Confidentialité des données et le respect des secrets protégés par la loi.

Le CNR met en œuvre des techniques d'analyse de bactériologie conventionnelle, de sérologie infectieuse, de biologie moléculaire et de génomique. Le CNR utilise comme système de gestion de laboratoire le logiciel GLIMS et le concentrateur BioNumerics®. La Direction Générale des Hospices civils de Lyon a nommé comme Correspondant à la Protection des Données (ou Correspondant CNIL) M. Denis Rivoire (puis actuellement M. Marc Bérard), décision entérinée par la CNIL et ayant pris effet en date du 10 novembre 2006. Les systèmes de gestion de laboratoires (GLIMS) et concentrateur (BioNumerics®) relevant de la procédure de déclaration simplifiée, les HCL sont donc tout à fait dans le cadre précisé par la loi, et sont donc dispensés des formalités déclaratives auprès de la CNIL. En contrepartie, M. Marc Bérard, actuel correspondant CNIL des HCL, gère et tient à jour le registre des traitements de données nominatives mis en œuvre aux HCL. Le SGL y est enregistré sous le numéro 06-08.

### Audits

Des audits internes ont lieu régulièrement 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. En 2020, un audit interne de la gestion des ressources humaines et de la gestion de la métrologie ont été réalisés. Le dernier audit interne du CNR interne a eu lieu le 28 juin 2022 sur le

NGS, analyse déposée en ajout en mai 2022. Le prochain audit COFRAC est prévu sur l'ensemble du LBMMS en septembre 2023.

### 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.

### Avancement de la démarche qualité

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR en 2023. 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 à la suite de 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 a été déposé en ajout en mai 2022 et est donc accrédité. En 2023, plusieurs ajouts devraient être déposés à l'accréditation :

- la technique Sensititre® pour la réalisation des antibiogrammes devrait être déposée fin 2023 conjointement avec le plateau de microbiologie 24/24 qui réalise également cette technique ;
- le dossier de validation de méthode des puces à ADN sera déposé en ajout fin 2023.

Ainsi, le CNR sera ainsi accrédité pour les techniques courantes utilisées au CNR et poursuivra l'accréditation des techniques en développement en cours de mandat qui pourraient rentrer dans la routine du CNR.

### Contrôles qualité

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

### 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 2022, le panel comprenait :

- identification (Maldi-Tof et/ou méthodes génotypiques)
- antibiogramme
- Détection des gènes de résistance : *mecA*, *mecC*, *mupA*, *cfr*, *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*, *aph3*, *aadD*, *aac-aphD*

- détection des gènes de toxines : PVL, TSST-1, entérotoxines A, B, C, D, E, H, K, Q, Exfoliatines A, B, D
- *spa* typing et MLST (ou séquençage génome complet MLST)
- typage de la cassette *SCCmec* et détermination ACME

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<sup>25</sup>.

Pour la 6<sup>ème</sup> année consécutive, le CNR français a organisé le CQE en 2022. Dix-sept laboratoires incluant 13 pays y ont participé : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n=2), France (n=2), Allemagne (n=2), Irlande (n=1), Italie (n=2), Norvège (n=1), Portugal (n=1), Roumanie (n=1), Écosse (n=1) and Suisse (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 que depuis 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...).

## EEQ CTCB

Depuis 2021, le CNR participe également au contrôle de qualité français CTCB concernant deux essais : la recherche de toxines (PVL, TSST-1 et exfoliatines A et B) et la recherche de résistance à la méticilline (phénotypique et génotypique). Ce contrôle de qualité est réalisé sur l'ensemble de nos techniques 3 fois par an. En 2022, l'ensemble des résultats du CNR ont été conformes aux résultats attendus.

---

<sup>25</sup> 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.

## 2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

---

### 2.1 Liste des techniques de référence

Le CNR utilise désormais le séquençage de haut-débit (NGS) en routine au CNR avec pour objectif l'amélioration des missions du CNR en ce qui concerne : (i) l'identification de souches, (ii) la recherche de facteurs de virulence et de résistance (iii) la recherche de liens de clonalité, à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés (iv) la surveillance avec une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones présents sur le territoire français. Le CNR utilise la plateforme GenEPII au sein 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* résistants à la méticilline ou productrices de toxine PVL puis en systématique sur l'ensemble des souches reçues au CNR (hors secteur résistance pour lequel le séquençage est ciblé) à partir de janvier 2022.

#### 2.1.1 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.

##### 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 dès 2011 des 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 identifiées *S. aureus* par certaines techniques de Maldi-tof selon les bases de données actuellement commercialisées. Seules les techniques de séquençage (génomique complète) ou les puces à ADN permettent d'identifier correctement les souches appartenant à cette espèce. La base de données actuelle utilisée pour l'interprétation des séquences du gène *tuf* (BIBI) n'a pas encore été mise à jour pour la reconnaissance nominative de cette espèce ; cependant lors de l'alignement de la séquence du gène *tuf* de nos souches de *S. argenteus* dans 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 et le séquençage 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 description. Depuis janvier 2022, la technique de référence utilisée est le séquençage génomique complet.

## 2.1.2 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.

### PCR toxine simplex (accréditée)

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

### PCR toxine PVL en urgence sur souche (accréditée)

La détection rapide des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser la prise en charge des patients notamment en cas de suspicion de pneumopathie nécrosante. La mise à disposition d'un tel outil peut permettre une confirmation rapide du diagnostic et la mise en place de thérapeutique ciblée (antibiotiques « anti-toxiniques », immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Pantone 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 2.0 (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)

La détection des gènes codant les toxines staphylococciques par PCR multiplex avec révélation en gel a été utilisée depuis des années au CNR. Elle est conservée en technique de recours en cas de problème sur le NGS et des puces à ADN et permet de détecter l'ensemble des toxines recherchées au CNR.

## Puces à ADN (ajout à l'accréditation prévu pour fin 2023)

Jusqu'en janvier 2020, le test *S. aureus* genotyping kit 2.0 (Alere technologies) permettant de détecter 336 gènes ou allèles de gènes était utilisé au CNR pour remplacer 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 et d'assurer un assignement de la souche testée aux clones SASM ou SARM reliés génétiquement. Cette technologie a malheureusement été arrêtée en 2020 en raison de l'interruption de fabrication des réactifs par l'industriel mais le kit Inter-Array Genotyping Kit *S. aureus* de fzmb Gmb, basé sur la même technologie, a été évalué positivement et un dossier d'ajout sera déposé dernier semestre 2023. L'ensemble du protocole permet de disposer rapidement d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée et permet donc de répondre dans l'urgence dans le cadre d'une alerte.

## Analyse 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 a développé une méthode de protéomique haut débit 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, de pneumonies communautaires et de dermohypodermes nécrosantes 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.

## 2.1.3 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 Pantone 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. Il existe cependant des réactions croisées avec la gamma-hémolysine de *S. aureus*, HlgC.

**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 ou de prélèvements bactériologiques non réalisés lors de la phase aigüe de l'infection), 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.

#### 2.1.4 Techniques de 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 infraspécifique. 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/mecC*) 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 recombinaisons. 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 cinq types de complexes *mec* : classe A, B, C, D et E. Les gènes codant les recombinaisons, 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 *SCCmec*, l'extrémité 3' du gène codant pour la méthyltransférase H de la grande sous-unité ribosomale. Différents types ont été caractérisés : *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4*, *ccrC1*, *ccrC2*, *ccrA1B6* et *ccrA1B3*. La combinaison des cinq classes de complexe *mec*, des huit types de recombinaisons 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 14 types de cassettes *SCCmec* 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.

### Technique de MLST

Elle consiste en un séquençage de 7 gènes d'environ 500pb impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de l'espèce *S. aureus* (gènes dits 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) (<https://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 depuis janvier 2022 remplacée par le séquençage de génome entier.

### L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Cette technique historique est utilisée lors de l'investigation d'épidémies ayant des fenêtres temporelles et spatiales étroites, car c'est une des techniques la plus discriminante à l'exception du séquençage génome entier. L'ensemble des résultats analysés à l'aide du logiciel BioNumerics® permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *S. aureus*

résistantes à la pénicilline. Cette technique était 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. Cette approche est désormais remplacée par le NGS.

### **Puces à ADN (accréditation ajout fin 2023)**

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

### **2.1.5 Techniques de séquençage (accréditées - ajout mai 2022)**

Le CNR utilise désormais le séquençage de haut-débit (NGS) en routine au CNR avec pour objectif l'amélioration des missions du CNR en ce qui concerne : (i) l'identification de souches, (ii) la recherche de facteurs de virulence et de résistance (iii) la recherche de liens de clonalité, à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés et (iv) la surveillance avec une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones présents sur le territoire français. Le CNR utilise la plateforme GenEPII au sein des Hospices Civils de Lyon.

Entre 2017 et 2021, 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) en 2017 à un séquençage systématique depuis janvier 2020 des souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline ou productrices de toxine PVL puis en systématique sur l'ensemble des souches reçues au CNR (hors secteur résistance pour lequel le séquençage est ciblé) à partir d'avril 2021. L'objectif principal était de remplacer à partir de janvier 2022 la technique 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 permet également une surveillance épidémiologique plus résolutive. En accord avec cette évolution, le CNR a effectué en 2022 la demande d'ajout pour l'accréditation de cette technique pour *S. aureus* (technologie Illumina) et est désormais accrédité pour cette technique.

L'importante montée en charge des activités de séquençage de souches de staphylocoques par le CNR entre 2017 et 2022 a été permise tout d'abord par l'augmentation du nombre de séquenceurs Illumina au sein de la plateforme commune des HCL et leur accessibilité pour le CNR. En 2017, un séquenceur Miseq a été acquis par la plateforme NGS partagé avec des équipes de génétique humaine du groupement hospitalier Est des HCL et en 2020-2021, dans le contexte de la pandémie SARS-CoV2, des séquenceurs NextSeq 550, Novaseq 6000 et GridION ont été attribués à la plateforme NGS GenEPII dédiés aux analyses de microbiologie au groupement hospitalier Nord. Par ailleurs, des protocoles de miniaturisation et d'automatisation de la préparation des banques d'ADN pour le séquençage ont été développés. Si le nombre de séquenceurs a permis l'accès à des séquençages (runs) plus fréquents, la miniaturisation, a permis de réduire les coûts du séquençage et rendre possible l'utilisation du séquençage NGS comme technique de premier choix pour la caractérisation des souches *S. aureus*.

Le séquençage systématique est réalisé en technologie Illumina (300 cycles en pair-end) et le séquençage avec la technologie Oxford Nanopore, produisant des reads plus longs, est utilisé en complément pour réaliser la fermeture de génomes et/ou plasmides pour des besoins d'expertise spécifiques.

En parallèle de cette évolution technique, nous avons aussi développé depuis 2017 différents pipelines d'analyses bio-informatiques pour répondre aux différentes applications du séquençage génome entier des souches de staphylocoques. Un « pipeline maison » construit avec des outils exclusivement « open-source » et lancés en ligne

de commande permet de réaliser les différentes analyses décrites ci-dessous. Par ailleurs, en 2021, des modules d'analyses bio-informatiques proposés par le logiciel commercial BioNumerics® ont été implémentés pour la détection des gènes de virulence de *S. aureus* afin de rendre le traitement des données de séquençage accessible à l'ensemble des biologistes et techniciens du CNR sans besoin de formation avancée en bio-informatique.

### Identification de souches de staphylocoques

En cas de difficultés d'identification malgré le recours aux techniques de routine citées précédemment, le séquençage génome entier de la souche de staphylocoque peut être utilisé. L'identification est alors réalisée à partir des reads en utilisant l'outil Kraken et des bases de données métagénomiques précompilées pour cet outil. Brièvement, chaque read est décomposé en plusieurs k-mers (mot de taille k) et tous les k-mers d'une séquence vont être mappés sur des génomes de référence dans la base de données. L'identification de l'espèce est faite par biais de la classification taxonomique des k-mers. La détection de potentielles contaminations est réalisée par cette approche.

### Analyse de la virulence de *S. aureus*

La recherche des gènes codant pour des facteurs de virulence tels que les toxines staphylococciques, exfoliatines et gènes codant pour la leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) est réalisée par approche de « BLAST » du génome assemblé versus une base de données publique de facteurs de virulence de *S. aureus*, VirulenceFinder<sup>26</sup>, implémentée dans la suite BioNumerics®.

### Typage MLST

Le typage des souches de staphylocoques, basé sur la technique MLST, est aussi possible en utilisant des données de NGS. Ceci est réalisé par un scan des génomes assemblés versus des schémas de référence de combinaisons d'allèles disponibles sur des bases publiques (PubMLST pour 7 espèces de staphylocoques en 2021 - <https://pubmlst.org/> et <https://bigsd.bpasteur.fr/staphlugdunensis/> pour *S. lugdunensis*). L'ensemble de ces 8 bases de données PubMLST est installé localement au CNR et mis à jour régulièrement pour typer les souches passées en NGS.

### Détermination de liens de clonalité – surveillance épidémiologique

L'expertise du CNR pour les analyses de clonalité et de surveillance épidémiologique s'est nettement renforcée ces dernières années grâce à l'augmentation importante des capacités de séquençage et de l'enrichissement de nos bases de données de génomes de staphylocoques. En effet, en raison de la circulation de grands clones de SARM et de SASM, la différenciation de souches au sein de ces clones peut s'avérer délicate. Le séquençage est la technique la plus résolutive permettant la comparaison de souches d'un même fond génétique (complexe clonal) en calculant des distances génétiques (nombre de SNPs) entre les génomes permettant d'affirmer ou d'infirmer des événements de transmission dans un contexte épidémique, le caractère endémique au niveau national de certains clones dans le cadre de la surveillance épidémiologique.

Les analyses pour la recherche de lien de clonalité sont réalisées en utilisant les reads nettoyés (séquences résultant du séquençage Illumina après suppression des adaptateurs et indexes) et un génome de référence. Préalablement, les souches à comparer sont assemblées et typées (MLST et élément *SCCmec*) pour vérifier l'appartenance au même fond génétique. Toutes les souches ayant le même fond génétique sont comparées en choisissant la souche plus ancienne comme génome de référence pour l'alignement des reads. L'alignement des reads et l'appel de variants sont réalisés en utilisant le logiciel Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>). Ceci permet d'extraire un alignement des SNP des régions génomiques conservées entre l'ensemble des souches comparées, c.a.d., les SNP du « core-genome ». Une matrice de distances entre chaque paire de souches (« pairwise distance matrix ») et un arbre phylogénétique sont calculés à partir de cet alignement. Sont ensuite utilisés : i) la distance entre les souches, ii) la structure de la phylogénie et iii) l'horloge moléculaire (pour les comparaisons de souches de *S. aureus*) pour évaluer le potentiel lien de clonalité entre les souches.

<sup>26</sup> Joensen KG et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1501-10.

## Analyse du résistome et typage de la résistance à la métiline

La détection de l'ensemble des gènes connus comme codant pour une résistance aux antibiotiques est réalisée par une approche de « BLAST » du génome assemblé versus une base de données publique dédiée aux résistances, ResFinder<sup>27</sup>, implémentée dans la suite BioNumerics®. En complément du typage MLST, la caractérisation de l'élément mobile SCC*mec*, porteur du gène *mec* conférant la résistance à la métiline, est importante pour le typage des clones de SARM. Elle est réalisée par une approche similaire de BLASTN des génomes assemblés contre 3 bases de données publiques installées localement de l'outil SCC*mec*Finder<sup>28</sup>. Elles comprennent : i) les différents allèles de recombinases, les différents allèles des IS1272 et les différents allèles des gènes composant le complexe *mec* (*mecA* ou *mecC*, *mecR* et *mecI*), ii) une base de données codant pour les différentes insertions des IS341 et iii) une base de données composée des éléments SCC*mec* I à XIII complets.

## 2.1.6 Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques et détection des nouveaux génotypes

### Détection des gènes *mecA/mecC* de résistance à la métiline (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 immunochromatographique de la PLP2a

Le test PBP2a SA Culture Colony Test (Abbott) est disponible au CNR pour la recherche sur souche de l'expression de la protéine codée par le gène *mecA*, 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 utilisait depuis 2017 le test UMIC Vancomycine-Teicoplanine (Biocentric). Ce test a été remplacé par la technique Sensititre début mai 2021. Depuis cette date, le CNR dispose d'une plaque de CMI en microdilution pour la plupart des antibiotiques antistaphylococciques d'intérêt, désignée à façon pour l'usage du CNR et fabriquée par ThermoFisher. Cette plaque contient notamment une gamme de vancomycine (0,5 à 8 mg/L) et une gamme de teicoplanine (0,5 à 8 mg/L). Cette plaque est utilisée selon le même principe que le test UMIC : réalisation d'un inoculum à 0,5 McF dans de l'eau stérile, dilution au 1/367 dans un bouillon Mueller Hinton, distribution de 50 µL de la suspension diluée par puits de la plaque qui est ensuite recouverte d'un film autocollant et incubée 24h à 36°C. La lecture de la plaque est réalisée de manière semi-automatisée grâce à un lecteur prenant une photo de la plaque.

La recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides chez *S. aureus* est réalisée lorsque les CMI en microdilution sont > 1 mg/L pour la vancomycine et/ou pour la teicoplanine, par un test de dépistage utilisant la technique des macrobandettes (inoculum de 2 McF, bandelettes en gradient vancomycine et teicoplanine déposées sur gélose cœur-cerveau, 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 ou douteux, la confirmation définitive repose sur une analyse de population selon la technique d'Hiramatsu sur gélose cœur-cerveau 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'éventuelles souches de *S. aureus* porteuses des gènes *vanA/B*. Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une vingtaine de souches de *S. aureus* à travers le monde et ces souches ne présentaient pas de caractère épidémiogène (en raison du coût très élevé en termes de fitness de ce

<sup>27</sup> Bortolaia V et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020 Dec 1;75(12):3491-3500.

<sup>28</sup> Kaya H et al. SCC*mec*Finder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. mSphere. 2018 Feb 14;3(1):e00612-17.

type de résistance chez *S. aureus*). Même si l'émergence de telles souches et leur dissémination en France est peu probable, ce phénomène constituerait un problème majeur de santé publique. Dans son rôle de surveillance continue des résistances, le CNR dispose donc des outils pour 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 pour détecter ces gènes, auparavant grâce aux puces à ADN qui comportaient 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.

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 blancs aux glycopeptides. Le CA-SFM avait alors pris en compte l'ensemble des remarques et recommandations du CNR.

### Détermination de la résistance au linézolide

Elle repose sur la détermination de la CMI du linézolide avec une incubation de 48h (par microdilution en technique Sensititre ou par technique de bandelette en gradient type Etest) associée à la recherche des déterminants génétiques qui aboutissent à la modification du site de liaison du linézolide au ribosome.

La résistance au linézolide étant le plus souvent associée à des mutations dans la séquence de l'ARNr 23S (une vingtaine sont décrites jusqu'à présent) ou moins fréquemment dans les séquences codant les protéines ribosomales L3 et L4 (plus d'une dizaine décrites), le CNR utilisait depuis plus de 10 ans une approche par PCR-séquençage des régions d'intérêt. Courant 2022, le CNR a mis au point une approche de NGS permettant de remplacer ces techniques de PCR-séquençage par un pipeline assurant à la fois la recherche de mutations ponctuelles dans les séquences codant l'ARNr 23S et les protéines ribosomales ; une validation de méthode a été réalisée sur plus d'une centaine de souches afin de vérifier la concordance des résultats obtenus par NGS vs. ceux obtenus précédemment par PCR-séquençage.

La résistance au linézolide peut aussi être liée à l'acquisition de gènes de résistance transférables (*cfr* et ses variants *cfr(B)* à (E), *optrA*, *poxtA*). Une PCR multiplex ciblant ces gènes a également été développée au CNR et est utilisée depuis début 2021 afin de détecter simultanément les gènes *cfr/cfr(B)*, *optrA* et *poxtA* (avant 2021, seul le gène *cfr* était recherché systématiquement par une PCR spécifique). Les loci *cfr* et *cfr(B)* (décrit plus récemment en 2015), présents généralement en position plasmidique, codent des méthylases modifiant l'ARN 23S à la position 2503. Il faut noter que le premier *S. aureus* positif pour le gène *cfr* a été détecté en juillet 2015 et le premier *S. aureus* positif pour le gène *cfr(B)* a été mis en évidence au CNR à l'été 2022 (souche isolée en 2017). La méthylation liée aux gènes *cfr* confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (linézolide seulement), Pleuromutilines et Streptogramine A (phénotype PhLOPSa). Les loci *optrA* (décrit en 2015) et *poxtA* (décrit en 2018) en position plasmidique codent pour des ABC-protéines qui agiraient par un mécanisme de protection ribosomale et sont retrouvés majoritairement chez les entérocoques. Ces mécanismes (surtout *cfr*) conduisent à des faibles niveaux de résistance au linézolide, sauf quand ils sont associés à des mutations ribosomales.

Toutes les souches de staphylocoques détectées résistantes au linézolide au CNR sont analysées par NGS, à la fois pour rechercher les mutations ponctuelles dans les séquences codant l'ARNr 23S et les protéines ribosomales comme indiqué précédemment, pour confirmer la présence des gènes transférables de type *cfr/cfr(B)*, *poxtA* et *optrA* lorsque ceux-ci sont identifiés par PCR, mais également pour typer le fond génétique des souches ainsi que le support des résistances transférables afin de mieux investiguer et surveiller les liens entre les souches résistantes au linézolide et la diffusion de ces résistances, notamment en cas d'épidémies de souches de staphylocoques résistantes au linézolide dans un service ou un hôpital.

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

Depuis mai 2021, le CNR réalise un antibiogramme par microdilution grâce à une plaque à façon Sensititre (ThermoFisher) pour l'ensemble des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques. En effet, le CNR dispose actuellement d'une plaque de CMI en microdilution pour la plupart des

antibiotiques antistaphylococciques d'intérêt, désignée à façon pour l'usage du CNR et pouvant être régulièrement mise à jour à la suite des modifications des recommandations CA-SFM/EUCAST ou la commercialisation de nouveaux antibiotiques. Cette plaque permet notamment de tester les marqueurs de la résistance à la méticilline (céfoxitine, oxacilline), les céphalosporines anti-SARM (ceftaroline, ceftobiprole), les aminosides, les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones, les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine), la daptomycine, la dalbavancine et les oxazolidinones (linézolide, tédizolide). La lecture de la plaque est réalisée après 24h (ou 48h pour certains antibiotiques) d'incubation à 36°C de manière semi-automatisée grâce à un lecteur prenant une photographie de la plaque.

Le CNR dispose aussi des techniques d'antibiogramme classiques en milieu liquide (Vitek2, bioMérieux) et en milieu solide (diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques ou des bandelettes en gradient), ainsi que 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 dernières 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.

### Détermination des nouveaux géotypes et résistome des souches de staphylocoques

Comme indiqué précédemment, le CNR dispose des techniques de séquençage Illumina et Nanopore afin de déterminer le résistome des souches présentant des phénotypes de résistance particuliers. Ces techniques permettent de rechercher dans le génome des souches l'ensemble des mécanismes de résistance déposés dans les bases publiques (ex: ResFinder), mais également d'étudier précisément la séquence de certains éléments génétiques tels que la cassette *SCCmec* codant la résistance à la méticilline pour détecter d'éventuels nouveaux types ou sous-types, ou d'autres gènes pouvant être impliqués dans la résistance aux antibiotiques pour détecter des mutations ou encore d'identifier de nouveaux éléments génétiques associés à la résistance. Ces outils nous ont permis tout récemment d'identifier un nouveau mécanisme de résistance aux oxazolidinones correspondant au gène *cfb* (jusqu'à présent décrit uniquement chez quelques souches d'entérocoques et de *Clostridiales*) présent sur un petit transposon de 3.7 kb chez deux souches différentes de *S. aureus* isolées chez deux patients atteints de mucoviscidose. Les résultats ont été présentés en « Late Breaker Abstract » à l'ECCMID en avril 2022 et ont fait l'objet d'une publication<sup>29</sup>.

## 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.

<sup>29</sup> Youenou B et al. Linezolid resistance: detection of the *cfb*(B) gene in French clinical MRSA strains. J Antimicrob Chemother. 2023 Feb 1;78(2):445-449.

## 3. 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 <sup>30</sup>

### 3.2 Autorisations MOT <sup>31</sup>

### 3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

### 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 de la subvention versée par Santé publique France

### 3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR

### 3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR

---

<sup>30</sup> 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.

<sup>31</sup> 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.