# Plan du rapport annuel d'activité

2014

### **Centre de national de référence des Staphylocoques**

Année d'exercice

2013

Directeur: F. Vandenesch

Co-directeurs: F. Laurent et A. Tristan

#### Préambule

Un rapport d'activité annuel doit être transmis à l'InVS à la fin du premier trimestre de l'année N+1.

L'objectif de ce document est de fournir aux CNR un cadre de présentation homogène des activités de l'année N. Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des différents laboratoires concourant aux missions du CNR.

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

La description des missions, de l'équipe, des locaux et des capacités techniques sera présentée en annexes. L'ensemble des annexes doit être regroupé dans un seul document. Les rapports d'activité des années suivantes pourront renvoyer à ces annexes. Les changements apportés dans les annexes devront être signalés dans le rapport.

Ces rapports sont destinés à être rendus publics. Les résultats de recherche non publiés pourront également être présentés en annexe pour les soustraire au rapport rendu public si le CNR le juge nécessaire.

Il est rappelé de rigoureusement respecter le plan du rapport qui concorde avec celui de la grille d'évaluation.

Rés	sumé analytique	5
1	Missions et organisation du CNR	6
2		
	<ul> <li>2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N</li> <li>2.2 Les activités d'expertise de l'année N et les évolutions quantitatives et qualitatives</li> </ul>	ხ
	Observées :	7
	2.2.1 Nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées,	
	identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers) en distingu	ant
	leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage	
	phénotypique, génotypique)	
	2.2.2 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	
	2.2.3 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué	
3		
	3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	
	3.1.1 Réseau de partenaires	/
	3.1.2 Definition de l'echantillon de souches isolees	
	critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances	
	3.1.3.1 Choc toxique staphylococcique et scarlatine staphylococcique	
	3.1.3.2 Détermination des principaux « répertoires Vβ »	
	3.1.3.3 Syndromes d'exfoliation staphylococciques	.13
	3.1.3.4 Infections cutanées à S. aureus PVL+	
	3.1.3.5 Furonculoses familiales	
	3.1.3.6 Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la	
	production de la leucocidine de Panton Valentine	
	3.1.3.8 Ostéites et infections ostéo-articulaires	
	3.1.3.9 Sérologies PVL et TSST-1	
	3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	
	3.2.1 Résultats : distribution en fonction des critères pertinents	
	3.2.1.1 Résistance aux bêta-lactamines	
	3.2.1.2 Détection de souches de S. aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides	
	3.2.1.3 Détection de la résistance au linézolide	
	3.2.1.4 Détection de la résistance à la daptomycine	
	3.3 Participation aux réseaux de surveillance	
	3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	
	·	
4		
	4.1 La procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anorm les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année	
	4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	
	4.2.1 Clusters d'infections à SARM Co USA300	
	4.2.2 Epidémie d'infections cutanées à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement	.31
	4.2.3 Cas groupés de choc menstruels	
	4.2.4 Recherche de lien de clonalité	
	4.2.5 Emergence et dissémination d'un clone de Staphylococcus epidermidis résistant au	
	linézolide au niveau national	
_	·	
5		
	5.1 Les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	
	<ul><li>5.2 Les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)</li><li>5.3 Les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR</li></ul>	
	5.4 Les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les	. 30
	appels ou emails, volume d'activités)	.39
	5.5 Les activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille	
	sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure	
	européenne (ECDC) ou internationale (OMS)	.39

6	6.1 Les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missi et activités du CNR	ions 40
	6.2 Les publications, communications réalisées, prévues en lien avec les activités du CNR	45
7 eı	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, nvironnementaux	51
8	Programme d'activité pour les années suivantes	. 54
Anr	nexe 1	. 57
1	Missions & organisation du CNR	57
-	1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés	
	1.2 Fournir une description détaillée de l'équipe :	
	1.3 Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés).	;
	1.3.1 Surface, plan	
	1.3.2 Principaux équipements	
	1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de	
	qualité externe, programmes, accréditation, certification,	
	1.4.2 Structure qualité du laboratoire	
	1.4.3 Manuel qualité	
	1.4.4 Audit et formation qualité.	
	1.4.5 Contrôles de qualité	
	1.4.5.1 Contrôle qualité spa-type SeqNet-RIDOM	
	1.4.5.2 Contrôle qualité « European SRL »	
	1.4.5.3 Contrôle qualité franco-belge	
	1.4.5.4 Mise en place d'un contrôle de qualité français	63
Anr	nexe 2	. 64
2	Capacités techniques du CNR	64
	2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la	
	sensibilité aux anti-infectieux	
	2.1.1 Techniques d'identification	
	2.1.2 Techniques de caractérisation de la virulence	
	2.1.3 Techniques immunologiques	
	2.1.4 Techniques de typage	
	2.1.5 Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques	
	2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	
	<ul> <li>2.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :</li></ul>	
Δnr	nexe 3 : PHRC leucocidine de Panton Valentine : facteur indépendant de gravité	
	umonies à Staphylococcus aureus	
	<b>1exe 4 :</b> lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence phylocoques	

### Résumé analytique

**Expertise, surveillance, alerte, information, formation et conseil** sont les mots clés des missions des CNR. Sur cette base les principaux résultats et faits marquants de l'année 2013 du CNR des staphylocoques sont les suivants :

- en matière d'expertise, le CNR a poursuivi son activité d'expertise sur un rythme toujours très soutenu (1926 souches analysées) et 541 souches distribuées avec un nombre de correspondants toujours très élevé
- en matière de surveillance et d'alerte, le CNR a été pro-actif vis à vis de la surveillance épidémiologique sur les points sensibles que sont :
- la surveillance et l'alerte vis à vis des micro-épidémies à SARM communautaires, notamment celles causées par des souches de la lignée USA300. Pour la première fois en France une épidémie de SARM USA300 a été identifiée en institution de soins de long séjour et une autre micro-épidémie a été identifiée dans une MAS en région Parisienne. Ces deux événements s'ajoutent à l'épidémie de SARM USA300 survenue entre juin 2011 et fin 2013 dans une crèche familiale au Puy en Velay et dont le contrôle n'est pas formellement établi. Ces événements posent la question de l'émergence ou non d'un phénomène épidémique à USA300 en France et ont contribué à la saisine du HSCP en vue d'établir si les recommandations de prise en charge des infections à SARM communautaires devaient être spécifiquement adaptées aux cas impliquant USA300
- la participation active aux réseaux de surveillance européen, le CNR (représenté par le Frédéric Laurent) étant membre du comité de pilotage du Laboratoire Européen de Référence des Staphylocoques missionné par l'ECDC.
- en matière de conseil, le CNR a participé activement à différentes actions de conseil auprès des professionnels, des autorités sanitaires et de la population. Outre leur participation à différentes cellules de gestion d'épidémie, les médecins et biologistes du CNR ont participé activement au groupe de travail mandaté par le HCSP visant à actualiser les recommandations en matière de gestion des infections à SARM communautaires en France, à la lumière de l'épidémiologie actuelle de ces SARMco (cf supra)
- en matière de formation, d'information et d'animation scientifique, le CNR a poursuivi son activité de diffusion de la connaissance :
  - par l'organisation d'une session spécifique CNR lors de la RICAI 2013
- par la création d'un groupe spécifique Staphylocoques au sein de *l'European Society for Microbiology and Infectious Diseases (European Study Group on Staphylococci & Staphylococcal Infections*) dont le coordonnateur est F. Vandenesch (https://www.escmid.org/research\_projects/study\_groups/staphylococci/)
- par sa présence active au sein des groupes EUCAST et CA-SFM dans lesquels le CNR est représenté par Gérard Lina
- enfin, le CNR participant d'une recherche intégrée « bed to bench & bench to bed » associée à notre unité INSERM thématisée sur les staphylocoques, un nombre important d'articles scientifiques en lien direct avec l'activité du CNR a été publié, de même que des articles plus fondamentaux ayant des retombées potentielles en Santé. On peut citer à ce titre l'identification du récepteur eucaryote de la Leucocidine de Panton Valentine (Spaan et al, Cell Host Microbe 2013), récepteur dont l'étude actuelle du polymorphisme ouvre la voie à l'identification d'une possible susceptibilité génétique individuelle.

#### 1 Missions et organisation du CNR

Les souches de *S. aureus* reçues au CNR pour recherche de toxines sont actuellement expertisées avec une technique de puces à ADN. Pour l'identification de souches, la technique utilisée en routine est la spectrométrie de masse. Pour les recherches de liens de clonalité, en fonction des espèces de staphylocoques, l'expertise est effectuée soit avec les puces à ADN soit avec la technique de champ pulsé. Concernant les souches reçues pour évaluation de la sensibilité aux antibiotiques, les techniques sont également identiques à celles utilisées précédemment. Par ailleurs, le CNR implémente actuellement les approches génomiques, en vue d'une part d'une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones épidémiques et d'autre part à l'échelle de la micro-évolution pour l'investigation de cas groupés.

#### 2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en annexe 2.

#### 2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N

- Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

#### PCR PVL temps réel R-biopharm : RIDA ® GENE PVL

Il s'agit d'une PCR en temps réel pour la détection directe, qualitative des gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine à partir de cultures. La PCR RIDA <sup>®</sup> GENE PVL en temps réel est destinée à être utilisée comme une aide au diagnostic des infections de la peau et tissus mous causées par *S. aureus* producteur de la PVL. Nous avons voulu tester cette technique directement à partir de prélèvements de pus d'infections cutanées à *S. aureus*.

Nous avons d'abord testé 14 souches de *S. aureus* présentant des polymorphismes connus<sup>1</sup>. Le kit a parfaitement détecté la leucocidine de Panton Valentine.

Nous avons ensuite testé 9 pus prélevés à l'écouvillon sec à partir desquels une souche de *S. aureus* PVL+ avait été isolée. Les PCR se sont toutes révélées négatives. Il est à noter que les prélèvements avaient déjà été ensemencés et congelés. Cela nous a permis de confirmer que ce type de support de prélèvement était à proscrire. En revanche, nous avons testé 50 poudriers de pus (20 PVL+/ 30 PVL-) soit avec une extraction directe de l'ADN à partir du pus soit à partir d'un e-swab que l'on avait immergé préalablement dans le pus. Il n'y a eu aucun faux positif et aucun faux négatif quel que soit l'aspect et la consistance du pus. Cette étude se poursuit pour augmenter le nombre de prélèvements mais également tester les réactions croisées avec d'autres microorganismes rencontrés dans ce type de pathologies cutanées comme *S. pyogenes* par exemple.

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR est 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.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Dumitrescu O *et al.* Polymorphism of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin genes and its possible link with the fitness of community-associated methicillin-resistant *S. aureus.* J Infect Dis. 2008 Sep 1;198(5):792-4.

En 2013, nous avons plus particulièrement transmis à plusieurs laboratoires demandeurs les protocoles PCR visant à permettre l'identification des souches de SARM portant le gène *mec*C et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine.

### 2.2 Les activités d'expertise de l'année N et les évolutions quantitatives et qualitatives observées :

2.2.1 Nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...)

En 2013, le CNR a reçu 1926 souches et ADN

- 1428 souches cliniques ont été reçues dans un but d'expertise toxinique et de recherche de résistance aux antibiotiques. Ces souches provenaient d'une centaine de villes françaises mais aussi des territoires d'outre-mer (Pointe à Pitre, Papeete, Mayotte, Fort de France, Saint Denis de la Réunion, Saint Paul).
- **498** souches ou ADN de pays étrangers et/ou France (métropole et Outre mer) dans le cadre de protocoles ou études spécifiques.

Toutes les souches reçues pour expertise toxinique ont bénéficié d'une caractérisation complète de la souche par puces à ADN.

2.2.2 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats

Merci de voir chapitre 32. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux antiinfectieux

**2.2.3** Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.

Le CNR a distribué un peu plus de **541** souches ou ADN à des laboratoires français et étrangers (Allemagne, Belgique, Danemark, France, Hollande, Inde, Italie, Pologne, Suisse) au cours de l'année 2013.

#### 3 Activités de surveillance

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

**3.1.1** Réseau de partenaires en précisant notamment les notions suivantes : (i) description des partenaires, (ii) répartition par type d'activités, (iii) répartition géographique, (iv) estimation de la couverture du réseau ou représentativité, (v) évolution du réseau

Les souches reçues au CNR des staphylocoques sont envoyées par l'ensemble des CHU, CHG de France métropolitaine mais aussi par un nombre croissant de LABM et d'hôpitaux ces dernières années.

Les **1428** souches reçues au CNR en 2013 pour expertise (virulence et résistance sont donc bien le reflet de l'épidémiologie de l'ensemble des régions françaises hors protocole. Ces souches provenaient de 90 départements ou DOM TOM.

Plus de 60 % des souches provenaient de quatre régions principales : 33,9 % (Rhône-Alpes), 14,7 % (Ile de France), 9,2 % (Provence Alpes Côte d'Azur), 5,5 % (Bretagne), < 5 % (autres régions et DOM TOM) (Figure 1).

Nous recevons également des souches de l'étranger dans le cadre de collaborations nous permettant d'améliorer la connaissance de l'épidémiologie de *S. aureus* dans ces pays.

En 2013, pour les seules recherches de toxines ou de lien de clonalité, le CNR a reçu, **1121** souches.



**Figure 1**- Répartition géographique des souches reçues en 2013 pour expertise (recherche de facteurs de virulence, de lien de clonalité ou évaluation de la sensibilité aux antibiotiques)

#### 3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Entre 2006 et 2013, le CNR a reçu 15944 souches de staphylocoques pour expertise (Figure 2). Le nombre de souches pour expertise hors protocole est sensiblement le même que l'année précédente.

En 2013, **1428** souches ont été reçues dans un but d'expertise toxinique et de recherche de résistance aux antibiotiques. Ces souches provenaient de 90 départements ou DOM TOM.

Plus de 60 % des souches provenaient de quatre régions principales : 33,9 % (Rhône-Alpes), 14,7 % (Ile de France), 9,2 % (Provence Alpes Côte d'Azur), 5,5 % (Bretagne), < 5 % (autres régions et DOM TOM). Nous avons reçu **498** souches ou ADN de pays étrangers et /ou France (métropole et Outre mer) dans le cadre de protocoles ou études diverses. Ces souches venaient des pays suivants (Angleterre, Belgique, Australie, Danemark, Norvège)

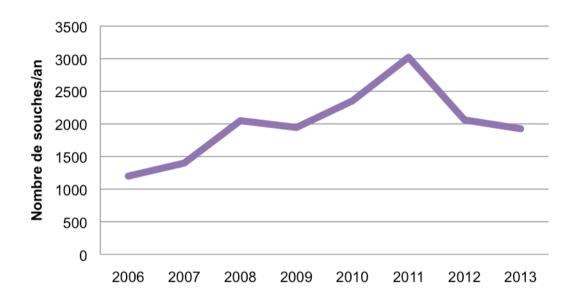


Figure 2- Evolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2013.

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines rapportées en France est en très légère augmentation avec 144 cas en 2013 contre 128 cas en 2012 (Tableau 2).

Syndrome Année d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc toxique staphylococcique	Scarlatine staphylococcique	Total Syndromes/an
2006 32	20	32	11	95
2007 18	16	27	19	80
2008 11	18	26	11	66
2009 10	19	31	12	72
2010 16	22	43	10	91
2011 23	26	61	7	117
2012 14	11	92	11	128
2013 17	27	91	9	144

**Tableau 1-** Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines par syndrome recensées par le CNR des Staphylocoques entre 2006 et 2013 en France.

L'étude des corrélations clinico-biologiques entre le profil toxinique et la présentation clinique a permis de dégager des informations importantes pour les différents syndromes toxiniques (cf ci-dessous).

- **3.1.3** Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances
- 3.1.3.1 Choc toxique staphylococcique et scarlatine staphylococcique

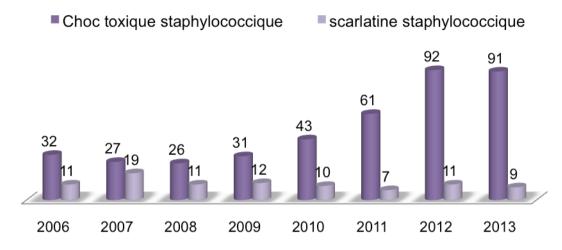
Depuis 2006, le CNR a analysé **403** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et **79** souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

En 2013, **91** cas de CTS ont été rapportés, dont **18 cas de CTS menstruels**; ces chiffres, restent stables par rapport aux années précédentes. L'âge des patientes s'étend de 13 à 37 ans avec une médiane de **21 ans**. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. Le pronostic était favorable. Seize souches isolées appartenaient au complexe clonal CC30 dont 5 ne possédaient que le gène codant la TSST-1 et douze possédaient les gènes codant la TSST-1, l'entérotoxine A et un allèle de type *agr*3 correspondant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. Une souche appartenait au complexe clonal CC22. Enfin une souche responsable de choc menstruel était résistante à la méticilline, il s'agit d'une souche appartenant au clone « Géraldine ».

Dans les **73 autres cas**, les chocs sont survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. L'âge des patients s'étend de 0 à 89 ans avec une médiane d'âge de 49.0 ans tandis que le *sex ratio* 3/2 de ces patients est 40/33. Il n'y a que 6 souches de SARM (2 clones Lyon, 2 clones Géraldine, un clone « new pediatric », un CC30 MRSA V). Trente cinq souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 34 autres souches possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC), 4 souches possédaient uniquement le gène codant l'entérotoxine P.

• Neuf cas de scarlatine staphylococcique ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 0 à 13 ans avec une médiane d'âge de 4.0 ans tandis que le sex ratio 3/2 est de 4/5. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infections cutanées, pharyngite, ostéite, arthrite), communautaires ou nosocomiales. Huit souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, une souche possède au moins un gène codant un superantigène (SEC). Une souche était résistante à la méticilline et appartenait au complexe clonal CC22 MRSA-IV.

#### Chocs toxiques staphylococciques et formes mineures



**Figure 3**- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2006 et 2013.

3.1.3.2 Détermination des 24 principaux « répertoires Vβ » du récepteur T des lymphocytes T pour le diagnostic des chocs toxiques staphylococciques et l'identification de la toxine superantigénique staphylococcique impliquée dans les tableau cliniques de choc

#### Objectifs:

- Diagnostic des chocs toxiques staphylococciques et streptococciques,
- Identification de la toxine superantigénique staphylococcique [SAg] impliquée dans le tableau clinique,
- Test d'orientation pour le diagnostic de la maladie de Kawasaki.

Principe et justifications : Staphylococcus aureus peut produire des exotoxines à propriétés immunologiques originales qualifiées de superantigéniques. Vingt-trois entités distinctes ont été identifiées dont les plus connues sont : la toxine du choc toxique staphylococcique [TSST-1], les entérotoxines A, B, etc. [SEA, SEB, etc.]. De part ces propriétés, les toxines superantigéniques staphylococciques [SAgs] stimulent jusqu'à 1/5 de la population lymphocytaire total, provoguant une réponse immuno inflammatoire exagérée, responsable du tableau de choc toxique<sup>2</sup> et induisent la prolifération des Ly T, dépendante des répertoires Vβ ciblés par l'exotoxine staphylococcique impliquée. Le CNR des Staphylocogues [CNR-Staph] a établi une correspondance entre les SAgs et leurs principaux répertoires Vβ cibles introduisant la notion de « signature Vβ »<sup>3</sup>. Depuis 2008, le CNR des staphylocoques a mis au point un test immunologique de diagnostic indirect par cytométrie de flux [CMF] de l'expansion des 24 principales sous populations lymphocytaires T (CD3<sup>+</sup>) exprimant des répertoires Vβ différents et contribuant au diagnostic des choc toxiques tant staphylococciques que streptococciques. Streptococcus pyogenes produit également des toxines superantigéniques : « Streptococcal pyrogenic exotoxin A, C », etc. [SPEA, SPEC] dont les propriétés immunologiques sont identiques mais dont les cibles VB diffèrent<sup>4</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Thomas D *et al.* Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chemical immunology and allergy. 2007;93:24-41.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Thomas D *et al. Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. Infect Immun. 2009;77(5):2043-50.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> De Marzi MC *et al.* Cloning, expression and interaction of human T-cell receptors with the bacterial superantigen SSA. Eur J Biochem. 2004;271(20):4075-83.

Type de prélèvement et méthodologie :

- A partir d'un prélèvement sanguin des patients datant de moins de 24h, isolement des cellules mononuclées du sang périphérique [PBMC].
- Détermination des « signatures  $V\beta$  » par CMF après marquage par une combinaison d'anticorps monoclonaux.
- Durée de l'analyse ≈ 4 heures
- Délai moyen de rendu : 24 / 48heures
- Coût : entièrement pris en charge par les financements CNR-Staph.

Résultats : Au cours de l'année 2013, le CNR-Staph a réalisé 11 analyses V $\beta$  concernant 11 patients. Ces déterminations concernaient 8 enfants (sexe ratio  $\partial/Q$  : 4/4 ; âge moyen : 4,1 ans) et 3 adultes (sexe ratio  $\partial/Q$  :1/2 ; âge moyen : 32,3 ans) hospitalisés au CHU de Lyon excepté pour 2 cas provenant du CHU de Genève, Suisse. Les principaux motifs de demande de cette analyse reposaient sur l'association d'une fièvre, d'une hypotension associée ou non à un choc et/ou une érythrodermie. Ils avaient pour but d'aider à affirmer ou à infirmer les diagnostics de chocs toxiques, qu'ils soient staphylococciques ou streptococciques ; ou de syndrome de Kawasaki. Dans 7 cas sur 11, cette analyse se révéla contributive, faisant ou aidant au diagnostic de certitude. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) résume les contextes et résultats obtenus.

Bien que 9/11 analyses  $V\beta$  proviennent de patients hospitalisés au CHU de Lyon, 2 déterminations ont été réalisés pour 2 patients adultes hospitalisés au CHU de Genève et dont le diagnostic étiologique du tableau clinique était confus, requérant l'aide du CNR des staphylocoques. Dans un cas, la suspicion de CTS-M a pu être confirmée grâce à cet examen tandis que l'autre patient dont le tableau clinique était peu évocateur, a permis d'infirmer cette hypothèse diagnostic.

Au cours de l'année 2013, seulement 2 analyses Vβ ont été réalisées dans le cadre de CTS-Ms : un cas présentait un bilan bactériologique négatif et la positivité de cet examen a permis l'affirmation du diagnostic clinique suspecté ; la seconde détermination était réalisée dans le cadre du suivi à 4 mois d'un cas de CTS-M dont l'expansion initiale mesurée avait été particulièrement élevée. Cette mesure montre une quasi normalisation des profils Vβ. A l'inverse, le nombre d'analyses Vβ dans le cadre de CTS-NM reste stable par rapport à 2012 (3 cas) avec 4 cas confirmés par ce test. De plus, probablement en raison du renouvellement du cytomètre de flux, dans 2 cas, les expansions correspondantes à 2 toxines superantigéniques ont été mesurées : TSST-1 + SEI; TSST-1 + SEC et confirmées par la détermination des profils toxiniques des souches de S. aureus isolées chez les patients correspondants. A noter que cette dernière souche était un S. aureus résistant à la méthicilline appartenant au clone Géraldine dont l'implication dans la survenu de choc toxique a été décrite<sup>5</sup>. Enfin. dans les 2 cas de CTS-NM restant. l'un retrouvait une expansion Vβ 2 cible de la TSST-1, et cette étiologie fut confirmée par le profil toxinique de la souche isolée du panaris du pouce, tandis que le second impliquait la SEB ou SEC, ces signatures étant redondantes entre les 2 toxines et aucune souche n'ayant été isolée. Dans un cas, l'analyse Vβ a permis la détection de la SpeA, toxine superantigénique streptococcique. Le diagnostic de CTStrepto a été ainsi confirmée, une souche ayant été isolée des hémocultures et d'un abcès de l'avant-bras de protéine M1 et possédant les gènes codant les toxines SpeA, SpeB, et SmeZ. Enfin, les 4 cas restants ne présentaient pas d'expansion clonale des répertoires Vβ et correspondaient aux diagnostics suivants : un cas correspondait à un enfant atteint de maladie de Kawasaki, pathologie dans laquelle des

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Durand G *et al.* Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. Journal of clinical microbiology. 2006;44(3):847-53.

expansions des répertoires Vβ peuvent être observés dans 1/3 des cas faisant suspecter une étiologie superantigénique sans que cette dernière soit systématique<sup>6</sup>; les 3 autres cas correspondaient à des chocs septiques : un cas correspondait à un choc septique sur SDRA et retrouvait un *S. aureus* dans les prélèvements respiratoires. Le second cas correspondait à un tableau de dermohypodermite sans documentation bactériologique. Le dernier correspondait à un choc septique consécutif à un adénophlegmon à *S. aureus* producteur de la leucocidine de Panton et Valentine.

Pathologie	Présence d'expansion(s) des répertoires « Vβ » du TCR des Ly T		Absence d'expansion(s) des répertoires « $V\beta$ » du TCR des Ly T		
diagnostiquée	Souche responsable isolée (nature)	Absence de souche isolée	Souche responsable isolée (nature)	Absence de souche isolée	Total
CTS-M	1 (S. aureus tst <sup>+</sup> )	1	1	1	2
CTS-NM	3* (S. aureus tst+ et/ou seb/sec+)	1	1	1	4
Syndrome de Kawasaki	/	/	1	1	1
CTStrepto	1 (S. pyogenes speA <sup>+</sup> )	/	/	1	1
Choc septique	I	/	<b>2</b> (S. aureus dont 1 pvl+)	1	3
Total	5	2	2	2	11

**Abréviations :** CTS-M : choc toxique staphylococcique menstruel ; CTS-NM : choc toxique staphylococcique non menstruel ; ; CTStrepto : choc toxique streptococcique.

**Tableau 2-** Contexte clinique et résultats obtenus par l'analyse des répertoires Vβ du TCR.

Conclusions et perspectives. Au total, le nombre d'analyse  $V\beta$  reste stable (environ 1 détermination par mois) avec une prescription de plus en plus ciblée, expliquant un taux de positivité élevée (8/11) et un apport diagnostic notoire. L'année 2013 voit apparaitre des demandes provenant de Suisse, témoin de la valeur de recours de ce test. Enfin, l'utilisation d'un cytomètre de flux de nouvelle génération semble accroitre la sensibilité des déterminations et a permis, pour la première fois, la détection des expansions induites par 2 toxines superantigéniques staphylococciques dans 2 cas de CTS-NM.

#### 3.1.3.3 Syndromes d'exfoliation staphylococciques

En 2013, le CNR a analysé 44 souches de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **17 cas de maladie exfoliante généralisée** et **27 cas d'impétigo bulleux** (Figure 4). On constate une légère recrudescence du nombre de cas recensés au CNR par rapport à l'année précédente.

Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

Actuellement, grâce à l'expertise du Dr Pascal Del Giudice avec qui nous collaborons depuis

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Brogan PA *et al.*T cell activation profiles in Kawasaki syndrome. Clin Exp Immunol. 2008;151(2):267-74.

2003, nous nous intéressons à ce qui correspond à une **forme mineure de la maladie exfoliante généralisée** caractérisée par un exanthème desquamatif du cou, des plis axillaires et périnéaux, associé à un syndrome fébrile et un impétigo facial. En 2013, nous avons observé 3 cas de formes mineures de maladie exfoliante généralisée. Nous allons poursuivre la surveillance de ce type particulier de syndrome d'exfoliation et colliger les cas afin de mieux caractériser cette infection tant sur le plan clinique que microbiologique. Cette meilleure connaissance des spécificités des staphylococcies cutanées a des implications sur la prise en charge des patients. En effet, les signes cutanés d'une forme mineure d'exfoliation peuvent se confondre avec une scarlatine staphylococcique, cette deuxième maladie ayant toujours un risque potentiel d'évolution vers le choc toxique staphylococcique ce qui n'est pas le cas de la première. Ces premières observations ont fait l'objet d'une publication<sup>7</sup>.

En 2013, pour les 14 cas pédiatriques, l'âge des patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique classique** s'étend de quelques jours à 15 ans avec une médiane de quelques jours tandis que le sex ratio  $\mathcal{E}/\mathcal{P}$  de ces patients est **7/7**. Dix souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), 3 souches l'ETA seule et une souche l'ETB seule. Trois cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes souffrant d'insuffisance rénale majeure. Les 3 souches possédaient le gène codant l'exfoliatine ETA. Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

En 2013, l'âge des patients ayant présenté un **impétigo bulleux** s'étend de quelques jours à 81 ans avec une médiane de 3 ans tandis que le *sex ratio* 3/2 de ces patients est 16/11. Dix-sept souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 7 souches l'ETA seule, 3 souches l'ETB seule. Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

#### Syndromes d'exfoliation staphylococciques Maladie exfoliante généralisée Impétigo bulleux localisé

**Figure 4**- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2006 et 2013.

Page **14** sur **79** 

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Courjon J *et al.* Skin Findings of *Staphylococcus aureus* Toxin-Mediated Infection in Relation to Toxin Encoding Genes. Pediatr Infect Dis J. 2013 Feb 26.

#### 3.1.3.4 Infections cutanées à S. aureus PVL+

Le CNR reçoit un nombre croissant de souches dans le cadre d'infections cutanées principalement dans deux contextes.

Tout d'abord des souches de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infections récidivantes ou nécessitant un drainage chirurgical voire dans un contexte de diffusion intra-familiale d'infections staphylococciques. Ces souches sont majoritairement sensibles à la méticilline.

Deuxièmement, des souches de *S. aureus* présentant un profil de résistance évocateur de SARM-C qui alerte le bactériologiste et l'incite à adresser la souche au CNR.

Ainsi en 2013, nous avons expertisé **368 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès) **hors épidémies**. La proportion de souches PVL+ est de 50.0% au total mais de **88.4% dans les infections primitives** (Figure 5).

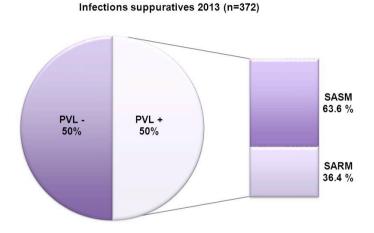
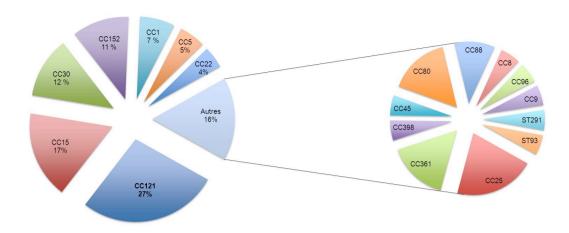


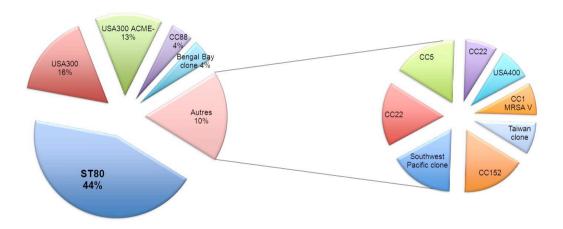
Figure 5- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2013.

#### Parmi les souches PVL+:

- il y a 63.6 % de SASM (Figure 5). Comme classiquement décrit, on note une plus grande diversité de clones de SASM PVL. Le clone majoritaire est le clone CC121 (Figure 6a).
- il y a 36.4 % de SARM (Figure 5). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés avec évidemment une majorité des clones diffusant actuellement en Europe et en Afrique du nord : le clone ST80 (agr3, PVL+, mecA+). Nous observons des cas d'infections avec le clone d'origine Nord américaine et à diffusion mondiale : le clone USA300 (agr1, PVL+, mecA+) et son variant ACME négatif (Figure 6b).



#### b. Caractéristiques des clones de SARM PVL responsables d'infections suppuratives en 2013.



**Figure 6**- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL responsables d'infections suppuratives en 2013 (hors épidémies).

#### 3.1.3.5 Furonculoses familiales

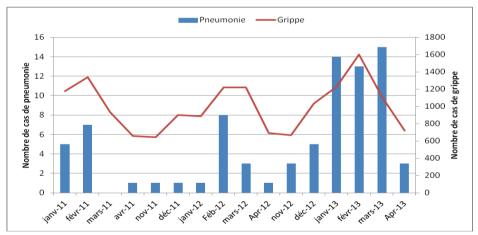
En 2013, en collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Daniel Floret, Pr Yves Gillet, Dr Laure Hees), **16 recherches directes** des gènes codant la PVL dans un contexte de furonculose familiale ont été effectuées à partir d'écouvillonnage de **sites de portage** (nez, gorge, périnée, anus) à l'hôpital femme/mère/enfant pour la détection des **porteurs** sains ou symptomatiques et vérifier l'efficacité de la **décontamination**. Nous suivons notamment ces souches concernant l'acquisition de résistance à la mupirocine et la chlorhexidine lors de protocoles de décontamination répétés.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, nous avons reçu 8 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. Le plus souvent ces cas se limitaient à des infections cutanées au sein des familles.

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

La pneumonie nécrosante n'étant pas pour le moment une maladie à déclaration obligatoire. il est possible que le nombre de cas réels soit sous-estimé. De la même facon, il est possible que nous ayons un biais de recrutement c'est-à-dire que seuls les cas graves ou avec un antibiogramme caractéristique du SARM-C diffusant actuellement en Europe et en Afrique du nord ne soient signalés et/ou adressés au CNR. Dans le but de mieux comprendre et donc prendre en charge cette pathologie, un PHRC a été lancé afin de répondre à plusieurs questions: (i) La PVL est-elle un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumopathies communautaires graves à S. aureus? (ii) Quels sont les facteurs (cliniques. biologiques, thérapeutiques) de pronostic favorable associés à la maladie? (iii) Quel est le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches de pneumonie nécrosante? (iv) Existe-t-il une susceptibilité génétique de l'hôte à l'origine de la rareté et de la sévérité de cette maladie? Afin de répondre à ces questions, ce projet de recherche comporte un volet observationnel et un volet immunogénétique. Tous les hôpitaux français ont été sollicités pour rapporter les cas définis comme une pneumonie communautaire sévère (nécessitant une hospitalisation en réanimation) à S. aureus producteur ou non de PVL. Entre Novembre **2010 et Décembre 2013**, **112** patients (sex ratio  $\Im/\Im$  58/54, de 1 mois à 82 ans) avant présenté une pneumonie communautaire grave ont été inclus.

Nous avons observé un parallélisme entre les pics de l'épidémie grippale et une augmentation de l'incidence des pneumonies communautaires à *S. aureus*, suggérant l'existence d'une relation entre l'infection virale et cette pneumonie. Cependant, ces résultats nécessitent une validation sur un plus grand nombre de sujets et sur d'autres saisons grippales (Figure 7).



**Figure 7**- Incidence des pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* au cours des épidémies grippales 2011-2013 (PHRC)

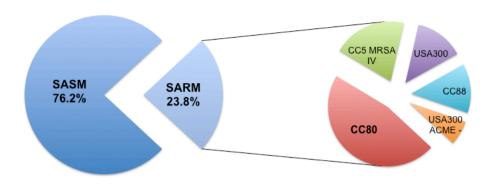
Les analyses réalisées sur les données cliniques disponibles de 70 patients (Tableau 3) ont montré que malgré une augmentation de l'âge médian des patients atteints d'une pneumopathie à *S. aureus* producteur de PVL (37.5 ans) par rapport à nos résultats en 2002 (14.8 ans), ces patients restent significativement plus jeunes que les patients PVL- (âge médian 58 ans). Les patients PVL+ présentaient plus souvent une diarrhée et des signes d'érythrodermie et d'expectorations purulentes à l'admission. Ils étaient également caractérisés par des taux plus élevés d'érythrodermie et de condensation unilatérale au

cours de l'hospitalisation. Les autres caractéristiques cliniques ou radiologiques n'étaient pas significativement différentes entre les pneumonies communautaires PVL+ et PVL-.

Médiane (25-75 percentile)         16         22         0,           Délais entre symptômes et hospitalisation (jours)         et hospitalisation (jours)         3(1-5)         0,           Médiane (25-75 percentile)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0,           Leucocytes à l'admission (X10°/L)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0,           Médiane (25-75 percentile)         16         15         0,           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission         Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0         0           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	)						
Nombre Hommes         16         22         0,           Délais entre symptômes et hospitalisation (jours)         2 (1-4)         3(1-5)         0,           Médiane (25-75 percentile)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0,           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,001						
Délais entre symptômes et hospitalisation (jours)         2 (1-4)         3(1-5)         0,           Médiane (25-75 percentile)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0,           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,							
hospitalisation (jours)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0, Médiane (25-75 percentile)           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0, Diarrhée           Furonculose         2         1         0, Eruption cutanée           Présence de signes clinques à l'admission         Fièvre         17         13         0, Diarrhée           Fièvre         17         13         0, Diarrhée         0         0         0           Toux productif         21         19         0, Diarrhée         12         11         0, Diarrhée	,03						
Médiane (25-75 percentile)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0, Médiane (25-75 percentile)           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0, Diarrhée           Diarrhée         8         6         0, Eruption cutanée         2         1         0, Diarrhée           Fièvre         17         13         0, Diarrhée         0 <td< td=""><td>,5</td></td<>	,5						
Leucocytes à l'admission (X109/L)         4,4 (2,7-15)         8,4 (4,7-15,6)         0,           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,							
Médiane (25-75 percentile)           Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,							
Présence de signes clinques avant l'admission           Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,3						
Syndrome pseudo-grippal         16         15         0,           Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,							
Diarrhée         8         6         0,           Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,							
Furonculose         2         1         0,           Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,4						
Eruption cutanée         4         2         0,           Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,5						
Présence de signes clinques à l'admission           Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,5						
Fièvre         17         13         0,           Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,4						
Diarrhée         6         0         0.           Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	Présence de signes clinques à l'admission						
Toux productif         21         19         0,           Hémoptysie         12         11         0,	,5						
Hémoptysie 12 11 0,	.02						
1-9	,4						
	,5						
Expectoration purulente 15 21 <u>0,</u>	,04						
Erythrodermie 8 0 <u>0</u> ,	,006						
Pneumothorax 3 0 0,	,2						
Présence de signes durant le séjour							
Fièvre 24 19 0,	,2						
Diarrhée 9 8 0,	,6						
Hémoptysie 18 15 0,	,5						
Erythrodermie 9 2 0,	,03						
Pneumothorax 6 1 0,	,06						
Signes radiologiques à l'admission							
Condensation unilatérale 15 8 0,	,2						
Condensation bilatérale 21 21 0,	,3						
Signes radiologiques durant le séjour							
Condensation unilatérale 15 6 0,	,02						
Condensation bilatérale 23 27 0,	,1						

**Tableau 3**- Caractéristiques des 70 cas avec les données cliniques et immunologiques disponibles entre **novembre 2010 et décembre 2013 (PHRC)**.

L'analyse de survie sur les 59 patients pour lesquels le statut vital était connu a montré que le taux de mortalité à 7 jours était significativement plus élevé parmi les patients PVL+ (31.6% vs 6.6% parmi les PVL-, p=0,009).



#### Pneumonies communautaires sévères PVL - novembre 2010-décembre 2013



**Figure 8**- Caractéristiques des souches de *S. aureus* responsables de pneumonies communautaires sévères entre novembre 2010 et décembre 2013 (PHRC).

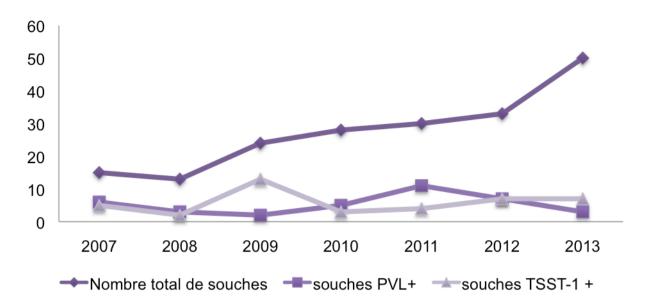
Les résultats préliminaires de la Figure 8 confirment la prévalence élevée de la résistance à la méticilline des souches PVL+ (23.8%). Ce chiffre justifie de notre point de vue la prise en compte du risque de SARM dans l'antibiothérapie probabiliste des pneumonies communautaires PVL+. On notera par ailleurs le chiffre de 16.4% de SARM dans les pneumonies communautaires PVL-. Bien évidemment ces chiffres sont à considérer avec réserve compte tenu de l'effectif et seront affinés au fur et à mesure du déroulement de ce PHRC. Ce PHRC est toujours en cours et l'analyse fine des données cliniques et immunologiques ne sera réalisée qu'ultérieurement.

#### 3.1.3.7 Intoxications alimentaires individuelles et collectives

En 2013, quatre suspicions de TIAC ont été signalées au CNR mais aucune entérotoxine n'a été détectée dans les échantillons reçus.

#### 3.1.3.8 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2007, nous avons expertisé 143 souches d'infections ostéo-articulaires (15 en 2007, 13 en 2008, 33 en 2012, 50 en 2013) (Figure 9).



**Figure 9**- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour infection ostéo-articulaires entre 2007 et 2013.

En 2013, nous avons reçu pour expertise **50 souches** de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire, les patients étant âgés de 1 mois à 88 ans (médiane d'âge 17.5 ans) avec un *sex ratio* ∂/♀de 40/10. Seules 5 souches sont des SARM (Figure 10).

Les tableaux cliniques sont très divers : ostéomyélites aigues de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèse,...Sept infections étaient liées à des souches productrices de la TSST-1. Trois infections étaient dues à des souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine, sensibles à la méticilline.

#### Infections ostéoarticulaires 2013 (n=50)

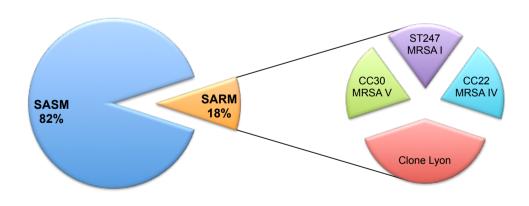


Figure 10- Caractéristiques des souches responsables d'infections ostéoarticulaires en 2013.

### 3.1.3.9 Diagnostic et suivi des formes sévères par approche immunologique : sérologies PVL et TSST-1

Le CNR dispose de deux techniques sérologiques de type ELISA pour l'aide au diagnostic et au suivi des pathologies associées à la leucocidine de Panton-Valentine (infections suppuratives sévères) et à la toxine du choc toxique staphylococcique (choc toxique

menstruel (MTSS) chez les femmes jeunes ne possédant pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine, et choc toxique non menstruel (NMTSS)). Au seuil de 4900 UA, un diagnostic rétrospectif d'infection à *S. aureus* PVL+ est possible avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 90%. Pour la TSST-1, un taux de 0 UA est retrouvé chez toutes les patientes ayant présenté un MTSS, contre seulement 5% des témoins (n=10/200), et 9,4% des femmes de 18 à 40 ans (n=5/53). Face à une clinique évocatrice, l'absence d'anticorps anti-TSST-1 est ainsi en faveur du diagnostic de MTSS.

Pour l'année 2013 : (i) 38 sérologies PVL ont été réalisées pour 22 hôpitaux différents, le taux de positivité (>4900 UA) était de 60.5% (n=23/38); et (ii) 38 sérologies TSST-1 ont été effectuées pour 19 hôpitaux différents. Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de MTSS dans 20 cas (52.6%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) dans 14 cas (36.8%). Quatre cas étaient insuffisamment documentés pour conclure sur le contexte de la demande. Les sérums en contexte de MTSS étaient séronégatifs pour TSST-1 dans 19 cas sur 20. Le cas séropositif correspondait à un MTSS suspecté mais non confirmé selon les critères du CDC. Cinq patientes ont bénéficié de prélèvements itératifs pour recherche de séroconversion; aucune augmentation d'anticorps n'a été observée, en accord avec l'hypothèse selon laquelle les patientes séronégatives ayant développé un MTSS sont séronégatives en raison d'une incapacité à développer tout anticorps neutralisants de la TSST-1. Les sérums en contexte de NMTSS étaient séronégatifs dans 5 cas sur 14 (35.7%). ce qui est en accord avec les observations précédentes montrant que la séronégativité n'est pas nécessaire au développement d'un NMTSS contrairement au MTSS. Quatre patients ont bénéficié de prélèvements itératifs, dont 1 patient a présenté une séroconversion, 1 patient est resté séronégatif, et 2 patients présentaient un taux d'anticorps élevé d'emblée (>2000 UA) sans augmentation par la suite, ce qui signe probablement un prélèvement trop tardif du sérum initial.

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

Au total **244 souches** ont été adressées spécifiquement au CNR pour une expertise sur la sensibilité aux antibiotiques.

#### **3.2.1** Résultats : distribution en fonction des critères pertinents

#### 3.2.1.1 Résistance aux bêta-lactamines

Le CNR a été spécifiquement sollicité pour des problèmes concernant la résistance aux bêta-lactamines pour **120 souches de** *S. aureus* dont 46 souches porteuses du gène *mec*A, 1 souche porteuse du gène *mec*C et 73 souches sensibles à la méticilline. Il s'agissait :

- de 52 souches exprimant de façon hétérogène la résistance à l'oxacilline d'où des discordances entre les résultats obtenus avec l'oxacilline, la céfoxitine et/ou le moxalactam, la détection de PLP2a, le test cefoxitin screen pour les utilisateurs du Vitek, ou la PCR geneXpert.
- de 30 souches de SARM sensibles à tous les autres antibiotiques antistaphylococciques pour lesquels le gène *mec*A ou le gène *mec*C pouvaient être impliqués : le gène *mec*A a été identifié 22 fois et le gène *mec*C une fois alors que 7 souches se sont révélées finalement sensibles à l'oxaxilline.
- de 11 souches résistantes à au moins un aminoside mais sensibles à l'oxacilline pour lesquelles l'absence de gène *mecA/mecC* a toujours été confirmée, indiquant qu'il s'agissait de souches ayant perdues la cassette SCC*mec* (SASM *mecA* "drop out")

- de souches présentant une résistance isolée aux fluoroquinolones ou à certaines combinaisons d'antibiotiques chez des souches sensibles à l'oxacilline phénotypiquement, certains systèmes experts déclenchant une alarme sur ces profils de résistance,

Par ailleurs une série de souches présentant des discordances pour les bêta-lactamines mais aussi pour autres familles antibiotiques sur la base des antibiogrammes réalisés localement par différentes méthodes ont conduit à nous adresser des souches de SARM et de SASM pour lesquelles le CNR a réalisé les vérifications et confirmations nécessaires.

#### 3.2.1.2 Détection de souches de S. aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides

La recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides a été effectuée pour **51 souches** de laboratoires extérieurs, l'envoi était justifié par des CMI de la vancomycine et/ou de teicoplanine > 2 mg/l selon les nouvelles recommandations du CA-SFM. **Vingt-deux souches ont été confirmées comme ayant une sensibilité diminuée aux glycopeptides**. Il s'agissait principalement de souches inductibles en présence de glycopeptides, 29 souches étaient sensibles aux glycopeptides après analyses de populations.

Il faut noter que parmi ces 51 souches de S. aureus :

- 19 souches ont été envoyées par des centres i) dont le système expert demandait une vérification de la CMI de la vancomycine en ETest pour des valeurs de 2 mg/L en microdilution, et ii) qui avaient obtenu des valeurs de CMI effectuée en ETest de 3 mg/L. Aucune des souches reçues dans ce contexte ne s'est révélée positive. Ces souches ne sont pas à considérer comme des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Ces données confirment que la technique ETest surestime légèrement les valeurs de CMI de la vancomycine (l'inoculum de 0.5McF n'est pas dilué au 1/10 comme conseillé par le CA-SFM et la lecture doit être effectuée à 24h plutôt qu'entre 18 et 24h).
- 6 souches de *S. aureus* ont été envoyées après un test positif de screening avec méthode "macro E-test" recommandée par le CA-SFM. Aucune des souches n'a été confirmée de sensibilité de diminuée aux glycopeptides par le CNR. Il est à noter que certains réactifs (agar cœur-cervelle) nécessaires pour les tests de screening peuvent conduire à surestimer la résistance et induire ainsi des faux positifs.
- 4 souches de *S. aureus* (isolées chez deux patients) envoyées pour expertise de la résistance à la daptomycine ont été également expertisées pour la sensibilité diminuée aux glycopeptides. L'analyse de population a confirmé la résistance aux glycopeptides ce qui renforce la notion de résistance croisée entre les glycopeptides et la daptomycine.

Par ailleurs, **au sein des Hospices Civils de Lyon**, la détection de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides est effectuée systématiquement sur les souches de SARM de mucoviscidose, **9** souches ont été confirmées de sensibilité diminuée au glycopeptides, souches isolées chez des enfants connus précédemment comme porteurs de GISA.

#### 3.2.1.3 Détection de la résistance au linézolide

Le linézolide constitue une alternative thérapeutique à l'utilisation des glycopeptides pour le traitement des infections à SARM. La prévalence de la résistance a toujours été faible en France mais l'augmentation croissante de son utilisation insiste à surveiller le niveau de sensibilité à cet antibiotique. Le CNR a reçu en 2013 pour confirmation de la résistance au linézolide, **34 souches** de staphylocoques.

Seules deux souches appartenaient à l'espèce S. aureus. Ces souches ont été isolées chez

deux patients du CHU de Brest présentant une mucoviscidose. Les souches ne portaient pas le gène *cfr* (résistance enzymatique) mais présentaient une mutation sur le gène codant de l'ARN ribosomal 23S en position 2576 (transversion G/T), connue pour conférée une résistance de bas niveau au linézolide (par perte d'affinité).

Les 32 autres souches étaient des staphylocoques à coagulase négative. Une mutation sur le gène codant l'ARN23S a été détectée chez l'ensemble de ces souches. La mutation en position 2576 avec transition G/T a été détectée chez 12 souches : 7 souches appartenant à l'espèce *S. epidermidis* et 3 souches à l'espèce *S. hominis*. Deux souches de *S. capitis* linézolide résistantes isolées à Bayonne présentaient une double mutation dans le gène de l'ARNr 23S : position 2576 avec transition G/T et position 2319 avec transition T/C. Les vingt autres souches appartenaient à l'espèce *S. epidermidis*, portaient toutes une mutation en position 2504 de l'ARN ribosomal 23S avec transversion T/A, décrite jusque là de façon exceptionnelle (une souche en Grèce, une souche au USA). Les 20 souches isolées dans différents hôpitaux français (Nîmes, Lyon, Toulouse, Dijon) présentaient toutes un profil de champs pulsé identique démontrant la diffusion clonale de cette souche sur une très large zone géographique. (voir ci-dessous dans le chapitre "Alerte").

#### 3.2.1.4 Détection de la résistance à la daptomycine

Le CNR a reçu pour confirmation de la résistance à la daptomycine 3 souches de *S. aureus* au cours de l'année 2013. Les trois souches ont été confirmées comme résistantes. Pour une des souches, le séquençage du gène *mpr*F a mis en évidence la mutation T345l précédemment décrite par Friedman et al (Antimicrob Agents Chemother. 2006 June; 50(6): 2137–2145) comme associée à la résistance à la daptomycine.

#### 3.2.1.5 Etude de la sensibilité à la ceftaroline

La ceftaroline (CPT) est une nouvelle céphalosporine présentant un spectre d'activité original incluant les souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline. Elle a été récemment commercialisée (Mars 2013). La concentration critique retenue a été fixée à 1 mg/L. En revanche le CA-SFM n'a pas proposé de diamètre critique et l'EUCAST a retenu un diamètre critique de 20 mm avec un inoculum à 0.5 McF et un disque chargé à 30 mg. Néanmoins les données sont limitées concernant à la fois ce diamètre critique et le niveau de sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* à la CPT en France.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de mettre en place un observatoire du niveau de sensibilité à cette nouvelle molécule. Une collection comportant 180 souches de *Staphylococcus aureus* adressées au CNR des staphylocoques entre Avril 2013 et Juin 2013 pour expertise, ainsi que 35 souches de SARM porteuses du gène *mec*C a été étudiée. Pour chacune des souches, ont été effectuées: i) une mesure de la CMI CPT par bandelette sur MH à 0.5 McF, ii) une évaluation du diamètre d'inhibition autour d'un disque de CPT sur MH à 0.5 McF (recommandations EUCAST), iii) une PCR *mecA/mec*C afin de confirmer le profil de sensibilité à la méticilline.

Au total 127 SASM, 53 SARM mecA+ et 35 SARM mecC+ ont été testées. Les CMI CPT étaient comprises entre 0.125 et 0.5 mg/L pour les SASM, 0.5 et 2 mg/L pour les SARM mecA+, et 0.125 et 0.5 pour les SARM mecC+. Sur la base des distributions observées, les SASM et plus encore les SARM mecC+ apparaissent plus sensibles que les SARM mecA+. Seules deux souches de SARM mecA+ (3.7%) ont présenté une CMI>1 mg/L et ont donc été considérées comme résistantes à la CPT. Il est à noter que ces deux souches (ST239 et ST247) appartiennent à des clones rares en France et présentaient toutes les deux une

sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Les comparaisons CMI/diamètre ont permis de mettre en évidence un défaut de corrélation pour les SARM *mec*A+. Alors que l'ensemble des SASM et SARM *mec*C+ étaient correctement détectés sensibles à la CPT (CMI<1mg/L) sur la base du diamètre d'inhibition du disque CPT (≥ 20 mm), 37% (19/51) des SARM *mec*A+ avec CMI<sub>CFT</sub> <1 mg/L présentaient un diamètre <20 mm qui aurait conduit à les classer comme résistant à la CPT. Enfin les deux souches de SARM *mec*A+ avec des CMI>1mg/L étaient correctement détectés "résistant" avec le disque de CPT (14 et 16 mm).

Seules 2 souches de SARM sont apparues résistantes à la CPT avec des CMI discrètement augmentée (2 mg/L). Les souches de SASM et de SARM *mec*C+ se révèlent plus sensibles à la CPT que les SARM *mec*A+. En routine au laboratoire, il semble que la méthode des disques avec un inoculum à 0.5 McF (sans dilution ultérieure, recommandations EUCAST) surestime le niveau de résistance et qu'il faille donc privilégier la mesure des CMI par bandelette ou au moins vérifier en CMI bandelette tout résultat CPT résistant obtenu en disque avant de le rendre aux cliniciens.

#### 3.3 Participation aux réseaux de surveillance

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

#### Se reporter au chapitre « Alerte »

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

Le CNR des staphylocoques a su établir des interactions fortes avec de nombreux réseaux de laboratoires qu'il s'agisse de laboratoires hospitaliers ou privés et nationaux ou internationaux. 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 initiés et gérés par le CNR lui même.

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

#### 3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

#### PHRC « Pneumopathie nécrosante »

### Type de collaboration : CNR - CHU et CHG Français dans le cadre d'un PHRC coordonné par le Pr François Vandenesch

L'objectif principal de ce PHRC est de confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité indépendant des pneumonies à *S. aureus* en comparant un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* PVL+ avec un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* ne produisant pas la PVL.

Les objectifs secondaires sont de :

- comparer les groupes de patients atteints de pneumopathies sévères à *S. aureus* PVL + avec évolution favorable et le groupe avec évolution défavorable (décès attribuable selon le médecin investigateur) afin d'identifier les facteurs associés au bon pronostic. Il s'agit d'étudier notamment les effets des différents traitements antibiotiques utilisés (antibiotiques à activité anti-toxinique *versus* sans activité anti-toxinique, délai d'administration) et des immunoglobulines polyvalentes.
- étudier la proportion de SARM parmi les souches de *S. aureus* PVL + et étudier la distribution clonale des souches SARM et non SARM.
- évaluer l'état immunitaire du patient vis-à-vis de la PVL au moment de la maladie : un prélèvement de sérum pour recherche d'anticorps anti-PVL sera réalisé à l'inclusion de tous les patients. Ces tests sont réalisés dans le cadre de la prise en charge habituelle des patients.

Grâce au volet immunogénétique de ce projet de cohorte, nous prévoyons de rechercher une prédisposition génétique de type Mendélienne conduisant à une dysfonction de l'immunité innée. Ceci s'oppose aux prédispositions complexes détectées par des « single nucleotid polymorphisms » et nécessitant l'analyse de grandes séries de patients. La stratégie générale suivra celle qui a permis au laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses à la faculté Necker à Paris (GHMI-INSERM-U550) de découvrir les mutations impliquées dans la susceptibilité Mendélienne à développer des infections mycobactériennes disséminées, les infections invasives à pneumocoque, et plus récemment dans les encéphalites herpétiques<sup>8,9</sup> (Annexe 3).

Ce PHRC doit couvrir la période Septembre 2011 – Juin 2014. Les données disponibles pour 2013 sont présentées au paragraphe 3.1.3.6.

#### Protocole « Dermatologie Fréjus » en partenariat avec le service d'Infectiologie-Dermatologie du centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus Saint-Raphaël.

L'objectif de ce travail est de décrire les caractéristiques cliniques, épidémiologiques et bactériologiques (toxiniques) des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*. Il repose sur l'étude d'une cohorte prospective d'infections cutanées prises en charge au centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus Saint-Raphaël au sein du service du Dr Pascal Del

<sup>9</sup> von Bernuth H. *et al.* Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. Science. 2008; 321 (5889): 691-6.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Bustamante J. *et al.* Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. Current Opinion in Immunology. 2008; 20: 39-48.

Giudice.

**Depuis 2003**, en lien avec le Dr Pascal Del Giudice en charge du service de Dermatologie au centre Hospitalier Intercommunal de Fréjus Saint-Raphaël, une étude prospective a été mise en place afin de mieux caractériser les infections cutanées à *S. aureus* tant sur le plan diagnostic clinique grâce à l'expertise acquise dans ce service que sur le plan virulence (toxines et résistance) avec l'expertise du CNR. Entre 2003 et 2013, nous avons reçu **650 souches** de *S. aureus*. Cette collaboration a conduit à plusieurs **publications originales**.

La première publication 10 a permis décrire l'apparition de deux populations de SARM avec des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques distinctes, isolées chez des patients présentant des infections cutanées communautaires. De Novembre 1999 à décembre 2003, dans un hôpital français, une étude prospective épidémiologique, clinique et bactériologique a été menée pour étudier les infections cutanées acquises dans la communauté. Cent quatre-vingt-dix-sept patients ont présenté 207 infections cutanées (154 primitives et 53 surinfections). Vingt-deux patients (11 %) avaient des infections à SARM. L'incidence des infections cutanées dues aux SARM-C est passée de 4 % en 2000 à 17 % en 2003 (non significatif). Six patients (3 %) ont été infectés par SARM-C et 15 (8 %) par SARM-H; un patient a été perdu pour le suivi et ne pouvait pas être classifié. Les SARM-C et les SARM-H avaient des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques différentes. Les infections dues aux SARM-C étaient plus sévères que les infections dues aux SARM-H, elles ont toutes nécessité un drainage chirurgical contre seulement 2 sur 13 pour les infections dues aux SARM-H (p < 0.001). Tous les SARM-C appartiennent au même clone, agr 3. PVL+ (gènes non détectés dans les SARM-H) et possèdent un antibiotype spécifique. Donc il existe une distinction claire dans la communauté entre les souches de SARM-C et de SARM-H responsables d'infections cutanées acquises dans la communauté. Cette collaboration a également permis de démontrer l'association entre la production de

Le rôle de la PVL dans les infections de la peau et des tissus mous étant controversé, notre but était de déterminer la prévalence des gènes codant la PVL dans les souches de *S. aureus* isolées d'abcès primaires et secondaires. Une étude prospective a été conduite de juillet 2003 à juin 2008. Sont considérés comme primaires, les abcès survenus sur peau précédemment saine et secondaire dans tous les autres cas. Cinquante-sept patients ont été inclus dans l'étude. Les gènes de la PVL ont été détectés dans 40 cas (70%). Trente-huit des 41 abcès primaires possèdent les gènes codant la PVL contre seulement 2 des 16 abcès secondaires (12.5 %) (p < 0.001).

PVL et la survenue d'abcès primitifs<sup>11</sup>.

Grâce à cette étude réalisée en service de dermatologie, nous avons rapporté la **première observation en France d'infection autochtone**, c'est-à-dire acquise localement, due au **clone USA 300**, actuellement responsable d'une situation épidémique aux États-Unis, où il est à l'origine de la majorité des infections cutanées à *S. aureus*<sup>12</sup>.

De plus, cette cohorte de patients de dermatologie, nous a permis de décrire précisément (grâce à l'expertise dermatologique) la **clinique des infections cutanées associées au clone communautaire ST80**<sup>13</sup>. De novembre 1999 à octobre 2009, 20 patients ont présenté

<sup>10</sup> Del Giudice P et al. Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. Br J Dermatol. 2006 Jan;154(1):118-24.

<sup>11</sup> Del Giudice P et al. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. Dermatology. 2009;219(4):299-302.

Del Giudice P et al. A case of indigenous skin infection caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 in France. Ann Dermatol Venereol. 2009 Jun-Jul;136(6-7):541-2

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Del Giudice P et al. Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 Feb;25(2):164-9.

une infection cutané avec un SARM-C ST80 (âge médian 28 ans, médiane 27; de 1 à 66 ans). Les 20 patients avaient les manifestations suivantes : 19 abcès primitifs (18 abcès unique et un patient avec deux), 8 furoncles, 4 folliculites, un cas de cellulite, une plaie et un panaris. Tous les abcès primitifs ont nécessité un drainage chirurgical. La majorité des infections étaient à proximité du périnée (50 %). Il n'y a pas eu de diffusion intrafamiliale. Malgré des mesures d'hygiène strictes, des antibiotiques systémiques et de la mupirocine par voie nasale, quatre patients (20 %) avaient des infections cutanées récurrentes sur une période allant de quelques mois à 6 ans.

Enfin, nous avons montré l'association entre les souches de *S. aureus* productrices de la leucocidine de Panton Valentine et les infections cutanées folliculaires<sup>14</sup>.

Nous avons étudié le taux de *S. aureus* PVL+ dans différents types d'infections cutanées et nous avons comparé les infections cutanées folliculaires aux infections non folliculaires. Du 1 juillet 2003 au 30 juin 2010, 229 infections cutanées ont été incluses : 97 (42.5 %) étaient dues à des souches PVL+. Trente-neuf des 53 infections folliculaires (74 %) [8 des 17 (47 %) cas de folliculites, 30 des 35 (85.5 %) cas de furoncles et 1 cas d'anthrax (100 %)] ont été causés par un *S. aureus* PVL+, comparé à 16 des 131 infections non folliculaires (12 %) (p < 0.001).

### Projet « SARMRISK : Prévalence, exposition au travail, risques sanitaires liés aux souches de SARM *mec*C+ »

#### Collaboration: CNR des staphylocoques, Lyon, France – ANSES Lyon

L'origine bovine des souches de SARM présentant le gène mecC est aujourd'hui retenue car les souches bovines et humaines sont co-localisées géographiquement, et bon nombre des souches humaines appartiennent à des clones ou complexes clonaux exclusivement décrits jusqu'ici chez l'animal (CC130, par exemple) (Garcia-Alvares, Lancet ID 2011). Les données épidémiologiques concernant ces souches sont encore très fragmentaires, tant dans la population humaine qu'animale, et leur caractérisation moléculaire, leur spécificité d'hôte ainsi que leur potentiel pathogénique et épidémique restent à explorer. Entre juin et décembre 2011, les travaux initiés conjointement chez l'Homme et l'animal par le Centre National de Référence des Staphylocoques et l'unité AVB de l'Anses de Lyon ont permis d'isoler les toutes premières souches humaines et animales présentant le gène mecC en France (RICAI 2011, communication orale; Laurent, EID 2012). Très récemment, un travail exploratoire conduit par ces deux laboratoires a permis dans certaines des exploitations ayant présenté des infections à SARM mecC+ de démontrer la persistance de la souche au sein du cheptel. Cependant, de nombreuses questions restent encore ouvertes: Quel est le niveau actuel de dissémination de ces souches et leur prévalence chez l'animal et chez l'Homme ? Quelles populations sont exposées ? Quel est le risque de colonisation et d'infection des populations en fonction de leur niveau d'exposition et de contacts directs avec les animaux ou indirect avec les exploitants au contact des animaux ? Quel est le niveau de transmission inter-animale, animal-homme, inter-humaine?

Dans le cadre du projet **SARMRISK**, le CNR des staphylocoques et l'ANSES conduisent actuellement un travail exploratoire sur ces axes thématiques en réalisant la première étude au niveau national qui devrait permettre de répondre à ces différentes questions et de fournir des données de base qui pourront servir de référence (Temps 0) dans les années à venir pour suivre la dynamique de ce nouveau mécanisme de résistance. L'objectif est d'évaluer la prévalence des souches de SARM mecC+, le risque de diffusion dans la communauté ainsi que le risque de transmission professionnel chez les éleveurs (versus la population

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Del Giudice P et al. Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Are Associated with Follicular Skin Infections. Dermatology. 2011 Feb 22.

générale) au regard de la transmission animal-Homme de ces nouvelles souches de SARM. Ces données pourront être mises à la disposition de l'INVS, des groupes d'expertise concernés par la transmission animal-Homme de l'antibiorésistance d'un pathogène majeur, en particulier dans le cadre des travaux de l'ANSES ou des mesures à prendre au sein du plan EcoAntibio2017.

Dans ce contexte, l'objectif des études en cours est :

- de rechercher et de documenter la distribution des souches de SARM portant le gène mecC en France (i) chez les animaux de rentes en élevage (bovins, ovins, caprins), iii) chez des populations exposées (éleveurs, personnels des exploitations, vétérinaires, personnels des abattoirs) (iii) en milieu hospitalier et (iv) dans la population générale via les différents réseaux de surveillance notamment à travers les souches reçues par le CNR, par l'ANSES Et au travers du réseau ResaPath (qui compte plus de 65 laboratoires vétérinaires départementaux)
- de comparer la prévalence des ces souches dans les différents sous-groupes de populations afin d'estimer les niveaux et les types d'exposition de la population à ces souches, d'évaluer les facteurs de risque associés à la colonisation et/ou l'infection,
- de caractériser les souches isolées au plan moléculaire, d'identifier leur diversité clonale, de cribler leur facteur de virulence, et de comparer les souches animales et les souches humaines.

En outre, à partir des prélèvements humains et animaux qui sont réalisés dans le cadre du projet SARMRISK, l'utilisation de milieux sélectif de cultures ciblant l'espèce *S. aureus* (milieu ChromID *S. aureus*, bioMérieux) et le caractère méticillino-résistant des souches (mileu ChromID™ MRSA, bioMérieux) permettra de recueillir l'ensemble des souches de *S. aureus* et l'ensemble des SARM incluant bien sûr les souches portant le gène *mec*C (objectif principal) mais aussi les souches *mec*A+ appartenant au CC398. Cette approche large permet de constituer une large collection de souches de *S. aureus* d'origine animal et de disposer de données (prévalence, caractérisation des souches, niveau de résistance, populations exposés, niveau de risques professionnels) concernant le clone SARM CC398 qui sont peu ou pas disponibles à ce jour en France.

#### 4 Alerte

## 4.1 La procédure d'alerte de l'InVS 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 l'InVS. L'émergence de tout phénomène anormal dans les domaines cliniques (formes cliniques atypiques), épidémiologiques (cas groupés : épidémie d'infections avec le clone de SARM-C USA300, épidémie d'infections à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement) ou microbiologiques (détection de nouveaux clones, augmentation de prévalence de certains clones) a fait l'objet d'une information auprès de nos correspondants de l'InVS par contacts téléphoniques directs ou par mail. Dès la détection de tout phénomène anormal, un contact par mail ou téléphonique est immédiatement établi avec nos correspondants de l'InVS avec une mise en place d'une cellule d'aide à la décision à laquelle peuvent participer selon les situations l'ARS, la Cire, l'InVS – DMI (Département des maladies infectieuses), le CNR, l'Arlin/CClin et les EOH, des cliniciens locaux (infectiologues, biologistes, pédiatres, dermatologues, gériatres,...).

L'organisation conjointe CNR-InVS du colloque biennal SympoStaph constitue aussi une illustration des interactions étroites qui existent entre les deux partenaires autour de la thématique des infections staphylococciques. Ce colloque aura lieu les 20 et 21 octobre

#### 2014.

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

Les objectifs de la collaboration entre le CNR des staphylocoques et l'InVS sont donc :

- (i) de surveiller et de suivre les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches de SASM et de SARM circulants en France.
- (ii) d'alerter l'InVS sur l'apparition de possibles cas groupés à partir des informations transmises au CNR et/ou des souches qui lui sont adressées,
- (iii) de détecter l'apparition de nouveaux clones présentant des facteurs de virulence ou des résistances aux antibiotiques particuliers,
- (iv) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones de SARM communautaires,
- (v) de participer, en cas de décision positive de l'HAS, à la mise en place et au suivie de la DO des pneumopathies nécrosantes (voir chapitre programme d'activité N+1, N+2)
- (vi) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones animaux de SARM chez l'animal et leur diffusion chez l'homme.

#### 4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Brève description des événements détectés et investigués en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise...)

#### **4.2.1** Clusters d'infections à SARM Co USA300

Le CNR en collaboration avec l'InVS a participé à l'investigation de cas groupés d'infections cutanées à SARM Co USA 300 en France

A ce jour, 3 clusters d'infections à SARM Co USA 300 ont été rapportés en France.

#### Auvergne, crèche familiale, juin 2011 - mai 2013 :

Identification de 13 cas avec des infections cutanées récidivantes survenues entre juin 2011 et mai 2013. Il s'agissait de 5 enfants gardés dans une même crèche familiale et de leurs parents. Les lésions cutanées étaient des abcès ou des folliculites. Une consultation aux urgences ou une hospitalisation a été nécessaire pour 3 enfants. Il n'y a pas eu de complication systémique. Le CNR des Staphylocoques identifie des souches appartenant au même clone USA 300 ST8-MRSA-IV producteur de leucocidine de Panton Valentine [PVL+/ACME+]. Lors de l'identification de l'épidémie en mai 2012 outre une recherche de portage, une décontamination (mupirocine 5j + chlorhexidine 5j + gargarisme 5j pour les adultes) a été proposé à tous les cas. Cinq mois plus tard 2 enfants présentaient toujours des folliculites et la nourrice un abcès. Une décontamination prolongée de 3 semaines et un traitement systémique en cas de lésion cutanée avec une surveillance du portage sont proposés. Dans le même temps en raison de l'infection de la nourrice la crèche est fermée, un bio-nettoyage était alors réalisé. Pour deux personnes de la même famille (une mère et son fils) malgré la décontamination un portage persiste et la souche isolée présente une résistance à la mupirocine. En 2013 le suivi clinique identifiait 3 enfants et 2 adultes avec des lésions cutanées récidivantes. Un nouveau-né dans une famille sera porteur un mois

après sa naissance avec la survenue de folliculites. Aucune des familles concernées n'était dans une situation socio-économique précaire, toutes ont mis en place des mesures d'hygiène pour éradiquer un éventuel réservoir environnemental. Dès l'identification de l'épidémie l'usage de solution hydroalcoolique a été généralisé à la crèche familiale. A noter qu'aucun lien n'a pu être retrouvé avec une région ou un pays à forte prévalence de SARMco PVL+.

#### lle de France, établissement de santé, juin 2012 - avril 2013

Huit cas d'infections à SARM PVL ont été identifiés entre décembre 2012 et mars 2013 chez des patients hospitalisés en soins de suite et réadaptation (SSR1) de gériatrie dans un établissement de santé situé en lle de France. Une recherche active autour de ces cas a conduit à l'identification de deux cas parmi les soignants (1 infecté et 1 colonisé) et de cinq autres patients colonisés. Une recherche rétrospective de cas menée par le laboratoire de microbiologie a permis l'identification de 8 cas supplémentaires (un cas infecté, 7 cas colonisés) survenus entre juin et septembre 2012 dans un autre service du même établissement. Le CNR des Staphylocogues a confirmé que les souches appartenaient au même clone USA300 ST8-MRSA-IV [PVL+/ACME+]. Associé à la mise en place des précautions complémentaires contact (PCC) ont été notamment mis en place : un dépistage des patients de l'unité (nez. pharynx, périnée) et proposition de dépistage aux personnels du service sur la base du volontariat, un regroupement des patients porteurs dans un secteur avec personnel paramédical dédié, organisation des soins selon le principe de la « marche en avant » pour les personnels transversaux, arrêt des transferts des patients colonisés ou infectés, arrêt des admissions dans l'unité, port du masque, bionettoyage renforcé de l'unité, décolonisation des patients et personnels colonisés (mupirocine nasale, bains de bouche biquotidiens et douche à la chlorhexidine pendant 5 jours), vérification de la négativation des prélèvements à 5 et 10 jours après la fin du protocole de décolonisation, renouvellement du protocole de décolonisation en cas de persistance du portage. Il a été noté une persistance de la colonisation chez 2 patients et 1 soignant après la décolonisation. Suite à la mise en place de ces mesures, aucun nouveau cas d'infection n'a été rapporté<sup>15</sup>.

#### lle de France, Maison d'accueil spécialisée (MAS), Juillet 2013 - février 2014

Quatre cas confirmés par le CNR de SARM USA 300-MRSA [PVL+/ACME+] ont été identifiés dans une MAS accueillant des adultes poly-handicapés située en lle de France entre les mois de juillet 2013 et février 2014. Un cas a été retenu comme infecté (prélèvement d'abcès). Les 3 autres cas ont été retenus comme porteurs (prélèvements d'escarre ou d'aisselles/aine) mais avaient tous les trois eu des signes d'infections (abcès ou furoncles) qui n'avaient cependant pas été prélevés. Les quatre cas résident dans deux unités situées sur le même étage de la MAS.

Lors de l'identification des deux premiers cas de la MAS (cas de juillet 2013), il avait été mis en place la décolonisation des deux cas, mais l'absence de dépistage parmi les autres pensionnaires en l'absence de lésions cutanées suspectes et un renforcement des mesures d'hygiène, couverture systématique de toute plaie. Avec l'identification des deux cas supplémentaires, une cellule d'aide à la décision réunissant le médecin coordonnateur et la directrice de l'établissement, des représentants de l'Arlin lle de France, du CClin Paris-Nord, de l'ARS, du CNR et de l'InVS et un infectiologue référent a été mise en place. Afin de faire un état des lieux de la diffusion de la souche, il a été décidé le dépistage (nez, pharynx,

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Fournier S. Épidémie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) exprimant la leucocidine de Panton Valentine dans un service de soins de suite et de réadaptation. La lettre du signalement des infections nosocomiales n°9 / Décembre 2013 (http://www.invs.sante.fr/esin)

périnée) des personnes appartenant au premier cercle défini comme les résidents et personnels de la MAS. Cette cellule se réunira à réception des résultats de dépistage pour statuer sur les mesures complémentaires à mettre en œuvre. L'investigation est en cours à la date de rédaction.

#### 4.2.2 Epidémie d'infections cutanées à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement

Le CNR a participé à l'investigation de cas groupés d'infections cutanées au sein d'un foyer d'hébergement. En décembre 2013, l'ARS lle de France a informé l'Arlin de l'existence d'une épidémie d'infections cutanées à type de furoncles et/ou d'abcès touchant depuis 2008 les résidants d'un foyer d'hébergement avec une recrudescence récente du nombre de cas.

Depuis 2008, des résidants du foyer présentent des lésions cutanées, dont certains ont présenté plusieurs épisodes ayant nécessité des hospitalisations pour mise à plat d'abcès. Depuis cet été, le médecin généraliste, en charge de certains de ces résidents avait constaté une recrudescence des cas d'infections cutanées au sein du foyer. Les souches expertisées par le CNR étaient sensibles à la méticilline et possédaient les gènes codant les entérotoxines A, H, K, Q et la leucocidine de Panton Valentine. Elle appartient au complexe clonal CC1. Du fait de la notion de foyer fermé une décontamination de l'ensemble des résidents sans dépistage préalable associés à un nettoyage renforcé de l'environnement et du linge a été préconisée. Il n'y a pas de nouveau cas rapporté à ce jour.

#### 4.2.3 Cas groupés de choc menstruels

En mars 2013, le service de réanimation pédiatrique de Nantes a alerté l'Agence régionale de santé des Pays de la Loire, de la survenue très rapprochée dans le temps, de deux cas de syndrome de choc toxique (SCT), chez deux jeunes filles, attribués à l'utilisation de tampons périodiques. L'ARS a saisi la Cire des Pays de la Loire pour une aide à la caractérisation de ce signal sanitaire. Les deux cas ont été confirmés par le CNR. Il s'agissait de souches productrices de la toxine du choc toxique staphylococcique appartenant au complexe clonal CC30 qui est le clone majoritaire diffusant en France et responsable de choc toxique staphylococcique. Une recherche active d'autres cas, définis par la survenu d'un syndrome de choc septique ou toxique, a été effectuée dans la région, depuis le 1er janvier 2013, auprès des services de réanimation adulte et pédiatrique du CHU de Nantes, du Centre anti-poison (CAP-TV) d'Angers et du CNR des staphylocoques. D'autres sources de données ont été explorées telles que les résumés de passages aux urgences (RPU) au niveau de la région avec le code CIM-10 A483 correspondant au syndrome de choc toxique. Une investigation exploratoire à l'aide d'un guestionnaire standardisé a été menée. Les données cliniques, épidémiologiques et microbiologiques recueillies suite au signalement de deux cas de SCT chez deux jeunes filles, sont en faveur de deux cas confirmés (l'un par la clinique et l'autre par la bactériologie) de choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle, sans lien décrit entre les deux cas et attribués à une mauvaise utilisation de tampons vaginaux. Les mesures prises sont (i) mise en "alerte" du CNR des staphylocoques (Lyon) suite à ce signalement. Le CNR informera l'InVS (sur BAL NOA-signalement) en présence d'une augmentation de signalements de cas de SCT d'origine menstruelle, (ii) une sensibilisation des services de réanimation, par l'envoi d'une note de synthèse sur ces cas groupés, pourra être effectuée en encourageant le signalement des SCT à staphylocoque au CNR des staphylocoques pour une aide au diagnostic et au suivi de la prise en charge, (iii) une information a été portée auprès des médecins de l'éducation nationale par l'ARS afin de sensibiliser les infirmières scolaires sur ce sujet. De la même façon, des recommandations auprès des gynécologues et médecins généralistes est à envisager.

Le CNR a participé à la communication autour de ces cas lors des journées régionales de veille sanitaire des Pays de la Loire et contribue à la rédaction d'un document pour le BEH rappelant dans le cadre des chocs toxiques staphylococciques mentruels, l'épidémiologie française des souches de *S. aureus* responsable de choc menstruel, les critères de diagnostic et le bon usage des tampons hygiéniques.

#### 4.2.4 Recherche de lien de clonalité

Vingt-quatre demandes (19 + 5 épidémies en bleu) de recherche de lien de clonalité concernant (64 + souches épidémies en bleu) souches de *S. aureus* (SARM ou SASM) mais également des souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN) ont été adressées au CNR en 2013. Il pouvait s'agir de plusieurs souches isolées chez un même patient, de souches isolées lors de cas groupés ou d'une augmentation non négligeable du nombre d'infections au sein d'un même service ou hôpital, de souches isolées lors d'un accident transfusionnel.

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour évaluer le lien de clonalité existant entre ces souches de staphylocoques : détermination du fond génétique par détermination de l'allèle agr ou détermination de l'appartenance à un complexe clonal (CC) au moyen de puces à ADN mettant en évidence le profil des gènes d'espèces, de virulence, de résistance, détermination du pulsotype ou profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé. Pour les souches appartenant au clone USA300 responsables des épidémies des épidémies/cas groupés décrits au chapitre 4.2.1, une approche par séquençage génomique complet est actuellement en cours (collaboration Ph Glaser, Institut pasteur) afin d'analyser l'histoire évolutive du clone USA300 au cours de ces trois épisodes.

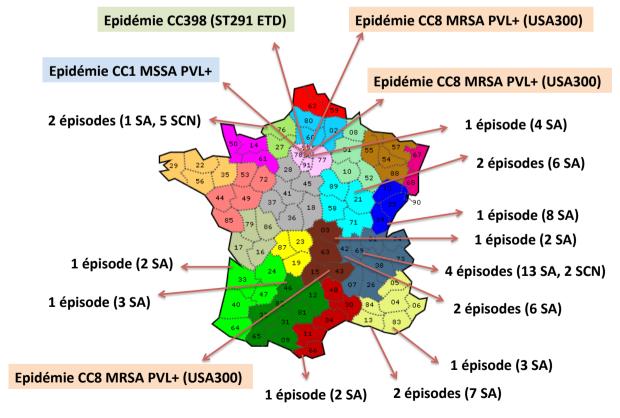


Figure 11- Recherches de clonalité effectuées au CNR en 2013

La circulation de clones majoritaires de SARM mais également de SASM à l'hôpital ou dans la communauté rend cette analyse délicate et ne permet bien souvent pas d'établir avec certitude qu'il s'agit de la diffusion d'une même souche

### **4.2.5** Emergence et dissémination d'un clone de *Staphylococcus epidermidis* résistant au linézolide au niveau national

En collaboration avec le laboratoire de bactériologie de Toulouse, le CNR a caractérisé l'émergence d'un clone de *Staphylococcus epidermidis* résistant au linézolide dans des unités de soins intensifs mais aussi des services de médecine du CHU de Toulouse entre 2009 et 2012. Dans ce cadre une étude a été conduite afin d'identifier le mécanisme de résistance, le lien épidémiologique entre les isolats, et le lien avec la consommation de linézolide.

Entre janvier 2009 et juillet 2013, 29 cas d'infections ou de colonisation par une souche de *Staphylococcus epidermidis* résistant au linézolide ont été identifiés au CHU de Toulouse. Les données démographiques, cliniques et thérapeutiques des 29 patients ont été collectées ainsi que la consommation de linézolide entre 2006 et 2012. Par ailleurs, vingt-deux autres souches de *Staphylococcus epidermidis* résistant au linézolide présentant les mêmes caractéristiques ont été adressées pour expertise au CNR par 4 autres centres hospitaliers français (Nîmes, Lyon, Dijon, Paris). Le CNR des staphylocoques a i) confirmé l'identification par maldi-TOF, ii) évalué la CMI au linézolide par E-test, iii) étudié les liens de clonalité par PFGE/ECP, et iv) exploré les mécanismes de résistance au linézolide par séquençage de l'ARN 23S et des protéines ribosomales L3 et L4.

Au CHU de Toulouse, les patients concernés (âge moyen = 64,6±11,2 ans (40-79 ans)) avaient tous reçu, avant l'isolement du Staphylococcus epidermidis résistant, du linézolide à la posologie recommandée avec une durée moyenne d'exposition au linézolide de 13±6,5 i (4-26 j). L'évolution de la DDJ du linézolide sur l'ensemble du CHU suivait la courbe épidémique des Staphylococcus epidermidis résistant au linézolide sur la période 2008-2012. Les 29 Staphylococcus epidermidis résistant au linézolide ont été isolés essentiellement d'hémoculture (79%), plaie cutanée (14%), et d'urine (10%). Les 29 souches toulousaines et les 22 autres souches de Staphylococcus epidermidis résistant au linézolide présentaient toutes une résistance à la méticilline associée des CMI élevées au linézolide (> 256 mg/L) mais aussi à la teicoplanine (≥ 16 mg/L) et la vancomycine (2-4 mg/L). Le séquençage de l'ARNr 23S a mis en évidence une mutation rare, T2504A, et aucune des souches ne possédait le gène cfr. L'analyse par PFGE (Smal) a confirmé le lien épidémiologique entre les SERL qui présentaient tous un profils identiques alors que dans le même temps des souches de S. epidermidis sensibles au linézolide (groupe contrôle) présentaient des profils tous différents. L'ensemble des ces résultats démontrent l'existence d'une épidémie nosocomiale au sein du CHU de Toulouse. L'étude des consommations de linézolide a permis de mettre en évidence une prescription croissante au cours des 36 mois précédent la détection des premières souches pour atteindre un pic (1290 DDJ) au moment du pic de l'épidémie. Des mesures de renforcement des précautions d'hygiène et une limitation du recours au linézolide ont permis de stopper l'épidémie au sein du CHU de Toulouse.

Il s'agit de la première description en France (CHU de Toulouse) de l'émergence et la diffusion épidémique d'une souche de *S. epidermidis* multi-résistante présentant une mutation rare (T2504A) de l'ARN23S lui conférant une résistance inhabituelle au linézolide. L'analyse d'autres souches reçues au CNR a permis d'identifier ce même clone (même profil de résistance aux antibiotiques, même mutation, même pulsotypes) dans plusieurs autres hôpitaux français, parfois distants. Il s'agit aussi de la première description de la diffusion à

l'échelle d'un pays d'un tel clone de staphylocoque à coagulase négative, qui fait redouter une endémie à plus long terme. Les raisons, les voies et le périmètre réel actuel de dissémination de ce clone restent à définir et une étude est en cours afin de comprendre ce phénomène.

#### **4.2.6** Endémie mondiale du clone *S. capitis* NRCS-A

Malgré les progrès constants en réanimation néonatale, l'incidence des infections néonatales tardives (> J3 de vie) reste élevée (>20%) chez les prématurés de petit poids de naissance. Parmi les bactéries impliquées, plus de la moitié sont des staphylocoques à coagulase négative (SCN), au sein desquels *Staphylococcus epidermidis* est classiquement le plus prévalent. Bien que les infections à SCN soient significativement moins sévères que celles impliquant d'autres micro-organismes, elles sont sources de complications voire de décès. De plus, elles prolongent la durée d'hospitalisation et augmentent l'utilisation d'antibiotiques dans les services de réanimation néonatale, ce qui d'une part accroît le risque d'émergence de souches multirésistantes au sein de ces services et d'autre part implique des dépenses de santé significatives. La prévention et le traitement de ces infections constituent donc un réel enjeu de santé publique. C'est dans ce contexte et de façon inattendue que le CNR des staphylocoques a récemment démontré la diffusion d'un clone unique de *S. capitis* (NRCS-A) dans les réanimations néonatales des Hospices Civils de Lyon mais plus largement dans plusieurs villes de France.

L'étude rétrospective conduite par le CNR des staphylocoques au sein des HCL (et plus largement mais à moindre échelle au niveau national) a permis de mettre en lumière une fréquence particulièrement élevée des septicémies à *S. capitis* (39% des bactériémies versus 22.4% pour le *S. epidermidis*) au sein des services de réanimation néonatale chez les garnds prématurés. Les souches présentaient une résistance à la méticilline (et donc à l'ensemble de bêta-lactamines) atypique au sein de cette espèce, associée à une résistance à l'ensemble de aminosides et à la fosfomycine. La caractérisation moléculaire des souches a permis de montrer que l'ensemble des souches appartenait à un même clone (NRCS-A) qui a été identifié dans les services de réanimation néonatale de plus de 10 centres hospitaliers à travers la France. Ces souches sont différentes des souches retrouvées chez l'adulte ou dans les populations pédiatriques plus âgées. Elles présentent par ailleurs, une sensibilité diminuée ou hétérorésistance aux glycopeptides.

L'espèce *S. capitis* ayant déjà été rapportée sporadiquement dans des services de réanimation néonatale de plusieurs pays, alors qu'elle est rarement pathogène chez l'adulte, nous a amené à nous interroger sur l'existence possible d'une diffusion voire d'une endémie mondiale du clone NRCS-A. Le CNR a donc pris contact avec plusieurs centres de référence des staphylocoques à l'étranger afin de collecter des souches de *S. capitis* isolées en réanimation néonatale. Nous avons alors exploré la phylogénie de plusieurs souches d'origines géographiques variées, caractérisé son élément SCC*mec* et précisé son histoire évolutive.

Douze souches multi-résistantes de *S. capitis* isolées de sepsis néonatale en Angleterre (n=3), Australie (n=3), Belgique (n=3) et France (n=3), ainsi que 2 souches de *S. capitis* non-NRCS-A isolées d'adultes, ont été caractérisées par électrophorèse en champs pulsés (ECP) avec les enzymes *Smal* et *SacII*. Une analyse phylogénétique a été conduite sur la base des séquences de 7 gènes de ménage (MLST). Enfin, l'élément SCC*mec* de la souche prototype NRCS-A CR01 a été séquencé, caractérisé et comparé à ceux d'autres staphylocoques.

Les 12 souches d'origine géographique différente appartenaient en ECP Smal et SacII à un

unique pulsotype (>80% de similarité), différent de ceux des souches d'adultes. Sur 3020 pb séquencées sur 7 gènes de ménage, les souches d'origine néonatale présentaient au maximum 2 SNPs entre elles, contre 32 ou 33 SNPs par rapport aux souches isolées d'adultes, et étaient regroupées dans un même clade. Le séquençage de l'élément SCC*mec* de la souche NRCS-A CR01 a révélé une structure composite originale comprenant i) une cassette SCC*mec* fortement homologue à celle des *S. aureus* résistants à la méticilline ST398, et portant de façon surprenante un élément CRISPR d'immunité adaptative ; et ii) une cassette SCC portant des gènes de résistance aux métaux lourds (SCC*cad/ars/cop*). La comparaison avec d'autres génomes de *S. capitis* a permis de proposer un schéma évolutif avec acquisition successive indépendante des 2 cassettes. Enfin, nous avons pu établir par la technique de dru-typing (caractérisation par amplification/séquençage d'une région particulière des cassettes génétiques portant le gène *mec*A) que les cassettes SCC*mec* des 12 souches isolées en néonatologie était identiques.

La combinaison de plusieurs techniques de typage moléculaire a permis d'affirmer la diffusion internationale de *S. capitis* NRCS-A, présentant un caractère hautement clonal et portant un élément composite original SCC*mec*-SCC*cad/ars/cop*. L'analyse détaillée du génome de la souche prototype CR01 est en cours afin de mettre en évidence des facteurs de virulence pouvant expliquer la pathogénie particulière de ce clone et sa diffusion mondiale atypique. Cette observation constitue la première description d'une diffusion internationale d'un clone multi-résistant de staphylocoques à coagulasse négative, et n'est pas sans rappeller l'épidémiologie du clone de *Streptococcus agalactiae* ST-17, impliqué dans des infections materno-fœtales à l'échelle mondiale.

Par ailleurs, l'analyse rétrospective des données cliniques réalisée sur la période 2008-2011 sur la cohorte de patients des Hospices civils de Lyon a permis de montrer une morbidité (critère composite) significativement (analyse multivariée contrôlée sur l'âge et le poids de naissance) plus marquée des septicémies tardives à *S. capitis* que celles dues aux autres espèces de staphylocoques à coagulase négative.

Enfin, la forte utilisation de la vancomycine en réanimation néonatale et l'hétérorésistance des souches appartenant au clone NRCS-A nous ont amené étudier la capacité d'adaptation à la vancomycine de ce clone. Pour reproduire la pression de sélection par la vancomycine pouvant exister *in vivo*, 8 souches (2 *S. capitis* NRCS-A, 2 *S. capitis* non-NRCS-A isolés d'adultes, 2 *S. epidermidis* et 2 *S. aureus*) ont été quotidiennement repiquées pendant 15j en présence d'une gamme de concentration de vancomycine. Les vitesses d'élévation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été comparées au bout de 15j. Par ailleurs les CMI de vancomycine, daptomycine et linézolide (LZD) ont été mesurées par Etest à J0, J15, puis après 9 repiquages sans antibiotique (évaluation de la stabilité des CMI sans pression de sélection).

Les souches appartenant à l'espèce *S. capitis* présentaient une augmentation de CMI sous pression de sélection par la vancomycine plus rapide que les souches appartenant aux espèces *S. epidermidis* et *S. aureus* (p<0.001) (pas de différence NRCS-A *vs* non-NRCS-A). L'acquisition de résistance à la vancomycine était stable après repiquages sans antibiotique, et s'accompagnait pour toutes les souches d'une augmentation des CMI de daptomycine (résistance croisée) mais pas de LZD.

Le profil multi-résistance associé à une sensibilité aux quinolones du clone *S. capitis* NRCS-A (corrélé à la pression de sélection en néonatologie) et sa capacité d'acquisition rapide d'une résistance stable à la vancomycine obligent à envisager des alternatives thérapeutiques. La résistance croisée avec la daptomycine incite à privilégier le linézolide, bien que cette molécule soit peu étudiée et ne dispose pas d'AMM en néonatologie. Des

études sont en cours au CNR des staphylocoques et aux Hospices Civils de Lyon afin d'évaluer son efficacité et son innocuité chez le nouveau-né.

Enfin de façon plus récente, des contacts établis avec un grand nombre de laboratoire de biologie assurant l'activité de microbiologie de routine avec des services de grands prématurés a permis d'identifier la présence de ce clone dans des nombreux pays sur tous les continents. Outre la Grande Bretagne, la Belgique et l'Australie, on peut citer, le Brésil, les Etats Unis, le Canada, la Nouvelle Zélande, Taiwan, le Danemark, la Norvège, l'Afrique du Sud. L'analyse complète de ces souches est en cours.

#### 5 Activités d'information, de formation et de conseil

#### 5.1 Les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

Le CNR dans le cadre strict de son activité mais aussi de ses liens avec l'unité INSERM U1111 a accueilli

- 1 stagiaire IUT étude de la production de staphylokinase par les souches *S. aureus* responsables d'infection ou de portage
- 2 étudiants en master 1 :
- . comparaison des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de S. aureus responsables d'infections ostéoarticulaires primitives et post-opératoires chez l'enfant
- . étude de l'induction de la résistance aux glycopeptides par l'utilisation des bétalactamines
- 3 étudiants de masters 2:
- . Etude du microbiote nasal et du portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez des volontaires sains par culture et spectrométrie de masse
- . Septicémie à *Staphylococcus capitis* multi-résistant NRCS-A en réanimation néonatale : caractérisation moléculaire et mécanismes physiopathologiques
- . Pathogénie intracellulaire des *Staphylococcus aureus* hypervirulents : rôle des phenol-soluble modulins, de l'alpha-toxine et de la bêta-toxine

Pour les enseignements et formations aux professionnels de santé voir paragraphe suivant.

#### 5.2 Les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

En 2013, le CNR n'a pas publié de guide ou de recommandations officielles.

#### 5.3 Les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

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

#### **Site Internet**

Le CNR dispose d'un site internet <a href="http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNRstaphylocoques/">http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNRstaphylocoques/</a> où figure 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, une synthèse concernant les différentes formes d'infection staphylococcique et leurs caractéristiques, les recommandations existants 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.

#### Interventions en séminaires FMC et Congrès

Les membres du CNR répondent chaque année à un nombre important de sollicitations dans le cadre de séminaires de formation continue à travers toute la France ou de congrès nationaux afin de présenter (i) la diversité des contextes 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.

A titre d'exemple on peut citer une session spécifique de la RICAI 2013 focalisée sur les données récentes du CNR des staphylocoques

<u>Lina G.</u> L'infection à *Staphylococcus aureus*: infection mono- ou multi-microbienne. 2<sup>ème</sup> journée Ecofect, Février 2013, Lyon, France

<u>Laurent F.</u> Small Colony Variant et IOA. Journée du centre Régional de prise en charge des infections ostéo-articulaires complexes, Mars 2013, Lyon, France

<u>Laurent F</u>. Actualités sur la prise en charge des infections néonatales tardives à staphylocoques à coagulase négative. 43èmes Journées Nationales de Néonatologie, Mars 2013, Paris, France

<u>Laurent F</u>. Diagnostic des IOA : du prélèvement à la biologie moléculaire. Soirée Albert Trillat de Chirugie Orthopédique, Avril 2013, Lyon, France

<u>Lina G.</u> agr functionality: predictor of infection complications and resistance? Fourth ISC MRSA Consensus Conference, April 2013, Catania, Italy

<u>Laurent F</u>. *Staphylococcus aureus*: actualités 2013. BacterioCercle Breton, Mai 2013, La baule, France

<u>Laurent F</u>. Impact du biofilm dans les infections ostéo-articulaires à staphylocoques, JNI, Juin 2013, Clermont-Ferrand

<u>Laurent F</u>. Staphylocoques et résistances : tous des mecs? JNI, Juin 2013, Clermont-Ferrand

<u>Laurent F</u>. The alphabet of mec in Staphylococcus: mecA et al. 5th Congress of European Microbiologists –FEMS, July 2013, Leipzig, Germany

<u>Vandenesch F.</u> Pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* : du case report au PHRC. Journée Recherche des Hôpitaux de Lyon, September 2013, Lyon, France

<u>Laurent F.</u> Staphylocoques : quelles résistances pour quelles options thérapeutiques ? Congrès du SNPHP, Septembre 2013, Marseille, France

<u>Vandenesch</u> F. Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: from case report to pathophysiology and translationnal interventions. Séminaire du centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, October 2013, Lille, France

Laurent F. IOA et biofilm. Journée scientifique du CRIOGO, Octobre 2013, Brest, France

Laurent F. Epidémiologie des endocardites et impact du biofilm, Journée scientifique des

endocardites infectieuses, Novembre 2013, Paris, France

<u>Vandenesch</u> F. Facteurs bactériens liés à la survenue d'une endocardite au cours de bactériémies à *Staphylococcus aureus*. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Vandenesch F.</u> Des pneumonies communautaires sévères à *Staphylococcus aureus*. 56ème Journée de l'Hôpital Claude Bernard, Novembre 2013, Paris, France

<u>Tristan A</u>. Situation nationale des syndromes de choc toxique. Journées régionales de veille sanitaire des Pays de la Loire, Décembre 2013, Nantes, France

<u>Dumitrescu O</u>. Effets des antibiotiques et peptides antimicrobiens sur la virulence de *S. aureus*. Journée Infections Nosocomiales Lyon Biopôle – FINOVI, Décembre 2013, Lyon, France

<u>Vandenesch</u> F. MRSA from hospitals to livestock: what did genomic say ? Colloque Génomique et Résistance nosocomiales. Institut Pasteur, Décembre 2013, Paris, France

<u>Laurent F.</u> Les staphylocoques font de la résistance, 41ème Congrès de la Société Française de Réanimation, Janvier 2013, Paris, France

<u>Laurent F</u>. Evolution de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif : Staphylocoques et résistance à la méticilline. SFM, Janvier 2013, Lille, France Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), Janvier 2013, Lille, France

<u>Laurent F</u>. Diffusion mondiale des clones de staphylocoques résistants à la méticilline : du nosocomial au communautaire... des dorés aux blancs. 41ème Congrès de la Société Française de Réanimation, Paris, 2013.

<u>Laurent F.</u> Diagnostic des IOA : du prélèvement à la biologie moléculaire. Soirée Albert Trillat de Chirugie Orthopédique, Lyon, 2013.

<u>Laurent</u> F. Staphylocoques et résistances : tous des mecs? Journée Nationale d'Infectiologie, Clermont-Ferrand, 2013.

<u>Laurent F</u>. Les 10 erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires. RICAI 2013, Paris, 2013.

#### Organisation de FMC spécifiques

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

- . Bioformation « Résistance aux antibiotiques » module de base (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- . Bioformation « Résistance aux antibiotiques » module de perfectionnement (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
  - . Atelier FMC bioMérieux « Infections ostéo-articulaires »

Le CNR des staphylocoques sera l'organisateur du 30 Juin au 5 Juillet 2014 du "PostGraduate Workshop for Microbiology Typing" sous l'égide de Société Européenne de Microbiologie et de maladies infectieuses (ESCMID). Ce séminaire à la fois théorique (sous forme de communications orales) et pratique (sous forme d'ateliers pratiques de réalisation des techniques moléculaires et d'analyse bio-informatique), qui a lieu tous les trois ans, réunira plus de 15 intervenants internationaux (Danemark, Allemagne, Portugal, Pays Bas, France, Grande Bretagne, Suisse, USA) et des participants venus de toute l'Europe afin d'échanger et d'appréhender les technologies les plus récentes

permettant d'assurer le typage et la caractérisation des souches responsables d'épidémie et d'endémie. L'accent sera notamment mis sur les approches utilisant l'analyse des génomes complets.

#### Publications didactiques en français

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

## 5.4 Les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Les différentes demandes adressées au CNR sont gérées à travers un staff hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce staff permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais. Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique par courrier. 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.

# 5.5 Les activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

#### InVS

Des liens étroits ont été tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR des Staphylocoques et l'InVS. 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 l'InVS par contacts téléphoniques directs ou par mail.

Enfin, le CNR participe activement à la formation à l'épidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses, organisée par l'InVS pour ses intervenants en région.

#### **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 des Tribunaux de Grande Instance.

#### **HCSP**

Suite à la saisine du HCSP concernant la modification des recommandations de prise en charge des infections à SARM-C suite aux épidémies récentes d'USA300 dans des collectivités, François Vandenesch et Yves Gillet font partie du groupe de travail en charge de rédiger les nouvelles recommandations.

#### **ECDC**

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

#### ECDC - EARSS Staphylococcus

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

#### IMMI

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

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

## 6.1 Les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM « Pathogénie des Staphylocoques » dirigée par F. Vandenesch. Cette équipe est intégrée depuis le 1 janvier 2013 au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, Dir F.L. Cosset, Dir Adjoint F. Vandenesch), un centre de recherche labellisé par l'INSERM, le CNRS, l'Université de Lyon et l'Ecole Normale Supérieure de Lyon qui réunit 20 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (http://ciri.inserm.fr/en/). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un axe clinique et deux axes de recherche fondamentale portant sur les facteurs de virulence bactériens et sur la réponse immunitaire de l'hôte. L'axe clinique porte sur l'épidémiologie, la résistance et la clinique des infections staphylococciques ; il constitue l'axe le plus directement en lien avec l'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques. En 2013, les principaux résultats de cette recherche en lien avec le CNR des staphylocoques sont illustrés par les publications et communications présentées ci-dessous

et dont la liste complète est détaillée au paragraphe 6.2.

Travaux sur les *S. capitis* isolées en néonatologie : une nouvelle cassette de résistance à la méticilline dans le clone international NRCS-A associé aux infections néonatales à *S. capitis*.

**Journal.** Antimicrob Agents Chemother. 2013 Dec;57(12):6354-7. doi: 10.1128/AAC.01576-13.

**Title** Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec-SCCcad/ars/cop) in the neonatal sepsis-associated *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A.

**Authors** Martins Simões P, Rasigade JP, Lemriss H, Butin M, Ginevra C, Lemriss S, Goering RV, Ibrahimi A, Picaud JC, El Kabbaj S, Vandenesch F, Laurent F.

**Abstract** Multiresistant *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A has been reported to be a major pathogen causing nosocomial bacteremia in preterm infants. We report that the NRCS-A strain CR01 harbors a novel 60.9-kb composite staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) element, composed of an SCCmec with strong homologies to *Staphylococcus aureus* ST398 SCCmec and of an SCCcad/ars/cop harboring resistance genes for cadmium, arsenic, and copper. Whole-genome-based comparisons of published *S. capitis* strains suggest that strain CR01 acquired the two elements independently.

## Travaux en rapport avec le complexe clonal CC398 sensible à la méticilline : les spécificités de cette lignée indépendamment des SARM CC398 associés aux élevages de porc

**Journal.** PLoS One. 2013 Nov 15;8(11):e68462. doi: 10.1371/journal.pone.0068462. eCollection 2013.

**Title.** Clonal complex 398 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics.

**Authors.** Chroboczek T, Boisset S, Rasigade JP, Tristan A, Bes M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F.

Abstract. Clonal complex 398 livestok-associated-MRSA (CC398 LA-MRSA) clone is described as a major animal pathogen that can also colonize and infect humans. CC398 methicillin susceptible Staphylococcus aureus (CC398 MSSA) is less described. We identified 126 CC398 MSSA strains of human origin within 6380 S. aureus isolates gathered between 2009 and 2011, from the French National Reference Centre for Staphylococci. They were characterized using antimicrobial susceptibility testing, spa typing, DNA microarrays (Identibac S. aureus Genotyping ®, Alere), CC398-specific sequence PCR, ermT (encoding macrolides résistance) PCR. Fifty-three CC398 LA-MRSA collected from French pigs and veal were used as comparators, and phylogenetic relations between human CC398 MSSA and animal CC398 MRSA populations were explored on the basis of spa-typing and DNA microarrays. CC398 MSSA were able to induce a large spectrum of infections (especially skin, bloodstream, and pneumonias). The prevalence rate of this clone was high in MSSA population, i.e., 24.7% in a local prospective study on nasal colonization, and 7.5% in a national prospective study on infective endocarditis. CC398 MSSA isolates were frequently (89%) erythromycin resistant, due to the presence of the ermT gene, a gene not detected in erythromycin resistant CC398 LA-MRSA strains. Expression of staphylococcal complement inhibitor (scn) and the chemotaxis inhibitory protein (chp), was also specific to this population. The CC398 MRSA signature included also a panel of antibiotic resistance genes, especially a type IV or V cassette mec and tetM. CC398 MSSA and CC398 LA-MRSA populations were closely related based on spa-typing and DNA microarrays, with the MRSA strains forming the most derived lineage in phylogenic trees. Both MSSA and MRSA populations may come from common ancestors, which would have evolved in the settings of different selective pressures, explaining the acquisition of ermT, chp and scn for MSSA, and antibiotic resistance genes for MRSA.

Travaux montrant la spécificité des manifestations cliniques associées aux superantigènes par rapport à celles dues à des exfoliatines. Cette distinction a d'importantes conséquences sur la prise en charge thérapeutique.

Journal. Pediatr Infect Dis J. 2013 Jul;32(7):727-30. doi: 10.1097/INF.0b013e31828e89f5.

**Titre.** Skin findings of Staphylococcus aureus toxin-mediated infection in relation to toxin encoding genes.

**Auteurs.** Courjon J, Hubiche T, Phan A, Tristan A, Bès M, Vandenesch F, Etienne J, Del Giudice P, Gillet Y.

**Abstract.** BACKGROUND: Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome are associated with exfoliatins and superantigens, respectively; and are easy to distinguish in their usual presentation. However, there is confusion about the mild forms of these 2 staphylococcal diseases. These mild forms are both designated as "staphylococcal scarlet fever" despite differences in their pathophysiology and clinical presentation. Our study aimed to distinguish between the clinical characteristics of the rash associated with exfoliatins and the rash associated with superantigens.

METHODS: Patients were selected from the French National Reference Center for Staphylococci. We retrospectively compared the clinical characteristics of patients with a generalized rash during Staphylococcus aureus infection. Patients who met the criteria of staphylococcal scalded skin syndrome or toxic shock syndrome were excluded. The patients were classified into 2 groups depending on the presence of a gene coding for exfoliatin or for superantigenic toxin.

RESULTS: We included 13 cases with exfoliatin and 9 with superantigens. The patients of the exfoliatin group were more likely to have facial involvement, fold involvement and a superficial focus of infection. In the second group, *S. aureus* was isolated from a deeper focus in 8 of 9 patients.

CONCLUSION: Mild forms of *S. aureus* toxin-mediated infection affect the pediatric population. Examination made it possible to distinguish an exanthema associated with an exfoliatin from one associated with a superantigen. This early clinical distinction results in differences in management.

Travaux sur la pneumonie communautaire à *S. aureus* PVL-positif : l'analyse d'une cohorte de 148 patients confirme la leucopénie comme facteur de sévérité dans cette maladie, permettant d'identifier précocement les patients dont le pronostic est le plus sévère

Journal. BMC Infect Dis. 2013 Aug 1;13:359. doi: 10.1186/1471-2334-13-359.

**Titre.** Severe leukopenia in *Staphylococcus aureus*-necrotizing, community-acquired pneumonia: risk factors and impact on survival.

**Auteurs.** Khanafer N, Sicot N, Vanhems P, Dumitrescu O, Meyssonier V, Tristan A, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Gillet Y, Etienne J.

**Abstract.** BACKGROUND: Necrotizing pneumonia attributed to Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* has mainly been reported in otherwise healthy children and young adults, with a high mortality rate. Erythroderma, airway bleeding, and leukopenia have been shown to be predictive of mortality. The objectives of this study were to define the characteristics of patients with severe leukopenia at 48-h hospitalization and to update our data regarding mortality-predicting factors in a larger population than we had previously described.

METHODS: It was designed as a case-case study nested in a cohort study. A total of 148 cases of community-acquired, necrotizing pneumonia were included. The following data were collected: basic demographic information, medical history, signs and symptoms, radiological findings and laboratory results during the first48 h of hospitalization. The study population was divided into 2 groups: (1) with severe leukopenia (leukocyte count ≤3,000 leukocytes/mL, n=62) and (2) without severe leukopenia (>3,000 leukocytes/mL, n=86).

RESULTS: Median age was 22 years, and the male-to-female gender ratio was 1.5.The overall in-hospital mortality rate was 41.2%. Death occurred in 75.8% of severe leukopenia cases with median survival time of 4 days, and in 16.3% of cases with leukocyte count >3,000/mL (P<0.001). Multivariate analysis indicated that the factors associated with severe leukopenia were influenza-like illness (adjusted odds ratio (aOR) 4.45, 95% CI (95% confidence interval) 1.67-11.88, P=0.003), airway bleeding (aOR 4.53, 95% CI 1.85-11.13, P=0.001) and age over 30 years (aOR 2.69, 95% CI 1.08-6.68, P=0.033). A personal history of furuncles appeared to be protective (OR 0.11, 95% CI 0.01-0.96, P=0.046).

CONCLUSION: S. aureus-necrotizing pneumonia is still an extremely severe disease in patients with severe leukopenia. Some factors could distinguish these patients, allowing better initial identification to initiate adapted, rapid administration of appropriate therapy

# Travaux sur la pneumonie communautaire à *S.aureus* PVL-positif : la résistance à la méticilline des souches PVL-positives n'est pas en elle-même un facteur de sévérité des pneumonies.

Journal. Clin Microbiol Infect. 2013 Mar;19(3):E142-8. doi: 10.1111/1469-0691.12022.

**Title.** Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia--results of a prospective observational study. **Authors.** Sicot N, Khanafer N, Meyssonnier V, Dumitrescu O, Tristan A, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Vanhems P, Etienne J, Gillet Y.

Abstract. Staphylococcal necrotizing pneumonia (NP) is a severe disease associated with Panton-Valentine leucocidin (PVL). NP was initially described for methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) infection, but cases associated with methicillin-resistant S. aureus (MRSA) infection have increased concomitantly with the incidence of communityacquired MRSA worldwide. The role of methicillin resistance in the severity of NP remains controversial. The characteristics and outcomes of 133 patients with PVL-positive S. aureus community-acquired pneumonia (CAP) were compared according to methicillin resistance. Data from patients hospitalized for PVL-positive S. aureus CAP in France from 1986 to 2010 were reported to the National Reference Centre for Staphylococci and were included in the study. The primary end point was mortality. Multivariate logistic modelling and the Cox regression were used for subsequent analyses. We analysed 29 cases of PVL-MRSA and 104 cases of PVL-MSSA pneumonia. Airway haemorrhages were more frequently associated with PVL-MSSA pneumonia. However, no differences in the initial severity or the management were found between these two types of pneumonia. The rate of lethality was 39% regardless of methicillin resistance. By Cox regression analysis, methicillin resistance was not found to be a significant independent predictor of mortality at 7 or 30 days (p 0.65 and p 0.71, respectively). Our study demonstrates that methicillin resistance is not associated with the severity of staphylococcal necrotizing pneumonia.

## Travaux montrant l'effet protecteur de l'utilisation des solutions hydro-alcooliques sur le portage nasal à *S. aureus*

**Journal**. PLoS One. 2013 Dec 18;8(12):e82851. doi: 10.1371/journal.pone.0082851. eCollection 2013.

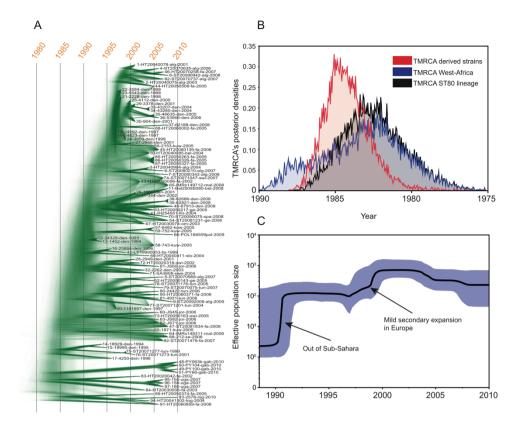
**Titre.** Basic rules of hygiene protect health care and lab workers from nasal colonization by Staphylococcus aureus: an international cross-sectional study.

**Auteurs.** Saadatian-Elahi M, Tristan A, Laurent F, Rasigade JP, Bouchiat C, Ranc AG, Lina G, Dauwalder O, Etienne J, Bes M, Vandenesch F.

Abstract. Acquisition of nasal Staphylococcus aureus (S. aureus) colonization by contaminated hands is likely an important determinant of its nasal carriage rate in health care and lab setting. The objective of our cross-sectional study was to assess the prevalence of nasal methicillin-sensitive (MSSA) or -resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriage among health care professionals (HCPs) attending an international symposium and to study the association between compliance with hygiene rules, individual-related parameters, and medical conditions with nasal S. aureus carriage in this population. After obtaining consent, two nasal swabs were collected. Nasal MSSA and MRSA carriage was measured by the: i) molecular approach targeting spa, mecA and mecA-orfX junction sequences, and ii) culture on selective S. aureus media combined with mecA molecular detection of isolated strains. Information on compliance with hygiene rules, demographic variables, sector of activity and long-term medication was collected by anonymous questionnaire. The participation rate was 32.3%. In total, 176 subjects from 34 countries were included in the analysis. S. aureus was isolated from the nasal swabs of 57 (32.4%) subjects, of whom 3 (5.3%) harboured MRSA strains. Overall, 123 subjects reported working in microbiology laboratories with direct manipulation of S. aureus, and 29 acknowledged regular contacts with patients. In this exposed population, hydro-alcoholic solutions appeared to have a significant protective effect against nasal S. aureus carriage (OR=0.36; 95% CI: 0.15-0.85). Hospital work was associated with increased risk of nasal S. aureus carriage (OR=2.38; 95% CI: 1.07-5.29). The results of this study showed that compliance with basic rules of hygiene, such as the use of hydro-alcoholic solutions, could reduce the risk of nasal S. aureus colonization. Hydroalcoholic solution could interrupt auto-transmission of the pathogen, consequently decreasing the overall nasal carriage rate, specifically in transient carriers.

#### Travaux non publié. Les origines africaines du clone de SARM communautaire ST80

Parmi les faits marquants non publiés, on peut noter la caractérisation de l'origine du clone de SARM communautaire Européen ST80 par analyse phylogéographique basée sur le séquençage des génomes complets de 97 SARM et SASM du complexe clonal CC80. Les souches ont été échantillonnées sur une période de 17 ans et une distribution géographique couvrant 22 pays en Europe, Afrique du Nord et Afrique noire. L'analyse phylogénétique révèle que le SARM ST80 dérive d'un SASM PVL originaire d'Afrique de L'Ouest et ayant acquis la résistance à la méticilline à la fin des années des années 1990. Cette acquisition s'est accompagnée d'une « sortie d'Afrique de l'Ouest » avec une expansion rapide en Afrique du Nord, en Europe et au moyen orient, en suivant les différentes voies d'immigration vers l'Europe (Figure 12).



**Figure 12**- Bayesian analyses of the CC80 complex. A) DensiTree representation of the Bayesian coalescent trees using a strict clock model based on 3,493 SNPs. Tips of the trees are constrained by year of isolation, the time scale is shown at the top. B) Posterior estimates of the TMRCA for the derived and Sub-Saharan African strains under the strict clock model. C) Effective population size through time (Bayesian skyline) of the *S. aureus* CC80 lineage. The shaded area represents the 95% confidence intervals, and the arrows point to potential socio-economic events that might have impacted the demography of the MRSA population

## 6.2 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

(i) Publications nationales, et Publications internationales

Les publications en lien direct avec l'activité du CNR sont présentées si dessous surlignées en vert. Pour une <u>vision plus intégrée</u> de notre activité de recherche, sont aussi présentées les publications en rouge qui rendent compte de la recherche en physiopathologie et en bactériologie fondamentale sur la thématique des staphylocogues.

#### 2013

Barraud O, <u>Laurent F</u>, François B, <u>Bes M</u>, Vignon P, Ploy MC. Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mec*C variant. J Antimicrob Chemother. 2013 Dec;68(12):2949-50.

<u>Chroboczek, T., Boisset, S., Rasigade, J.P., Meugnier, H., Akpaka, P.E., Nicholson, A., Nicolas, M., Olive, C., Bes, M., Vandenesch, F., Laurent, F., Etienne, J., and Tristan, A. (2013a). Major West Indies MRSA clones in human beings: do they travel with their hosts? J Travel Med *20*, 283-288.</u>

Chroboczek, T., Boisset, S., Rasigade, J.P., Tristan, A., Bes, M., Meugnier, H., Vandenesch, F., Etienne, J., and Laurent, F. (2013b). Clonal complex 398 methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*: a frequent unspecialized human pathogen with specific phenotypic and genotypic characteristics. PLoS One 8, e68462.

- Courjon, J., Hubiche, T., Phan, A., <u>Tristan</u>, A., <u>Bes</u>, M., <u>Vandenesch</u>, F., <u>Etienne</u>, J., Del Giudice, P., and <u>Gillet</u>, Y. (2013). Skin findings of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated infection in relation to toxin encoding genes. Pediatr. Infect. Dis. J. *32*, 727-730.
- Cremieux, A.C., Saleh-Mghir, A., Danel, C., <u>Couzon</u>, F., <u>Dumitrescu</u>, O., Lilin, T., Perronne, C., <u>Etienne</u>, J., <u>Lina</u>, G., and <u>Vandenesch</u>, F. (2013). alpha-hemolysin, not Panton-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. J. Infect. Dis.
- Desroches, M., Potier, J., <u>Laurent</u>, F., Bourrel, A.S., Doucet-Populaire, F., and Decousser, J.W. (2013). Prevalence of mupirocin resistance among invasive coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in France: emergence of a mupirocin-resistant MRSA clone harbouring mupA. J. Antimicrob. Chemother. *68*, 1714-1717.
- Diep, B.A., <u>Gillet</u>, Y., <u>Etienne</u>, J., <u>Lina</u>, G., and <u>Vandenesch</u>, F. (2013). Panton-Valentine leucocidin and pneumonia. Lancet Infect Dis *13*, 566.
- Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Sellman B, <u>Badiou C</u>, <u>Lina G</u>, Chambers HF. Effects of linezolid on suppressing in vivo production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. J Infect Dis. 2013 Jul;208(1):75-82.
- Entenza JM, Bétrisey B, Manuel O, Giddey M, Sakwinska O, Laurent F, Bizzini A. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin by isothermal microcalorimetry. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):180-6.
- Goes E, Zeller V, Chicheportiche V, <u>Tristan A</u>, Desplaces N, Ziza JM. *Staphylococcus aureus* osteitis of the dens: a rare location. Joint Bone Spine. 2013 Oct;80(5):531-3.
- Khanafer, N., Sicot, N., Vanhems, P., <u>Dumitrescu</u>, O., Meyssonier, V., <u>Tristan</u>, A., <u>Bes</u>, M., <u>Lina</u>, G., <u>Vandenesch</u>, F., <u>Gillet</u>, Y., and <u>Etienne</u>, J. (2013). Severe leukopenia in *Staphylococcus aureus*-necrotizing, community-acquired pneumonia: risk factors and impact on survival. BMC Infect Dis *13*, 359.
- Kurt K, Rasigade JP, Laurent F, Goering RV, Žemličková H, Machova I, Struelens MJ, Zautner AE, Holtfreter S, Bröker B, Ritchie S, Reaksmey S, Limmathurotsakul D, Peacock SJ, Cuny C, Layer F, Witte W, Nübel U. Subpopulations of *Staphylococcus aureus* clonal complex 121 are associated with distinct clinical entities. PLoS One. 2013;8(3):e58155
- Loffler, B., Niemann, S., Ehrhardt, C., Horn, D., Lanckohr, C., <u>Lina</u>, G., Ludwig, S., and Peters, G. (2013). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. Expert Rev Anti Infect Ther *11*, 1041-1051.
- Martins Simoes, P., Rasigade, J.P., Lemriss, H., Butin, M., Ginevra, C., Lemriss, S., Goering, R.V., Ibrahimi, A., Picaud, J.C., El Kabbaj, S., Vandenesch, F., and Laurent, F. (2013). Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*-SCC*cad/ars/cop*) in the neonatal sepsis-associated *Staphylococcus capitis* pulsotype NRCS-A. Antimicrob. Agents Chemother. *57*, 6354-6357.
- Messad, N., Landraud, L., Canivet, B., <u>Lina</u>, G., Richard, J.L., Sotto, A., Lavigne, J.P., and Lemichez, E. (2013). Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. Clin Microbiol Infect *19*, 875-880.
- Oksuz L, <u>Dupieux C</u>, <u>Tristan A</u>, <u>Bes M</u>, <u>Etienne J</u>, Gurler N. The high diversity of MRSA clones detected in a university hospital in istanbul. Int J Med Sci. 2013 Oct 12;10(12):1740-5.
- Otto, M.P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., and Dumitrescu, O. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. *68*, 1524-1532.
- Piffaut, C., Lustig, S., <u>Laurent</u>, F., Chidiac, C., and <u>Ferry</u>, T. (2013). Small colony variant-producing *S aureus* prosthesis joint infection highlighted by sonication and treated with prolonged high doses of daptomycin. BMJ Case Rep *2013*,

- Rasigade, J.P., Trouillet-Assant, S., Ferry, T., Diep, B.A., Sapin, A., Lhoste, Y., Ranfaing, J., Badiou, C., Benito, Y., Bes, M., Couzon, F., Tigaud, S., Lina, G., Etienne, J., Vandenesch, F., and Laurent, F. (2013). PSMs of hypervirulent *Staphylococcus aureus* act as intracellular toxins that kill infected osteoblasts. PLoS One 8, e63176.
- Rasigade, J.P., and Vandenesch, F. (2013). Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues. Infect Genet Evol.
- Rasigade JP, Bensaid M, Butin M, Picaud JC, <u>Laurent F</u>. Highlights in 2013 around management of late-onset sepsis due to coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units. Arch Pediatr. 2013 Sep;20(9):1028-33.
- Saadatian-Elahi, M., Tristan, A., Laurent, F., Rasigade, J.P., Bouchiat, C., Ranc, A.G., Lina, G., Dauwalder, O., Etienne, J., Bes, M., and Vandenesch, F. (2013). Basic rules of hygiene protect health care and lab workers from nasal colonization by *Staphylococcus aureus*: An international cross-sectional study. PLoS One *8*, e82851.
- Schijffelen, M., Konstantinov, S.R., <u>Lina</u>, G., Spiliopoulou, I., van Duijkeren, E., Brouwer, E.C., and Fluit, A.C. (2013). Whole Genome Analysis of Epidemiologically Closely Related *Staphylococcus aureus* Isolates. PLoS One *8*, e78340.
- Senneville, E., Briere, M., Neut, C., Messad, N., <u>Lina</u>, G., Richard, J.L., Sotto, A., and Lavigne, J.P. (2013). First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study. Clin Microbiol Infect
- Sicot, N., Khanafer, N., Meyssonnier, V., <u>Dumitrescu</u>, O., <u>Tristan</u>, A., <u>Bes</u>, M., <u>Lina</u>, G., <u>Vandenesch</u>, F., Vanhems, P., <u>Etienne</u>, J., and <u>Gillet</u>, Y. (2013). Methicillin resistance is not a predictor of severity in community-acquired *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia-results of a prospective observational study. Clin Microbiol Infect *19*, E142-8.
- <u>Spaan</u>, A.N., <u>Henry</u>, T., van Rooijen, W.J., <u>Perret, M., Badiou</u>, C., Aerts, P.C., Kemmink, J., de Haas, C.J., van Kessel, K.P., <u>Vandenesch</u>, F., <u>Lina</u>, G., and van Strijp, J.A. (2013). The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. Cell Host Microbe *13*, 584-594.
- Stegger M, Liu CM, Larsen J, Soldanova K, Aziz M, Contente-Cuomo T, Petersen A, Vandendriessche S, Jiménez JN, Mammina C, van Belkum A, Salmenlinna S, <u>Laurent F, Skov RL, Larsen AR, Andersen PS, Price LB. Rapid differentiation between livestock-associated and livestock-independent *Staphylococcus aureus* CC398 clades. PLoS One. 2013 Nov 14;8(11):e79645</u>
- Stegger M, Aziz M, <u>Chroboczek T</u>, Price LB, Ronco T, Kiil K, Skov RL, <u>Laurent F</u>, Andersen PS. Genome analysis of *Staphylococcus aureus* ST291, a double locus variant of ST398, reveals a distinct genetic lineage. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63008.
- Tattevin P, Saleh-Mghir A, Davido B, Ghout I, Massias L, Garcia de la Maria C, Miró JM, Perronne C, <u>Laurent F</u>, Crémieux AC. Comparison of six generic vancomycin products for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis in rabbits. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Mar;57(3):1157-62.
- Terman, D.S., Serier, A., <u>Dauwalder</u>, O., <u>Badiou</u>, C., Dutour, A., Thomas, D., Brun, V., Bienvenu, J., <u>Etienne</u>, J., <u>Vandenesch</u>, F., and <u>Lina</u>, G. (2013). Staphylococcal entertotoxins of the enterotoxin gene cluster (egcSEs) induce nitrous oxide- and cytokine dependent tumor cell apoptosis in a broad panel of human tumor cells. Front Cell Infect Microbiol *3*, 38.
- <u>Trouillet-Assant S, Rasigade JP</u>, Lustig S, Lhoste Y, <u>Valour F</u>, Guerin C, Aubrun F, Tigaud S, <u>Laurent F</u>. Ward-specific rates of nasal cocolonization with methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus* spp. and potential impact on molecular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening tests. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2418-20.
- <u>Valour, F.</u>, Blanc-Pattin, V., Freydiere, A.M., Bouaziz, A., Chanard, E., Lustig, S., Ferry, T., and Laurent, F. (2013a). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance

in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. Diagn Microbiol Infect Dis

<u>Valour, F.</u>, Chebib, N., <u>Gillet</u>, Y., Reix, P., <u>Laurent</u>, F., Chidiac, C., and <u>Ferry</u>, T. (2013b). [*Staphylococcus aureus* broncho-pulmonary infections]. Rev Pneumol Clin *69*, 368-382.

<u>Valour, F., Trouillet-Assant, S., Rasigade, J.P., Lustig, S., Chanard, E., Meugnier, H., Tigaud, S., Vandenesch, F., Etienne, J., Ferry, T., and Laurent, F. (2013c). Staphylococcus epidermidis in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. PLoS One 8, e67240.</u>

#### 2014

Croisier-Bertin, D., Hayez, D., Da Silva, S., Labrousse, D., Biek, D., <u>Badiou</u>, C., <u>Dumitrescu</u>,O., Guerard, P., Charles, P.E., Piroth, L., <u>Lina</u>, G., <u>Vandenesch</u>, F., and Chavanet, P. (2014). In vivo efficacy of ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant PVL-producing *Staphylococcus aureus* rabbit pneumonia model. Antimicrob. Agents Chemother.

Romilly C, <u>Lays C</u> (CR & CL\_Equal first author), Tomasini A, Caldelari I, <u>Benito Y</u>, Hammann P, <u>Geissmann T, Boisset S</u>, Romby P, <u>Vandenesch F.</u> A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. Plos Pathogens 2014. In press

<u>Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP</u>, Lamy B, Chanard E, Verhoeven P, Decousser JW, Marchandin H, <u>Bès M</u>, Chidiac C, <u>Vandenesch F, Ferry T, Laurent F.</u> Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus CC398: high prevalence and geographic heterogeneity in bone and joint infection and nasal carriage. Clin Microbiol Infect. 2014 Jan 26.

<u>Valour F</u>, Karsenty J, Bouaziz A, Ader F, Tod M, Lustig S, <u>Laurent F</u>, Ecochard R, Chidiac C, <u>Ferry T</u>; Lyon BJI Study Group. Antimicrobial-related severe adverse events during treatment of bone and joint infection due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Feb;58(2):746-55.

#### (ii) Communications nationales

<u>Trouillet-Assant</u> S, Gallet M, Nauroy P, Flammier S, Parroche P, <u>Rasigade JP</u>, Marvel J, Jurdic P, <u>Laurent F</u>. *Staphylococcus aureus* inhibe l'ostéoclastogénèse et participe à l'inflammation locale au cours d'infections ostéo-articulaires. JFBTM, Mai 2013, Poitiers, France Prix de la meilleure communication orale

Martins-Simoes P, Butin M, Lemriss H, Ginevra C, Lemriss S, Kearns A, Deighton MA, Goering RV, Ibrahimi A, Picaud JC, Al Kabbaj S, Vandenesch F, Rasigade JP, Laurent F. Worldwide distribution of an endemic multi-resistant NRCS-A *Staphylococcus capitis* clone in NICU: molecular typing, whole genome analysis and evolutionary history. 10<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, Octobre 2013, Paris, France

Casalegno JS, <u>Martin E</u>, Ottmann M, <u>Badiou C</u>, <u>Etienne J</u>, Lina B, <u>Vandenesch F</u>, <u>Lina G</u>. La pré-exposition au virus Influenza A sensibilise les polynucléaires neutrophiles humains à la toxine de Panton-Valentine. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Dupieux C, Rasigade JP, Lina G, Sapin A, Trouillet-Assant S, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F.</u> L'échappement phagosomal des *S. aureus* hypervirulents est indépendant de l'expression de bêta-toxine. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lamy B, Chanard E, Mallet B,

Verhoeven P, Decousser JW, Marchandin H, <u>Bes M</u>, Chidiac C, <u>Vandenesch F</u>, Ferry T, <u>Laurent F</u>. *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline de complexe clonal CC398 : forte prévalence et hétérogénéité géographique dans les infections ostéo-articulaires et le portage nasal. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Butin M, Martins-Simoes P, Rasigade JP</u>, Lemriss S, Lemriss H, El Kabbaj S, Ibrahimi A, Tigaud S, <u>Vandenesch F</u>, Claris O, Picaud JC, <u>Laurent F</u>. Diffusion mondiale du clone Staphylococcus capitis NRCS-A en réanimation néonatale : caractérisation moléculaire, analyse génomique et histoire évolutive. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Tasse J, Bietrix J, Haenni M, Sapin A, Saffroy L, Coppe B, Pirart F, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Madec JY, Laurent F. Persistance et diffusion des souches de *S. aureus* possédant le gène *mec*C dans les exploitations laitières de la région de Nancy. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France</u>

<u>Valour F</u>, Riffard N, <u>Trouillet-Assant S</u>, <u>Rasigade JP</u>, Chidiac C, <u>Vandenesch F</u>, Ferry T, <u>Laurent F</u> pour le Lyon BJI study group. Action intra-ostéoblastique des antistaphylococciques : un nouveau paramètre à prendre en compte dans le traitement des infections ostéo-articulaires ? 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Tristan A, Bouchiat C, Bes M, Mouly D, Delmas J, Giron S, Bardon G, Letertre-Gibert P, Vaux S, Laurent F, Coignard B, Baud O, Vandenesch F. Première épidémie d'infections communautaires à SARM USA 300 en France. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France</u>

<u>Bietrix J, Tasse J, Sapin A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Douay G, Laurent F.</u> Primates et soigneurs du zoo du Parc de la Tête d'Or de Lyon : portage, résistance et transmission des clones de *Staphylococcus aureus*. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

Beraud L, Martin E, Muggeo A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Laurent F, Lina G, Dumitrescu O. Étude de l'influence des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l'expression des PSMα chez *Staphylococcus aureus*. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Butin M, Rasigade JP</u>, Bensaïd M, <u>Martins Simões P</u>, Tigaud S, <u>Vandenesch F</u>, Claris O, <u>Laurent F</u>, Picaud JC. Multirésistance et adaptation rapide à la vancomycine chez *Staphylococcus capitis* responsable de sepsis néonatal tardif : conséquences en termes de choix thérapeutiques. Journées Francophones de Recherche en Néonatologie, Décembre 2013, Paris, France

#### (iii) Communications internationales

Charretier Y, Francesch C, <u>Dauwalder O</u>, Fortin T, Lacoux X, Zambardi G, Beaulieu C, Degout-Charmette E, Perrot N, Cecchini T, Dechaume D, Theret A, Pons S, Girard V, Salvador A, Durand G, Chatellier S, Gervasi G, Lemoine J, <u>Vandenesch F</u>, Charrier JP. Rapid screening of antibiotic resistance mechanisms and virulence factors: a new mass spectrometry application for the clinical use? Mass Spectrometry: Application to the Clinical Lab (MSACL), 9-13 février 2013, San Diego, USA

Grare M, Ouhammou K, Riu B, Georges B, Cointault O, Bouvet E, Cavalie L, <u>Dumitrescu O</u>, <u>Meugnier H, Reverdy ME</u>, Archambaud M, <u>Laurent F</u>. Emergence of linezolid-resistance in <u>Staphylococcus epidermidis</u>, mediated by a rare 23S rRNA mutation (T2504A), in intensive

care units patients. 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

Rasigade JP, Sapin A, Trouillet-Assant S, Diep BA, Couzon F, Ferry T, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Laurent F. Phenol-soluble modulins act as intracellular toxins in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

<u>Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Bes M, Chanard E, Lamy F, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F</u> on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group. Unexpectedly high prevalence of the emerging CC398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex in bone and joint infections. 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

Martin E, Raynal B, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O. Impact of antibiotics alone and in combination with a-defensins on CA-MRSA virulence. 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

<u>Tristan A, Geissmann T, Bouchiat C, Bes M, Roy C, Thiberge J, Duval X, Brisse S, Le Moing V, Vandenesch F.</u> Genomic comparison of matched infective endocarditis/blood culture isolates of *Staphylococcus aureus* from a prospective cohort study. 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

Saadatian-Elahi M, Tristan A, Rasigade JP, Bouchiat C, Laurent F, Dauwalder O, Lina G, Etienne J, Bes M, Vandenesch F. Basic rules of hygiene protect healthcare and lab workers from nasal colonization by *Staphylococcus aureus*: an international cross-sectional study. 23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Avril 2013, Berlin, Allemagne

<u>Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Bes M, Lamy B, Chanard E, Verhoeven P, Decousser JW, Vandenesch F, Ferry T, on behalf of the Lyon BJI study group. High prevalence of CC398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in bone and joint infection. 53rd ICAAC, September 2013, Denver, CO</u>

Dupieux C, Rasigade JP, Sapin A, Trouillet-Assant S, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Alpha-type Phenol-Soluble Modulins Contribute to Autophagy Subversion by *Staphylococcus aureus* in Bone Cells. 53rd ICAAC, September 2013, Denver, CO

<u>Butin M, Rasigade JP</u>, Picaud JC, Claris O, <u>Vandenesch F, Laurent F</u>. Rapid Acquisition of a Stable Vancomycin Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* Involved in Nosocomial Bacteremia in Neonates. 53rd ICAAC, September 2013, Denver, CO

(iv) Conférences sur invitations

<u>Laurent F.</u> Les staphylocoques font de la résistance, 41ème Congrès de la Société Française de Réanimation, Janvier 2013, Paris, France

<u>Laurent F.</u> Evolution de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif : Staphylocoques et résistance à la méticilline. SFM, Janvier 2013, Lille, France Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), Janvier 2013, Lille, France

<u>Lina G.</u> L'infection à *Staphylococcus aureus* : infection mono- ou multi-microbienne. 2<sup>ème</sup> journée Ecofect, Février 2013, Lyon, France

<u>Laurent F</u>. Small Colony Variant et IOA. Journée du centre Régional de prise en charge des infections ostéo-articulaires complexes, Mars 2013, Lyon, France

Rasigade JP. Actualités sur la prise en charge des infections néonatales tardives à staphylocoques à coagulase négative. 43èmes Journées Nationales de Néonatologie, Mars 2013, Paris, France

<u>Laurent F</u>. Diagnostic des IOA : du prélèvement à la biologie moléculaire. Soirée Albert Trillat de Chirugie Orthopédique, Avril 2013, Lyon, France

<u>Lina G.</u> agr functionality: predictor of infection complications and resistance? Fourth ISC MRSA Consensus Conference, April 2013, Catania, Italy

<u>Laurent F</u>. *Staphylococcus aureus*: actualités 2013. BacterioCercle Breton, Mai 2013, La baule, France

<u>Laurent F</u>. Impact du biofilm dans les infections ostéo-articulaires à staphylocoques, JNI, Juin 2013, Clermont-Ferrand

<u>Laurent F.</u> Staphylocoques et résistances : tous des mecs? JNI, Juin 2013, Clermont-Ferrand

<u>Laurent F.</u> The alphabet of mec in Staphylococcus: mecA et al. 5th Congress of European Microbiologists –FEMS, July 2013, Leipzig, Germany

<u>Vandenesch F.</u> Pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* : du case report au PHRC. Journée Recherche des Hôpitaux de Lyon, September 2013, Lyon, France

<u>Laurent F.</u> Staphylocoques : quelles résistances pour quelles options thérapeutiques ? Congrès du SNPHP, Septembre 2013, Marseille, France

<u>Vandenesch</u> F. Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: from case report to pathophysiology and translationnal interventions. Séminaire du centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, October 2013, Lille, France

Laurent F. IOA et biofilm. Journée scientifique du CRIOGO, Octobre 2013, Brest, France

<u>Laurent F.</u> Epidémiologie des endocardites et impact du biofilm, Journée scientifique des endocardites infectieuses, Novembre 2013, Paris, France

<u>Vandenesch</u> F. Facteurs bactériens liés à la survenue d'une endocardite au cours de bactériémies à *Staphylococcus aureus*. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2013, Paris, France

<u>Vandenesch F.</u> Des pneumonies communautaires sévères à *Staphylococcus aureus*. 56ème Journée de l'Hôpital Claude Bernard, Novembre 2013, Paris, France

<u>Tristan A</u>. Situation nationale des syndromes de choc toxique. Journées régionales de veille sanitaire des Pays de la Loire, Décembre 2013, Nantes, France

<u>Dumitrescu O</u>. Effets des antibiotiques et peptides antimicrobiens sur la virulence de *S. aureus*. Journée Infections Nosocomiales Lyon Biopôle – FINOVI, Décembre 2013, Lyon, France

<u>Vandenesch</u> F. MRSA from hospitals to livestock: what did genomic say ? Colloque Génomique et Résistance nosocomiales. Institut Pasteur, Décembre 2013, Paris, France

## 7 <u>Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène</u> alimentaire, environnementaux

- Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR
- Échanges techniques entre le CNR et le LNR ? (préciser échanges de souches, échanges méthodologiques...)
- Projets partagés (études, comité scientifique, groupe de travail ou d'experts .. ?) où le CNR et le LNR apportent et échangent leur expertise

#### **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 pérenne dans le temps visant à suivre l'implication des souches à la fois dans la colonisation et les infections animales. Le CNR assure la caractérisation de l'ensemble de souches de MRSA identifiées par l'ANSES Lyon via le réseau RESAPATH.

En 2011, une première étude rétrospective avait été conduite en collaboration sur les animaux de compagnie. Ainsi, sur une période de 5 ans, nous avions pu établir que la prévalence des infections à SARM chez les chiens et les chats était globalement faible (<2%), et que la distribution des clones reflète très largement l'épidémiologie humaine. Ces résultats suggèrent donc que les animaux de compagnie sont à la fois victimes et vecteurs potentiels de SARM humains épidémiques, endémiques et/ou invasifs et que ce réservoir ne doit pas être méconnu dans l'exploration et la gestion des infections staphyloccciques notamment en cas de formes récidivantes ou epidémiques intra-familiales ou au sein de collectivités. En 2012, nous avons décidé de poursuivre ce projet et d'assurer sur la période 2012-2014 une recueil plus large des souches animales de SARM via le réseau RESAPATH de l'ANSES en étendant le recueil notamment vers les chevaux qui constituent à la fois une activité économique importante au sens large mais aussi une activité de loisir en lien avec la communauté, qui pourrait potentiellement constituer une source de transmission et de colonisation de l'Homme. Pour 2013, nous avons reçu 108 souches isolées d'infections ou de portage de chiens, chats, chevaux et bovins principalement. Cinq souches mecC ont été caractérisées : 4 MRSA CC130 mecC (1 cheval, 3 vaches) et une mecC MRSA CC49 mecC (1 cheval). Cinquante trois souches des SARM appartenant au complexe clonal CC398. Trente et une souches de SARM appartenaient au complexe clonal CC8 (20 clones Lyon principalement isolés chez des chiens et des chats, et 9 USA500 isolés chez des chevaux).

Nous allons bien sûr poursuivre cette collaboration en 2014 afin de continuer à survieller l'émergence de nouveaux clones chez les animaux.

## Lémuriens et soigneurs du zoo du Parc de la Tête d'Or de Lyon : portage, résistance et transmission de *Staphylococcus aureus*.

Si de nombreux travaux se sont intéressés à la spécificité d'hôte des clones de *S. aureus* et à la capacité de transmission inter-espèce chez les animaux de rentes ou de compagnie, peu de données sont à ce jour disponible pour les animaux sauvages en captivité. C'est dans ce contexte que le CNR en collaboration avec Le parc de la Tête d'Or - Jardin Zoologique de Lyon, et notamment le docteur Guillaume Douay (VetD, Directeur Adjoint Jardin Zoologique de Lyon) a conduit une étude ciblée dont le but a été i) d'étudier le portage de *S. aureus* chez des lémuriens du zoo de Lyon, ii) de le comparer avec celui des soigneurs iii) d'évaluer les transferts éventuels des clones de SA entre ces deux groupes.

Des écouvillons nasaux (EN), pharyngé (EP), et rectaux (ER) ont été collectés chez 22 lémuriens. Des écouvillons nasaux ont parallèlement été réalisés sur l'ensemble des soigneurs et des vétérinaires du parc (n=22). Après enrichissement (BCC-NaCl 5%, 37°C, 24h), un isolement sur gélose chromID *S. aureus* (bioMérieux) a été réalisée. L'identification des colonies présentant une coloration spécifique a été confirmée par Maldi-TOF et leur résistance éventuelle à la méticilline (SARM) a été recherchée par PCR ciblant les gènes *mecA* et *mecC*. Les souches de SA ont ensuite été caractérisées par puce à ADN (Alere Technologies).

Au total, 14 des 22 lémuriens étaient porteurs de *SA* (EN, n=8; EP, n=8; ER, n=6). Toutes les souches étaient sensibles à la méticilline (SASM), appartenaient au complexe clonal CC49 et présentaient un profil identique en puces à ADN. Quatorze des 22 soigneurs étaient porteurs de *SA* dont 12 étaient des SARM, appartenant aux complexes clonaux CC5 (clone "Pédiatrique", n=11) et CC398 (n=1), les deux souches restantes étant des SASM CC398 et CC30.

Les résultats de cette étude montrent que prévalence du portage du *S. aureus* chez les lémuriens du zoo de Lyon est élevée au niveau nasal, pharyngé et rectal. Le clone CC49, classiquement associé au portage chez l'animal, semble avoir largement disséminé chez les lémuriens, sans qu'un transfert chez les soigneurs à leur contact ne soit mis en évidence. Parallèlement, chez les soigneurs, la forte prévalence de SARM (63%) et notamment du clone Pédiatrique (52%) est inattendue. Cette épidémiologie particulière pourrait s'expliquer par l'existence d'un réservoir animal au sein du zoo autre que les lémuriens. Cette hypothèse est en cours d'investigation en réalisant des prélèvements de façon plus large au sein des animaux du zoo. Toutefois, ce clone de SARM étant classiquement présent chez l'Homme, une dissémination interhumaine sur le lieu de travail à partir d'un des soigneurs est privilégiée. Là encore, des travaux complémentaires sont en cours notamment pour comprendre les facteurs de risque associés au portage chez les soigneurs (prise de repas sur place, douche sur le lieu de travail, ...) et pour élargir l'étude à l'entourage familial des soigneurs.

## Etude épidémiologique des souches de *S. aureus* résistant à la méticilline possédant le gène *mecC* dans les exploitations laitières de la région de Nancy.

Un nouveau gène conférant la résistance aux  $\beta$ -lactamines appelé mecC a récemment été décrit chez S. aureus (SA). Les souches isolées chez l'Homme sont l'objet d'une attention particulière du CNR des Staphylocoques, même si leur prévalence semble actuellement très faible. En France, seulement deux cas chez l'animal ont été rapportés, le premier en 2008 et le second en 2011, mais toutes les deux dans des exploitations laitières de Meurthe-et-Moselle distantes de 15 kilomètres. L'objet de l'étude conduite était de rechercher la présence de souches de SARM mecC+ dans ces deux fermes, ainsi que dans les exploitations aux alentours, afin d'étudier l'épidémiologie et la dissémination de telles souches

Dix-sept fermes ont participé à l'étude entre Janvier et Mars 2013. Des écouvillons nasaux (EN), rectaux (ER) et des échantillons de laits (EL) ont été collectés dans chaque ferme, sur dix vaches aléatoirement sélectionnées. Vingt et un exploitants et sept animaux de compagnies ont également été testés respectivement dans douze et sept fermes. Les prélèvements ont été déchargés dans un bouillon cœur cervelle contenant 5% de NaCL et incubés une nuit à 37°C. Le lendemain, une gélose chromID MRSA (bioMérieux) et une gélose BrillianceTM Staph24 (OXOID) ont été ensemencées avec 100µL de l'enrichissement. Les colonies présentant une coloration spécifique ont été réisolé sur gélose au sang (bioMérieux) et identifier en Maldi-TOF (Vitek MS, bioMérieux). Une PCR triplex ciblant le gène *nuc* (marqueur spécifique de *SA*), le gène *mecA* et le gène *mecC* a été réalisé sur les SA. Les souches *mecC* positives ont été caractérisées par puce à ADN (Alere Technologies).

Au final, trente-neuf souches de *S. aureus* ont été isolées (EN (n=9), ER (n=4), EL (n=18), co-colonisation EN + EL (n=4)) dans 10 des 17 exploitations testées. Parmi celles-ci seulement sept présentaient une résistante à la méticilline (SARM), conféré exclusivement par le gène *mecC*. Ces 7 souches ont été isolées à partir de deux (EN (n=2), EL (n=1)) et quatre (ER (n=1), EL (n=3) vaches dans les deux fermes pour lesquels des souches *mecC* avaient déjà été trouvé en 2008 et 2011. Toutes les souches de SARM mecC+ appartenaient

au complex clonal CC130. Aucun éleveur ni animaux de compagnies n'étaient porteur de MRSA

Cette étude a permis de mettre en évidence la capacité des souches possédant le gène mecC à persister pendant plusieurs années (>5ans) au sein d'une même exploitation. De plus les données recueillies montrent que ces souches peuvent coloniser plusieurs sites (lait, nez, tube digestif) et peuvent être responsable de mammite bovine sans toutefois atteindre l'intégralité du troupeau. Il est important de noter que la dissémination à d'autres exploitations à proximité des exploitations concernées semble être limitée puisqu'aucune des autres exploitations échantillonnées autour des deux exploitations "positives" ne présentaient de souches SARM mecC+. Une large étude incluant un plus grand nombre de fermes et actuellement en cours pour approfondir les données sur ces souches, notamment en ce qui concerne la contamination de l'environnement des animaux porteurs ou infectées par les souches de SARM mecC+ et le risque de transmission aux exploitants et/ou à son entourage familial.

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

Fournir les perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N + 1 et N +2

Le CNR poursuivra en 2014 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal.

#### En matière d'outils diagnostiques, le CNR a notamment pour objectif de :

- poursuivre l'évaluation de différents tests développés par les industriels en matière de détection de *S. aureus*, de ses facteurs de virulence ou de résistance par toutes méthodes, y compris la spectrométrie de masse (MALDI-TOF et ESI-MS) ou les techniques de PCR en temps réel automatisées,
- en lien avec le CNR de la résistance, réévaluer l'ensemble des techniques publiées de détection de la résistance en préparation des modifications prévues par le CA-SFM dans le cadre de l'harmonisation avec l'EUCAST, notamment pour les bêta-lactamines et les glycopeptides,

#### En matière d'organisation interne, le CNR sera amené à:

- poursuivre la réflexion approfondie sur le fonctionnement et l'organisation fonctionnelle du CNR en lien avec son transfert sur le centre de biologie de l'Hôpital de la Croix Rousse où sera crée en 2016 l'Institut des Agents Infectieux qui regroupera l'ensemble des activités de bactériologie, virologie, parasitologiemycologie des Hospices Civils de Lyon ainsi que les CNR des staphylocoques, des légionnelles, de la grippe et des entérovirus.
- finaliser le projet de Département Hospitalo-Universitaire "Infectious agents and Infections" qui réunira plusieurs axes de recherche fondamentaux et cliniques notamment autour des axes "infections respiratoires", infections ostéo-articulaires" et "sepsis" dont le CNR des staphylocoques constituera l'un des éléments moteurs et à qui le CNR apportera son support et sa visibilité.

#### En matière de caractérisation clinico-biologique, le CNR se propose de :

- poursuivre l'enquête du PHRC pneumonies à *S. aureus* communautaires sévères afin de répondre aux objectifs épidémiologiques, cliniques et génétiques (génétique bactérienne et génétique humaine) de ce projet (cf supra),
  - surveiller avec vigilance les souches de SARM communautaires, notamment

USA300 dont le prévalence semble en augmentation, qui sont à l'origine de bouffées épidémiques et dont l'émergence en France est source d'inquiétude,

- poursuivre la caractérisation clinico-biologique fine des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* en lien avec le Centre de Référence de prise en charge des Infections Ostéo-Articulaires complexes Rhône-Alpes Auvergne dont le référent "microbiologie" est F. Laurent, directeur adjoint du CNR.

En matière de surveillance à travers les réseaux nationaux et internationaux, le CNR poursuivra en collaboration ses actions habituelles de surveillance. Il initiera cependant des projets propres :

- projet de cohorte sur *S. capitis* en collaboration avec les CHU. Il s'agira d'une étude épidémiologique clinique et microbiologique des bactériémies à *S. capitis* en unités de soins intensifs néonatales en France. L'objectif principal sera d'analyser les facteurs prédictifs de portage digestif et de bactériémies à *S. capitis* résistants à la méticilline ainsi que le devenir des patients infectés
- en 2013-2014, le CNR envisage de renouveler avec l'ONERBA une étude de prévalence des clones ST80 et ST5 « Géraldine » du type de celle réalisée en 2008 afin de disposer d'éléments précis de la dynamique de ces clones émergents actuellement dans la population française
- La surveillance et l'étude des infections cutanées seront poursuivies en collaboration avec Dr Del Guidice, service d'Infectiologie-Dermatologie du centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus-Saint-Raphaël avec qui le CNR a mis en place une collaboration depuis de longues années. Les travaux conduits seront réalisés dans le cadre d'une étude longitudinale de ces infections et porteront sur : le suivi prospectif de l'évolution des SARM communautaires, l'incidence annuelle des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*, la prévalence des *Staphylococcus aureus* dans les impétigos et étude de la corrélation clinique-toxine dans ces formes cliniques, le suivi prospectif du risque de transmission croisée des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*, l'étude des souches responsables d'infections cutanées récidivantes et la caractérisation des toxines impliquées dans les cellulites à *Staphylococcus aureus*,.Ce dernier projet bénéficie d'un financement européen dans le cadre d'un projet collaboratif (EU-FP7-Health : Improving Outcome of Necrotizing Fasciitis: Elucidation of Complex Host and Pathogen Signatures that Dictate Severity of Tissue Infection).
- Etude sur les furonculoses familiales récidivantes: dans le cadre de notre collaboration avec les pédiatres de l'hôpital femme/mère/enfant de Lyon, nous allons poursuivre le suivi des familles présentant des furonculoses récidivantes et tenter de mieux comprendre pourquoi certains membres de ces familles ne présentent jamais d'infections alors que d'autres font des infections récidivantes qu'il est très difficile de décontaminer.
- Etude ciblée sur la prévalence des SARM au sein des chevaux d'élevage et de centre équestre en lien avec l'ANSES. L'isolement récent d'un nombre important de souches de SARM CC398 chez ces animaux, qui représentent à la fois un poids économiques importants en France, mais aussi une source potentielle importante de transfert Homme-Animal compte tenu de l'engouement actuel pour ce sport de loisir notamment chez les adolescents mérite une attention particulière.

#### En matière de surveillance de la résistance, le CNR a pour projet 2014 :

- d'étudier la sensibilité aux nouveaux anti-staphylococciques sur les souches de SASM, SARM et de SCNRM, qui constituent de nouvelles alternatives thérapeutiques intéressantes,
  - d'étudier à partir des souches collectées au sein d'EARSS le glissement des CMI

aux glycopeptides des souches de SARM et de SASM ainsi que le retentissement concomitant de cette évolution sur les CMI de la daptomycine,

- de mettre en place en 2013 une enquête permettant de recueillir les souches présentant une résistance au linézolide. Cette enquête devra s'intéresser à l'ensemble des espèces de staphylocoques et avoir pour objectif de caractériser les souches/clones correspondants et les pressions à l'origine de leur émergence. Cette étude sera conduite en concertation avec le Centre National de Référence de la Résistance aux antibiotiques.

En matière d'accréditation des laboratoires selon la norme 15189, le CNR poursuivra son investissement dans la démarche qualité et déposera à l'accréditation partielle la détection des gènes codant la PVL en urgence par méthode moléculaire sur Light-Cycler.

#### En matière de recherche en lien avec la problématique du CNR, les objectifs sont de :

- déterminer l'histoire évolutive du SARM USA 300 en France par analyse génomique d'une collection couvrant l'épidémiologie de ce clone depuis son introduction en France. Ce projet, réalisé en partenariat avec l'Institut Pasteur (Ph Glaser) permettra au CNR de se familiariser avec les approches génomiques appliquées aux investigations de cas groupés ; les approches par séquençage génomique devant à moyen terme remplacer les méthodes actuelles basées sur l'ECP ou les puces à ADN.
- dans le cadre du suivi des chocs menstruels au sein du CNR, étudier le microbiome vaginal des patientes ayant présenté un choc toxique staphylococcique menstruel. étudier les facteurs protecteurs et contribuant au portage nasal à *S. aureus* dans les pratiques de soins au sein des personnels hospitaliers
- déterminer les liens de clonalité, l'histoire évolutive et étudier les facteurs de virulence du clone S. capitis NRCS-A par analyse génomique d'une collection couvrant l'épidémiologie de ce clone au niveau mondial. Ce projet, réalisé en partenariat avec le laboratoire de la gendarmerie Royale du Maroc et la Health Protection Agency de Londres.

#### **Annexe 1**

#### 1 Missions & organisation du CNR

#### 1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

#### Apporter une expertise microbiologique :

- développer et diffuser des techniques de typage moléculaire,
- identifier et typer les souches responsables de formes cliniques inhabituelles et les souches multi-résistantes de diffusion clonale et caractériser leurs toxines.
- rechercher et caractériser les toxines dans les prélèvements cliniques et alimentaires, dans le cadre de l'investigation de toxi-infections alimentaires ou d'autres cas groupés,
- identifier de nouveaux génotypes de résistance aux anti-infectieux et caractériser les mécanismes de résistance en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques,
- évaluer et valider en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques, les techniques de détection de la résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques (méthodes standardisées et accessibles à tous les laboratoires), en assurer la diffusion et développer un contrôle de qualité.

## Contribuer à la surveillance épidémiologique des infections et toxémies staphylococciques en lien avec l'Institut de veille sanitaire :

- 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 participant à l'investigation des cas groupés d'infections staphylococciques,
- en collaborant avec les réseaux de surveillance européens et internationaux.

Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire 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.

#### Contribuer aux travaux du réseau national des laboratoires Biotox :

- apporter son expertise spécifique au service des instances concernées de santé publique, de défense et de sécurité nationale ;
- contribuer avec les instances chargées de leur pilotage, à l'animation du réseau des laboratoires Biotox;

• contribuer à la mise en place d'une collection nationale de souches des agents de la menace pour les besoins de la biodéfense.

## 1.2 Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :

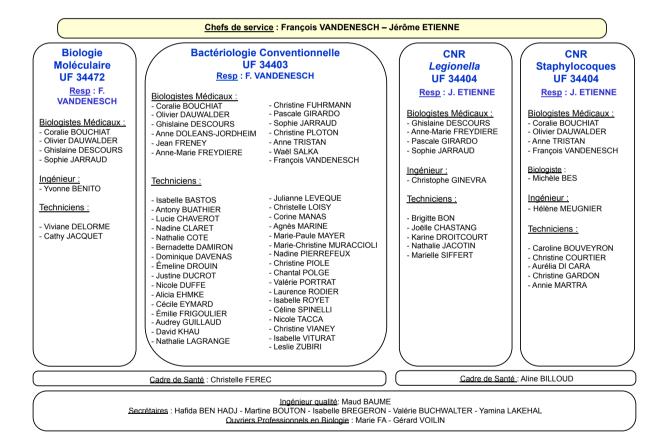
- o Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés
- o Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

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

Personnel consacrant une part de leur activité au	CNR	
Centre de Biologie et Pathologie Est		
Faculté de Médecine Lyon Est		
François Vandenesch – directeur	Tél : 04 72 35 72 52 ou 04 78 77 86 57	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	E-mail: francois.vandenesch@univ-lyon1.fr	
Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon		
Est		
Frédéric Laurent – directeur adjoint	Tél : 04 72 07 18 39	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Nord	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr	
Maître de Conférence- Faculté de Médecine Lyon Est		
Anne Tristan – directrice adjointe	Tél : 04 72 35 76 39	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	E-mail: anne.tristan@univ-lyon1.fr	
Maître de Conférence- Faculté de Médecine Lyon Est		
Jérôme Etienne	Tél : 04 72 12 96 24 ou 04 78 77 86 57	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	E-mail : jerome.etienne@univ-lyon1.fr	
Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon		
Est		
Gérard Lina	Tél : 04 78 86 44 93 ou 04 78 77 86 57	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Sud	E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr	
Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon		
Est		
Yves Gillet	Tél : 04 27 85 56 07	
Praticien Hospitalier – Hôpital Femme Mère Enfant	E-mail: <u>yves.gillet@chu-lyon.fr</u>	
Michèle Bes	Tél : 04 72 12 96 62	
Biologiste contractuel - Centre de Biologie Est	E-mail: michele.bes@chu-lyon.fr	
Olivier Dauwalder	Tél : 04 72 12 96 69	
Praticien Hospitalier – Centre de Biologie Est	E-mail: olivier.dauwalder@chu-lyon.fr	
Oana Dumitrescu	Tél : 04 78 86 30 69	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Sud	E-mail: oana.dumitrescu@chu-lyon.fr	
Maitre de conférence - Faculté de Médecine Lyon Sud		
Jean-Philippe Rasigade	Tél : 04 78 86 30 69	
Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Sud	E-mail: jean-philippe.rasigade@chu-lyon.fr	
Maitre de conférence - Faculté de Médecine Lyon Sud		
Coralie Bouchiat	Tél : 04 27 85 52 57	
Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie	E-mail: coralie.bouchiat@chu-lyon.fr	
Est- Faculté de Médecine Lyon Est		
Céline Dupieux	Tél: 04 72 00 37 04	
Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie	E-mail: celine.dupieux@chu-lyon.fr	
Nord- Faculté de Médecine Lyon Est		
Hélène Meugnier	Tél : 04 72 12 95 80	

Ingénieur - Centre de Biologie Est	E-mail : helene.meugnier@chu-lyon.fr
Mitra Saadatian-Elahi	Tél : 04 27 85 51 48
Epidémiologiste - Centre de Biologie Est	E-mail : mitra.elahi@chu-lyon.fr
Florence Couzon	Tél : 04 78 77 86 57
Ingénieur – U1111, Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : florence.couzon@univ-lyon1.fr
Cédric Badiou	Tél : 04 78 77 86 57
Ingénieur – U1111, Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : cedric.badiou@univ-lyon1.fr
Cadre	
Aline Billoud	
Techniciennes	
Caroline Bouveyron	
Christine Courtier	
Virginie Dumoulin	
Christine Gardon	
Annie Martra	
Aurélia Di Carla	

o Organigramme



1.3 Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés) en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements.

#### 1.3.1 Surface, plan

Le laboratoire de Bactériologie du Centre de Biologie et de Pathologie Est occupe pratiquement la totalité d'un étage soit environ 1000 m2 (plan), auxquels il faut ajouter les surfaces de la laverie-stérilisation commune partagée avec la virologie au 2<sup>ème</sup> étage. Au 3<sup>ème</sup>

étage, des espaces spécifiques sont dévolus aux activités des deux CNR (cf. pièces portant la mention CNR sur le plan ci-dessous) et les CNR bénéficient par ailleurs d'espaces partagés comme ceux dévolus à la biologie moléculaire (MIC 3008, 3009 et 3010), aux antibiogrammes (MIC 3011), à l'enregistrement (MIC 3007<sup>E</sup>), ou aux espaces de secrétariat (zones vertes) et de bureaux (zones bleues). Les CNR bénéficient par ailleurs des infrastructures communes (laverie-stérilisation, informatique commune, secrétariat, plateau de biologie moléculaire, gros équipements techniques comme la MALDI-TOF).

Sur le site Laennec de la faculté de Médecine Lyon Est, le laboratoire INSERM d'une surface de 400 m2 ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR, car le laboratoire est entièrement consacré à l'étude de la physiopathologie des infections staphylococciques.



R+3 Bactériologie

#### 1.3.2 Principaux équipements

Sur le plan des équipements, les principaux équipements dont dispose le CNR qu'ils aient été acquis sur des crédits InVS ou qu'il en dispose du fait de la mutualisation, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à un cytomètre de flux (utilisé pour étudier la réponse des cellules aux effets des toxines de staphylocoque), deux appareils PCR temps réels (Light Cycler), de nombreux thermocycleurs conventionnels, un extracteur d'ADN, des hottes à flux et PSM, des centrifugeuses de différentes capacités, un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des toxines de staphylocoque), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimatsu couplé à la base de données Saramis) et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Les moyens informatiques. 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. Ce logiciel est en cours de déploiement au sein du laboratoire et est une priorité du projet quinquennal.

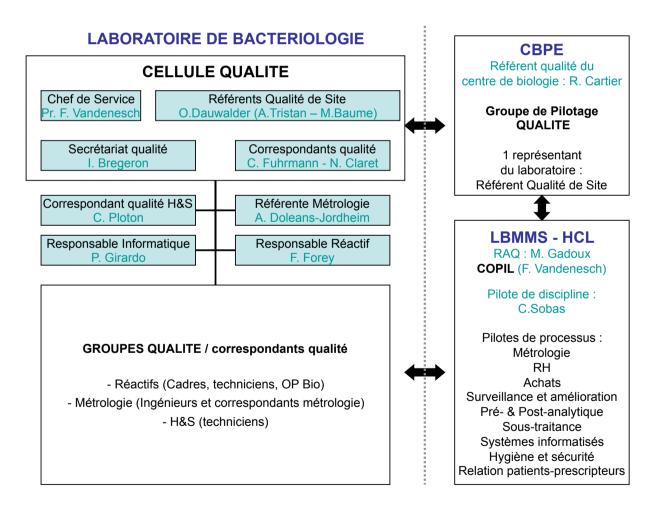
## 1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,...

#### 1.4.1 L'enjeu de l'accréditation

Comme tous les autres laboratoires de biologie, le laboratoire du CBPE est confronté aux enjeux de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. De plus, comme le laboratoire réalise les analyses bactériologiques des eaux en vue de la recherche des légionnelles, nous devons répondre aux normes de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 17025 qui s'impose aux laboratoires pratiquant les analyses bactériologiques des eaux en vue de la recherche des légionnelles. Cette deuxième norme, proche de la 15189, s'applique depuis 2012, et l'expérience de l'accréditation selon cette norme nous est très utile dans la démarche d'accréditation selon la norme 17025.

Le laboratoire de bactériologie a donc mis en place et maintient un Système de Management de la Qualité adapté à ses activités qui sont d'une part des analyses de biologie médicale (régies par la norme NF EN ISO 15189) et d'autre part des analyses environnementales de qualité de l'eau (régies par la norme NF EN ISO 17025)..

#### **1.4.2** Structure qualité du laboratoire



#### **1.4.3** Manuel qualité

Le manuel qualité (MQ) que nous avons rédigé est applicable à l'ensemble des activités du laboratoire de bactériologie comprenant les étapes pré-, per-, et post-analytiques (des activités CNR et hors CNR). Il a pour objet de décrire l'organisation mise en place au laboratoire de bactériologie conformément aux exigences réglementaires, normatives et à

celles de l'organisme d'accréditation; il contient les références des documents clés du système documentaire pour chaque paragraphe et les responsabilités techniques et de management. Il est géré par le responsable qualité, sa revue est faite annuellement afin de le mettre à jour, néanmoins des révisions peuvent être effectuées à tout moment si nécessaire.

#### **1.4.4** Audit et formation qualité.

Les biologistes et les techniciens du CNR des Staphylocoques sont engagés dans une démarche volontaire de formations el lien avec la qualité:

- DU Assurance Qualité de l'Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Lyon (Olivier Dauwalder)
- Formation à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale : la norme NF EN ISO 15189, formation médicale continue des médecins, organisée par les HCL
- Formations à la validation de méthodes, aux contrôles de qualité, habilitation du personnel dans le cadre d'un accompagnement à la démarche d'accréditation par le groupe Else
- Formation technicienne (Métrologie)
- Mise en place de la documentation qualité dans le logiciel Kalilab®

#### 1.4.5 Contrôles de qualité

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

#### 1.4.5.1 Contrôle qualité spa-type SeqNet-RIDOM

Le réseau européen SeqNet et le RIDOM SpaServer organise annuellement depuis 2005, un contrôle qualité du séquençage du gène spa utilisé pour le typage des souches de S. aureus auprès de l'ensemble des laboratoires du réseau SeqNet afin de maintenir le niveau de qualité des séquences déposées dans la base de données SeqNet–Ridom SpaServer. Le CNR des Staphylocoques participe à ce contrôle depuis sa création et a obtenu à chaque contrôle depuis cette date, le niveau maximum « excellent » pour les séquençages réalisés dans le cadre des contrôles. Ceux-ci consistent en l'envoi aux laboratoires participants de 3 ADN anonymes pour lesquels les laboratoires doivent réaliser l'amplification, le séquençage et l'analyse sur le site Ridom SpaServer. L'ensemble des résultats est alors automatiquement colligé directement sur le site Ridom et analysé par le coordinateur du contrôle qui assure une rétroinformation individuelle en direction de chaque laboratoire participant.

#### 1.4.5.2 Contrôle qualité « European SRL »

Le CNR fait partie des 5 laboratoires européens « fondateurs » à l'initiative de ce contrôle. Il est né de la volonté des laboratoires européens de référence des Staphylocoques (SRL) d'assurer un niveau de qualité exemplaire pour les analyses de base réalisées. Chaque CQ annuel est constitué de 15 souches envoyées à l'ensemble des laboratoires participants qui en retour doivent transmettre au minimum pour chaque souche au centre coordinateur (Scottish MRSA Reference Laboratory, Bonnie Cosgrove) les résultats obtenus pour les techniques suivantes :

- . l'antibiogramme standard
- . le typage *spa* selon la nomenclature Ridom
- . la PCR mecA et PCR PVL
- . le typage de la cassette SCC*mec*

Les résultats saisis sur une fiche standardisée sont accompagnés d'un descriptif des techniques utilisées.

En 2012, aucun contrôle de qualité n'a été réalisé dans ce cadre, le centre coordinateur n'ayant pu pour des raisons de manque de personnels assurer la gestion de l'organisation du contrôle de qualité.

#### 1.4.5.3 Contrôle qualité franco-belge

En collaboration avec nos collègues belges du Centre National de Référence des Staphylocoques à Bruxelles, nous avons mis en place un Contrôle qualité incluant 5 souches de *S. aureus* préalablement caractérisées à Bruxelles ou au CNR. Le choix des 5 souches a été réalisé par une personne ne participant pas au contrôle de qualité au sein chacun des laboratoires et sont adressées après anonymisation aux deux laboratoires.

Les tests suivants étaient requis :

Tests phénotypiques : identification MALDI, CMI à l'oxacilline et à la mupirocine, antibiogramme (pénicilline, oxacilline, céfoxitine, gentamicine, kanamycine, tobramycine, acide fusidique, cotrimoxazole, ciprofloxacine, minocycline, tétracycline, rifampicine, érythromycine, clindamycine, mupirocine, chloramphenicol et linézolide), recherche de PBP2a

Tests génotypiques : détection moléculaires des gènes de résistance: *mec*A, *mec*C, *nuc*, 16S staphylocoque, *mup*A, *cfr* (linézolide), *luk*S-PV et *luk*F-PV (PVL), *tst* (TSST-1), *eta*, *etb*, *etd*, *arc*A, *seh*, *aph*A3, *aad*C, *aac*A-*aph*D, *erm*A, *erm*C, *msr*A *evat*B, *tet*K, *tet*M ; PCR pour la détermination du type SCC*mec*, *spa* typing

#### 1.4.5.4 Mise en place d'un contrôle de qualité français

Nous avons mis en place un contrôle avec un laboratoire français souhaitant évaluer ses techniques de détection de la résistance à la méticilline et des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine. Ce contrôle sera renouvelé chaque début d'année.

### **Annexe 2**

#### 2 Capacités techniques du CNR

### 2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

#### **2.1.1** Techniques d'identification

#### PCR agr

Le système *agr* (*accessory gene regulator*) est une voie de signalisation à deux composants 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 pour toute souche arrivant au CNR<sup>16</sup>.

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

La spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF est une technologie permettant l'identification rapide des bactéries pathogènes sur la base d'un profil protéique obtenu avec un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry). L'évaluation réalisée en 2011 avait permis de démontrer que la SM MALDI-TOF est un outil adapté pour l'identification des staphylocoques à coagulasse négative classiquement rencontrés en clinique par rapport à l'identification conventionnelle et est maintenant utilisé en première intention au sein du CNR, l'identification moléculaire, qui reste la méthode de référence mais est longue et coûteuse, est dorénavant réservée à un nombre limité de souches non identifiées par SM<sup>17</sup>.

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

Le séquençage du gène *tuf* a été retenu comme méthode moléculaire d'identification pour son bon pouvoir discriminant. Son utilisation a été validée à partir d'une collection de 186 souches de staphylocoques du CNR<sup>18</sup>. Cette technique est utilisée au CNR pour les souches pour lesquelles la SM MALDI-TOF n'a pas permis une identification.

#### 2.1.2 Techniques de caractérisation de la virulence

#### Puces à ADN

La société Alere propose une version simplifiée et adaptée de la technique de puce à ADN permettant une analyse génomique des souches de *S. aureus*. Il s'agit de puces placées au

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Lina G et al. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):18-23.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Bergeron M et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-54

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Bergeron M et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-54

fond de cupules au format d'une barrette de type ELISA à 8 puits (ArrayStrip, 8 puces/barrette). Son utilisation repose sur l'amplification de 185 gènes de *S. aureus* grâce à une réaction d'amplification linéaire multi-multiplex dans un tube unique. Après amplification/marquage, les fragments amplifiés sont hybridés sur une puce comportant plus de 600 spots représentant 332 gènes ou allèles de gènes. Après lavage, l'hybridation spécifique entre les sondes immobilisées de la puce et les fragments amplifiés marqués est détectée par un lecteur dédié (ArrayMate®, Alere). L'ensemble du protocole permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée. Ces kits (Identibac *S. aureus* Genotyping ®) sont distribués en France par la société Alere et devraient disposer prochainement d'un marquage CE.

Dans le domaine des facteurs de virulence, la puce Identibac *S. aureus* Genotyping ® assure la détection :(i) de l'ensemble de toxines staphylococciques connues à ce jour ainsi que de certains variants ; (ii) de 62 adhésines ou variants d'adhésines, (iii) de gènes impliqués dans la formation de la capsule et du biofilm, (iv) de gènes codant les protéases et autres facteurs de virulence (auréolysine, exfoliatine, ACME,...), (v) de gènes régulateurs (*agr*, *sae*R/S, *vra*R/S, *sar*A). L'utilisation de cet outil moléculaire innovant assure une caractérisation extensive des facteurs de virulence des différents clones circulants en France et une exploration des supports moléculaires des différentes formes cliniques d'infection staphylococcique. Cet outil permet aussi d'analyser les gènes de résistance aux antibiotiques (voir ci-après dans le document) et d'assurer un assignement de la souche testée aux clones épidémiques et pandémiques de SASM et SARM présents dans une base de données dédiée.

Le CNR des Staphylocoques a été le premier à se doter de cet outil moléculaire et est actuellement le seul en Europe à l'utiliser en routine pour toutes les souches reçues. Le CNR participe d'ailleurs à son développement technologique et informatique (databases et outils bioinformatiques) en lien avec la société Alere.

#### **PCR** toxine simplex

En cas de résultat douteux avec la puce à ADN pour un des gènes codant les toxines staphylococciques majeures, le CNR conserve en technique de recours des PCR simplex avec révélation en gel pour les toxines suivantes (sea, seb, sec, sed, sel, sem, seo, sep, seq, ser, eta, etb, etd, tst, pvl)

#### PCR toxine PVL en urgence sur souche

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 technique développée en 2011 utilise une extraction rapide à l'achromopeptidase et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *luk*SF-PV. L'utilisation de SYBR GREEN, capable de s'intercaler dans l'ADN double brin, assure la révélation des produits d'amplification. Le résultat réalisé en urgence est disponible en 3 heures et est transmis par téléphone au laboratoire prescripteur.

La mise à disposition d'un tel outil permet 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.

# Recherche d'entérotoxines staphylococciques de type A à E dans les vomissures (extraction par dialyse-concentration et détection par le kit RidaScreen set Total, R-biopharm R4105)

Avant de procéder à cette détection, Il est important de veiller aux bonne conditions de réception et de conservation de l'échantillon à tester : il faut, si possible, demander un prélèvement congelé à - 20°C ; si ce n'est pas le cas, le mettre à 4 °C et le traiter le plus vite possible (1 à 2 jours maximum après la réception). Il faut refuser l'analyse si le pH de l'échantillon est inférieur à 3 ou supérieur à 9 (les toxines éventuellement présentes seraient dénaturées). Les extraits peuvent être gardés 48 h à +4°C avant d'être testés par le kit RidaScreen Set Total. Le traitement de l'échantillon nécessite une concentration par dialyse pendant 1 nuit plus 3 heures pour la réalisation avant lecture du test.

Nous avons adapté l'utilisation du kit pour la détection simultanée des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* de type A à E (SEA, SEB, SEC, SED et SEE) dans le liquide gastrique; à l'origine ce kit est préconisé pour la détection de ces toxines dans des aliments et les cultures bactériennes. Il s'agit d'un kit de dosage immunoenzymatique en format sandwich de type ELISA. Des anticorps spécifiques (des 5 toxines précitées) purifiés sont coatés dans les puits; ils peuvent capturer les entérotoxines présentes dans les échantillons testés. Les composants de l'échantillon qui ne sont pas capturés par les anticorps sont éliminés au moment du lavage. Les résultats peuvent être lus visuellement et à l'aide d'un lecteur de microplaque à 450/630 nm (photomètre).

Le fabricant décrit des limites de détection de 1 ng/ml et de 2 ng/mL en chargeant différents aliments avec de l'entérotoxine E. Dans notre étude, nous avons chargé sériellement des liquides gastriques (pool de 23 liquides gastriques de pH ajusté à 7.4) avec les 4 entérotoxines A, C, D et E. Nous n'avons pas testé l'entérotoxine B. Nous avons ensuite procédé à leur extraction et concentration par dialyse selon les recommandations de JA Hennekine (ANSES). Les tests ont été effectués en duplicat sur des volumes de 10 mL, 5 mL et 1 mL de liquide gastrique (Lq).

Nos résultats montrent qu'en partant de 10 mL de Lg chargé avec les 4 entérotoxines (A, C, D et E) indépendamment, le seuil de détection des entérotoxines est de 1.25 ng/mL pour SET A, 2.5 ng/mL pour SET C et SET D et 4 ng/mL pour SEE. En chargeant 5 mL de Lg avec SEA, nous observons que le seuil de détection de SEA dans 5 mL de Lg est de 2.5 ng/mL et en chargeant 1 mL de Lg avec SEA, le seuil de détection est de 12.5 ng/mL.

Ces résultats ont montré qu'il est possible de détecter des entérotoxines (SEA, SEC, SED et SEE) de façon optimale en traitant un volume de liquide gastrique égal à 10 mL et faire en priorité une lecture visuelle du test qui s'est révélée plus sensible que la lecture photométrique (données du laboratoire).

#### **2.1.3** Techniques immunologiques

#### Sérologies PVL et TSST-1

Le CNR a développé deux techniques sérologiques de type ELISA pour l'aide au diagnostic et au suivi des pathologies associées à la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) (infections suppuratives sévères) et à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) (choc toxique menstruel (MTSS) chez les femmes jeunes ne possédant pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine). Au seuil de 4900 UA, un diagnostic rétrospectif d'infection à *S. aureus* PVL+ est possible avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 90%.

Pour la TSST, un taux de 0 UA est retrouvé chez toutes les patientes ayant présenté un MTSS, contre seulement 5% des témoins (n=10 /200), et 9,4% des femmes de 18 à 40 ans (n=5 /53). Face à une clinique évocatrice, l'absence d'anticorps anti-TSST-1 est donc en faveur du diagnostic de MTSS. En 2011, ces techniques ont répondu à une attente réelle de la part des cliniciens confrontés au diagnostic de ces pathologies, avec 70 analyses effectués pour 30 hôpitaux français et plusieurs hôpitaux européens. La méthode de sérologie PVL a également fait l'objet d'un transfert de technologie à Brisbane, Australie.

Détermination des 24 principaux « répertoires  $V\beta$  » du récepteur T des lymphocytes T pour le diagnostic des chocs toxiques staphylococciques et l'identification de la toxine superantigénique staphylococcique impliquée dans le tableau clinique.

Staphylococcus aureus peut exprimer un grand nombre de toxines douées de propriétés superantigéniques. Les plus connues sont : la toxine du choc toxique staphylococcique [TSST-1], les entérotoxines A, B, etc. [SEA, SEB, etc.]. Agissant à de très faibles concentrations, ces toxines ne peuvent être détectées facilement par des techniques conventionnelles. Le CNR-Staph dispose d'une technique développée en interne assurant la mesure de l'expression des répertoires V $\beta$  des lymphocytes T (Ly T) CD3+ comme outil de diagnostic et de confirmation des chocs toxiques staphylococciques (et streptococciques en raison de la proximité des signes cliniques)<sup>19</sup>. Le CNR a établi une correspondance entre les superantigènes et leurs principaux répertoires V $\beta$  cibles introduisant la notion de « signature V $\beta$  »<sup>20</sup>.

A partir d'un prélèvement de sang total de moins de 24h, l'isolement des cellules mononuclées du sang périphérique permet la détermination des « signatures  $V\beta$  » par cytométrie de flux après marquage par une combinaison d'anticorps monoclonaux. L'analyse dure  $\approx$  4 heures et le délai moyen de rendu est de 24 à 48 heures.

La détermination des répertoires  $V\beta$  du TCR des lymphocytes T par cytométrie de flux est le **seul outil de diagnostic biologique** des chocs toxiques staphylococciques (menstruels ou non menstruels) et des chocs streptococciques objectivant l'action des toxines superantigéniques qui doit motiver et justifie l'administration des thérapeutiques anti-toxiniques. L'isolement des souches responsables et de la mise en évidence des gènes de toxines superantigéniques portées peuvent permettre d'aider au diagnostic mais ils sont tardifs et ne permettent jamais de confirmer avec certictude l'expression in situ des toxines bactériennes

#### **2.1.4** Techniques de typage

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

#### Identification des groupes agr

Le système agr (accessory gene regulator) est une voie de signalisation à deux composants qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Un polymorphisme

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Ferry T et al. Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome by detection of the TSST-1 Vbeta signature in peripheral blood of a 12-year-old boy. Pediatr Infect Dis J, 2008. 27(3): p. 274-7.

Thomas D et al. Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. Infect Immun, 2009. 77(5): p. 2043-50.

dans la séquence protéique du récepteur (AgrC) et de l'autoinducteur (AIP dérivé d'AgrD) permet de définir quatre allèles *agr* sur la base d'une PCR multiplex emboitée<sup>21</sup> 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, *agr* 2, *agr* 3 et *agr* 4. Cette PCR qui permet en outre de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *S. aureus* représente le test de base (avec la PCR *mec*A) pour toutes les souches lors de leur arrivée au CNR.

#### Caractérisation de la Cassette SCCmec

L'élément génétique mobile portant le gène *mecA* est appelé cassette SCC*mec* ou « *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* ». Il existe plusieurs types de cassette dont la structure et la taille varient. Elles sont toutes formées de deux éléments essentiels: le complexe *mec* et les gènes codant les recombinases. Le complexe *mec* est composé du gène *mecA*, des éléments de régulation *mecI* et *mecR1*. Des variations ont été détectées, notamment des délétions ou des insertions partielles dans les gènes de régulation de *mecA*, donnant naissance à quatre types de complexes *mec*: classe A, B, C, et D. Les gènes codant les recombinases, responsables de l'intégration et de l'excision de la cassette forment eux le complexe *ccr*. Il est impliqué dans l'intégration au niveau d'un site spécifique des cassettes SCC*mec*. Différents types ont été caractérisés: *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4*, *ccrC1*, *ccrC2*. La combinaison des quatre classes de complexe *mec*, des six types de recombinases, et différents types de jonction J1 (région entre *ccr* et la partie droite du chromosome), J2 (entre *mec* et *ccr*) et J3 (entre *orfX* et *mec*, contenant de nombreux gènes et pseudogènes) permet de définir à ce jour 11 cassettes SCC*mec* différentes, chaque clone de MRSA portant une cassette spécifique unique.

Le CNR dispose d'outils de PCR assurant la détection rapide des différents complexes *mec* et *ccr* (PCR-M1 et PCR-M2 de Kondo) (voir ci-dessous). Cette approche est complétée par les données provenant des puces à ADN.

#### Technique de spa-type

Cette technique est basée sur le séquençage de la région polymorphique de la protéine A qui est le reflet du fond génétique d'un isolat. Des délétions, des insertions, des duplications ou des mutations ponctuelles peuvent ainsi intervenir.

A chaque variation tant de la séquence que du nombre de répétitions de cette région variable de la protéine A, un numéro arbitraire est attribué à l'aide du logiciel « *RidomStaph Type Software* » (<a href="http://www.spaserver.ridom.de/">http://www.spaserver.ridom.de/</a>). 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 ou moins coûteuse, car ne nécessitant le séquençage que d'un seul gène. Cependant, cette méthode est moins discriminante que le PFGE mais présente une meilleure reproductibilité et une plus grande facilité d'échange des résultats inter laboratoire. Ainsi, le typage *spa* est un outil épidémiologique permettant l'étude de l'écologie locale des SARM à l'échelon hospitalier comme l'atteste son utilisation lors d'études épidémiologiques prospectives centrées sur un hôpital. Enfin, un algorithme a été mis au point permettant de faire de l'épidémiologie à long

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Lina G et al. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):18-23.

terme grâce à la détermination de complexes clonaux. Ce logiciel : « BasedUponRepeat Pattern » (BURP) utilise une approche heuristique. Une récente étude comparative avec la MLST et le PFGE a montré une excellente concordance entre ces trois techniques épidémiologiques.

#### Technique de MLST

Elle consiste en un séquençage de 7 gènes d'environ 500 pb impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de l'espèce *S. aureus* (gènes de ménage). Chaque séquence différente représente un allèle auquel un numéro arbitraire est attribué par la base de données MLST (*multilocus sequence type*) (<a href="http://www.mlst.net">http://www.mlst.net</a>) quelle que soit l'origine de la différence, mutation ponctuelle ou large recombinaison. Ainsi, chaque isolat est désigné par la combinaison de sept chiffres formant ainsi le « *Sequence Type* » ou ST ou profil allélique. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement relié entre eux et peuvent être alors regroupés au sein d'une même unité : le complexe clonal (CC). Chaque CC est désigné par le numéro du ST considéré comme l'ancêtre à l'aide du logiciel eBURST® permettant de définir des familles. Cette technique, appliquée à partir de 2000 à *S. aureus* présente de nombreux avantages : une excellente corrélation avec le PFGE, une excellente reproductibilité 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*.

#### **PFGE**

Technique très répandue, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est utilisée lors de l'investigation d'épidémies locales.

Bien qu'ayant un pouvoir très discriminant, elle possède une grande variabilité inter laboratoires ne permettant pas l'échange de données entre les laboratoires et limitant son utilisation dans l'investigation de la dissémination d'un clone de SARM. Le développement de la MLST au CNR a peu à peu remplacé la PFGE. Cette dernière reste d'intérêt uniquement dans les études épidémiologiques comparant la dispersion des souches épidémiques sur une période limitée. L'ensemble des résultats analysés à l'aide du logiciel BioNumerics® permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline.

#### Puces à ADN

Cette technologie apporte aussi une solution innovante au problème de la détection, de l'identification et du typage des clones de *Staphylococcus aureus*. En effet la comparaison de l'ensemble des informations génétiques recueillies grâce à la puce pour une souche clinique donnée 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 :

- . à l'échelle individuelle : la nature du clone impliqué dans la forme clinique rapportée par le prescripteur pour le patient concerné,
- . 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. Elles nous ont ainsi permis de facilement identifier l'introduction en France au cours des 3 dernières années de souches appartenant au clone épidémique américain USA300 ou au clone animal ST398.

#### **PCR CC398**

L'émergence de souches de SARM d'origine animal appartenant au complexe clonal CC398 constitue un problème de santé publique dans de nombreux pays européens notamment du Nord de l'Europe. Ces souches sont à l'origine d'infections humaines qui peuvent être sévères. De telles souches ont été détectées en France, essentiellement chez les animaux pour l'instant. L'un des problèmes rencontrés avec ces souches est la capacité à détecter ces souches et/ou à facilement de confirmer l'appartenance au CC398. Nous avons donc adapté une technique d'amplification ciblant spécifiquement le gène *sau1-hsd*S1 des souches de ce CC décrite par nos collègues danois<sup>22</sup>. Ces auteurs ont démontré sur une collection de 1307 souches, que cette technique présente une sensibilité et une spécificité de 100%. Dans notre laboratoire, nous avons retrouvé les mêmes caractéristiques pour cette PCR. Elle nous a permis de confirmer rapidement l'appartenance à ce complexe clonal de près de 200 souches qu'ils s'agissent de souches de SASM ou SARM d'origine animale ou humaine.

#### 2.1.5 Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques

#### Détection du gène mecA de résistance à la méticilline

Le gène *mec*A est recherché par PCR maison pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative.

#### **Détection PLP2a**

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

#### Détection de la résistance aux glycopeptides

Elle est effectuée seulement pour S. aureus. Sont réalisés :

\* les CMI vancomycine et teicoplanine par E-test® avec inoculum classique sur Muller Hinton,

\* un criblage par E-test® vancomycine et teicoplanine, avec un inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cervelle selon les recommandations 2011 du Comité de l'Antibiotique de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Le CNR dispose aussi des outils pour réaliser la seconde technique proposée par le CA-SFM (recommandations CA-SFM 2011) avec ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton (MH) additionnée de 5 mg/L de teicoplanine, puis dépôt de 10 µL d'une suspension de 6.10<sup>8</sup> UFC/mL (2McFarland), incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures à la recherche de La présence d'au moins 4 colonies permettant de suspecter très fortement le caractère hétéro-VISA. La confirmation définitive se fait par la technique de référence

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Stegger M et al. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying sau1-hsdS1. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):732-4

d'analyse de population<sup>23</sup>. Un témoin négatif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et un témoin positif (*Staphylococcus haemolyticus* CIP 107204) sont utilisés. Néanmoins dans notre expérience, cette seconde technique manque de sensibilité et de spécificité et la technique préférentielle est au sein du CNR celle des CMI E-Test.

En cas de criblage positif, CMI≥ 8mg/L pour la vancomycine et CMI≥ 12mg/L pour la teicoplanine, la conformation définitive repose sur une analyse de population selon la technique d'Hiramatsu :

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

#### Détection du gène vanA/B par PCR

Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une dizaine de souches de *S. aureus* à travers le monde mais son apparition et sa dissémination en France constituent une source d'inquiétude majeure. Le CNR dans le cadre de son rôle d'alerte dispose donc des outils de PCR spécifiques permettant la détection des gènes *van*A, *van*B et *van*C. Ils ne sont utilisés que sur les souches adressées pour sensibilité diminuée aux antibiotiques après confirmation par les méthodes phénotypiques décrites ci-dessus et après avis des responsables du CNR.

Par ailleurs, dans le cadre de son rôle de surveillance continue des résistances, le CNR assure un criblage de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui sont adressées grâce à la puce à ADN (utilisée en systématique) qui comporte des spots dédiés à la détection des gènes *van*A, *van*B, et *van*Z.

#### Détermination de la résistance aux antibiotiques par puces à ADN

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

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Wootton M et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother. 2001 Apr;47(4):399-403. Erratum in: J Antimicrob Chemother 2001 Jul;48(1):161.

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

**Tableau 4** - Ensemble des gènes de résistance détectés avec la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping ® (Alere)

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

. une PCR spécifique ciblant le locus *cfr* qui code une méthylase qui modifie l'ARN 23S<sup>24</sup> à la position 2503 a été développée. Les souches que le CNR a été amené à expertiser étaient jusqu'à ce jour des staphylocoques à coagulase négative adressés pour recherche spécifique du mécanisme associé à une résistance au linézolide détectée phénotypiquement par le laboratoire demandeur. Cette modification confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (Linézolide), Pleuromutilins et Streptogramine A. Ce mécanisme conduit à des hauts niveaux de résistance au linézolide (CMI > 256 mg/L). Le CNR assure par ailleurs un criblage systématique de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui sont adressé, puisque la puce à ADN utilisée dispose d'un spot spécifique pour la détection du gène *cfr*.

. la résistance au linézolide pouvant aussi être associée à des mutations dans la séquence de l'ARN 23S (une vingtaine sont décrites jusqu'à présent), le CNR a développé une approche par PCR-séquençage des régions d'intérêt. L'apparition de ces mutations est corrélée avec des niveaux modérés de résistance au linézolide (CMI 8 – 64 mg/L). Dans ce cas, les valeurs des CMIs au linézolide sont corrélées avec le nombre des copies du gène ARN 23S mutées.

#### Détermination de la résistance à la méticilline par expression du gène mecC

En colloboration avec nos collègues danois, une techniques de PCR permettant l'identification rapide du gène mecC (correspondant à un variant du gène mecA) non détecté par les PCR ciblant le gène mecA a été développée et est disponible au sein du CNR. Il s'agit d'une PCR multiplex (mecA, mecC, nuc, pvI) avec révélation des amplicons en gel d'agarose.

Page **72** sur **79** 

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Morales G et al. Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2010 Mar 15;50(6):821-5.

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

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

#### 2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

L'antibiotype, le typage *agr*, la caractérisation du type de cassette SSC*mec*, le *spa* typing, la MLST, l'analyse des profils de restriction en champ pulsé (PFGE), les puces à ADN et la MLVA sont les principaux marqueurs épidémiologiques disponibles. Le choix parmi ces différentes techniques se fait en fonction du type et du contexte de demandes reçues par le CNR.

#### 2.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

- Description : nombre de souches, caractérisation
- Conditions de stockage
- o Conditions de mise à disposition de ces collections

Le CNR conserve la totalité des souches (congélation à -20 °C) qui lui sont adressées qu'il s'agisse de souches cliniques, de souches type ou de référence. 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* 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 pathologies (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 d'avoir complété la lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques (Annexe 4).

Le CNR conserve également les souches types représentant les différentes espèces de staphylocoques.

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.

## 2.4 Activités portant sur des agents de la menace et dans le cadre du réseau national des laboratoires Biotox

Le CNR des staphylocoques, dans le cadre de ses activités de recherche portant sur les toxines staphylococciques, détient un stock d'entérotoxine B. Cette toxine est inscrite à la liste règlementaire des micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOT) (Arrêté du 30 juin 2010 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique) et est susceptible d'être utilisée comme agent de bioterrorisme. Le CNR dispose des autorisations règlementaires pour l'acquisition, la détention et la mise en œuvre permanente pour cette toxine.

Dans les cadres règlementaires prévus, le CNR assure à ce titre la fourniture d'entérotoxine B aux laboratoires du réseau Biotox-Piratox qui en font la demande afin de calibrer, étalonner ou tester leurs outils de détection ou de dosage.

# **Annexe 3 :** PHRC leucocidine de Panton Valentine : facteur indépendant de gravité des pneumonies à *Staphylococcus aureus*

#### **Investigateur Coordinateur**

Pr. F. Vandenesch@univ-lyon1.fr

Centre National de Références des Staphylocoques

Centre de Biologie et Pathologie Est

59 bd Pinel

69677 Bron cedex

tel: (33) (0)4 72 35 72 52 fax: (33) (0)4 72 35 73 35

#### Collaborateurs référents

Réanimation : Pr. L. Argaud <u>laurent.argaud@chu-lyon.fr</u> Pédiatrie : Dr. Y. Gillet <u>yves.gillet@chu-lyon.fr</u>

Epidémiologie : Dr. M. Saadatian-Elahi Mitra.saadatian-elahi@recherche.univ-lyon1.fr

Responsable Bio-thèque

Dr. M.T. Zabot marie-therese.zabot@chu-lyon.fr

Responsable étude génétique

Dr. C. Picard capucine.picard@inserm.fr

#### synopsis

Titro do l'átudo	Lauranidina de Danton Valentina : Fastaur indépendent de
Titre de l'étude	Leucocidine de Panton Valentine : Facteur indépendant de
	gravité des pneumonies à Staphylococcus aureus.
Promoteur	Hospices Civils de Lyon, Délégation à la Recherche
	Clinique et à l'Innovation. 3, quai des Célestins. BP2251,
	69229 LYON Cedex 02
Centre coordinateur	Centre National de Références des Staphylocoques
	Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 bd Pinel
	69677 Bron cedex
Soutien financier	PHRC interrégional 2010
Etablissements participants	Plusieurs établissements de santé à travers la France(voir
	pages 6 et 7).
Période d'étude	Octobre 2010-Décembre 2013
Design de l'étude	Projet d'étude composé de deux parties
	- Etude épidémiologique de type observationnelle parmi les
	personnes présentant une pneumonie communautaire à
	S. aureus
	- Etude immunogénétique parmi les patients présentant
	une pneumonie à S. aureus producteur de PVL et les
	membres de leur famille
Objectifs	- Confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité
	indépendant des pneumonies à S. aureus.
	- Rechercher une éventuelle prédisposition génétique
	rendant certains patients susceptibles aux pneumonies

	nécrosantes à S. aureus producteur de PVL.
Taille de l'échantillon	
Etude épidémiologique	- 97 patients avec une pneumonie à S. aureus producteur
	de PVL (PVL+) et 97 patients PVL-
Etude immunogénétique	- Tous les patients PVL+ et 130 membres de leur famille
Critères d'inclusion	- Consentement éclairé
	- Sujets affiliés (ou bénéficiaire) à un régime de sécurité
Etude épidémiologique	sociale.
	- Présence de signes cliniques, biologiques et
	radiologiques de pneumopathie à S. aureus dont l'état
	clinique justifie une hospitalisation dans une unité de
Etude immunogénétique	réanimation ou de surveillance continue
	- Présence de S. aureus producteur de PVL
Critères de non inclusion	- Proposants infectés par le VIH
	- Proposants hospitalisés depuis plus de 48 heures au
	moment du diagnostic de pneumopathies,
	- Proposants hospitalisés au cours des trois mois
	précédents excepté en hospitalisation du jour
Analyse des données	- Statistiques descriptives
	- Analyses de survie, régression logistique
	- Analyse de liaison génétique

#### RESUME

Staphylococcus aureus est un agent pathogène colonisant 20 à 30% de la population générale et entrainant un large spectre de maladies. Environ 3% des souches de S. aureus expriment un facteur de virulence appelé la Leucocidine de Panton Valentine (PVL). Les pneumonies nécrosantes à S. aureus producteur de PVL sont des pneumonies sévères mise en évidence pour la première fois en 2002 par notre équipe du Centre National de Référence des Staphylocogues à Lyon. La comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques de 16 cas de pneumonie à S. aureus PVL+ et de 36 cas PVL- a permis de démontrer que cette infection sévère survenait préférentiellement chez des enfants ou des adultes jeunes (âge médian 14.8 ans) avec d'emblée un tableau clinique bruyant nécessitant souvent une en réanimation. Les caractéristiques cliniques l'hyperthermie supérieure à 39°C, la tachycardie supérieure à 140/min, les hémoptysies, les épanchements pleuraux et la leucopénie. L'évolution clinique rapidement défavorable dans plus de la moitié des cas conduisait vers un décès rapide en moyenne moins de 5 jours après le début de l'hospitalisation. Le taux de survie des patients PVL+ était de 25% contre 53% pour les patients PVL-. Néanmoins, la différence en terme de survie n'était statistiquement significative que pour le sous-groupe des patients ne présentant pas de comorbidité. Dans une étude plus récente, basée sur l'analyse d'une cohorte de 50 patients, nous avons montré que les facteurs de mauvais pronostic de la pneumonie nécrosante à S. aureus PVL+ étaient essentiellement la leucopénie et dans une moindre mesure la présence d'hémoptysies. Bien que d'autres études aient montré des résultats similaires et que notre groupe ait mis en évidence le rôle de la PVL dans un modèle murin de pneumonie nécrosante, le rôle de la PVL en tant que facteur de gravité indépendant dans les pneumonies à S. aureus reste un sujet de controverse.

En se basant sur une prévalence de portage nasal de 25%, le nombre de souches de *S. aureus* PVL+ circulantes en France pourrait être d'environ 0.6 Millions. Cependant sur la base des déclarations spontanées au CNR des staphylocoques, moins de 30 cas de pneumonie à *S. aureus* PVL+ sont notifiés annuellement en France. Ceci nous permet de

postuler que les patients présentant ces infections extrêmement sévères pourraient avoir une susceptibilité particulière pour cette bactérie. Par ailleurs, la prévalence de la résistance à la méticilline des souches responsables de pneumonies nécrosantes, qui oriente la stratégie du traitement probabiliste, reste imprécise et a doublé entre l'étude de 2002(6.2%) et celle de 2007 (12%). Dès lors, plusieurs questions se posent :

- La PVL est-elle un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumopathies communautaires graves à *S. aureus* ?
- Quels sont les facteurs (cliniques, biologiques, thérapeutiques) de pronostic favorable associés à la maladie?
- Quel est le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches de pneumonie nécrosante ?
- Existe-t-il une susceptibilité génétique de l'hôte à l'origine de la rareté et de la sévérité de cette maladie ?

Afin de répondre à ces questions, ce projet de recherche comportera une étude prospective de cohorte et une étude immunogénétique. Tous les hôpitaux français seront sollicités pour rapporter les cas définis comme une pneumonie communautaire sévère (nécessitant une hospitalisation) à *S. aureus* producteur ou non de PVL.

Sur la base d'une fréquence attendue de PVL de 10%, le calcul du nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une surmortalité d'un facteur 2 (risque relatif) avec une puissance de 80% et un risque α de 5% donne un nombre minimum de sujets à inclure de 97 patients PVL+ et 97 patients PVL-. L'étude sera donc réalisée sur une période de trois ans afin d'avoir le nombre de sujet requis permettant des analyses statistiques appropriées. Les caractéristiques de la population étudiée seront analysées par des tests de statistiques descriptives tels que pourcentages, test de Chi-2, test *t* de Student, et l'analyse de la variance. Les déterminants associés au pronostic seront analysés par des modèles de survie univariés et multivariés (Cox). Si ces modèles ne peuvent être appliqués pour cause de durée d'observation, une approche par régression logistique pourrait être une alternative.

La partie immunogénétique comprendra tous les patients présentant une pneumonie communautaire sévère à *S. aureus* producteur de PVL et 130 membres de leurs familles et consistera à une prise de sang et un entretien médical. L'arbre généalogique de la famille sera réalisé dans le cadre de cette étude. Des analyses spécifiques de génétique épidémiologique (analyse de liaison génétique) seront menées si l'échantillon recueilli le permet.

# Annexe 4: lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques

#### (A faire en double exemplaire)

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

au Centre National de Référence des Staphylocoques désigné CNRS.

Le CNRS demande que le Demandeur accepte que :

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

- Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
- Le Demandeur s'engage à utiliser le MATERIEL selon les lois et réglementations en cours.
- Le MATERIEL est accessible gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition)

Le Demandeur et le CNRS, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signée étant gardée par le Demandeur et l'autre par le CNRS.

Le Centre National de Référence des Staphylocoques

Nom du la personne autorisée :

En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Staphylocoques,

Adresse: Centre de Biologie et de Pathologie Est, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex

Signature

Le Demandeur :

Nom du la personne :

Organisation:

Adresse:

Signature

Date