

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2015

Centre de national de référence

Directeur : F. Vandenesch

Co-directeurs : F. Laurent et A. Tristan

Année d'exercice

2014

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.

Résumé analytique	5
1 Missions et organisation du CNR.....	7
2 Activités d'expertise	7
2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N.....	7
2.2 Présenter les activités d'expertise de l'année N et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées en précisant notamment :	9
2.2.1 Nombre de souches ou prélèvements réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance en distinguant leur origine le cas échéant et le niveau de caractérisation réalisé	9
2.2.2 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	10
2.2.3 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.....	10
3 Activités de surveillance.....	10
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	10
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.....	10
3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées	11
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	13
3.1.3.1 Choc toxique staphylococcique et scarlatine staphylococcique	13
3.1.3.2 Détermination des « répertoires Vβ » du récepteur T des lymphocytes T	14
3.1.3.3 Syndromes d'exfoliation staphylococciques	15
3.1.3.4 Infections cutanées à <i>S. aureus</i> PVL+	16
3.1.3.5 Furonculoses familiales.....	18
3.1.3.6 Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine.....	18
3.1.3.7 Intoxications alimentaires individuelles et collectives	21
3.1.3.8 Ostéites et infections ostéo-articulaires	21
3.1.3.9 Sérologies PVL et TSST-1	22
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	23
3.2.1 Résultats : distribution en fonction des critères pertinents.....	23
3.2.1.1 Résistance aux bêta-lactamines.....	23
3.2.1.2 Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides.....	24
3.2.1.3 Détection de la résistance au linézolide	25
3.2.1.4 Détection de la résistance à la daptomycine	26
3.2.1.5 Détection de la résistance à la ceftaroline	27
3.2.1.6 Résistance aux macrolides	27
3.3 Participation aux réseaux de surveillance.....	27
3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	28
4 Alerte.....	34
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.....	34
4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	35
4.2.1 Epidémie d'infections cutanées à SARM PVL+ dans un foyer d'hébergement	35
4.2.2 Epidémie d'infection à SARM-co USA300 dans une MAS	36
4.2.3 Epidémies de SARM Géraldine dans plusieurs services de néonatalogie en France	36
4.2.4 Recherche de lien de clonalité.....	37
4.2.5 Emergence et dissémination de clones de staphylocoques à coagulase négative résistants au linézolide.....	37
5 Activités d'information, de formation et de conseil.....	38
5.1 Les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	38
5.2 Les guides élaborés (contenu, modes de diffusion).....	39
5.3 Les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR	39

5.4	Les activités de conseil aux professionnels.....	42
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.....)	42
6	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	44
6.1	Activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	44
6.2	Publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR...51	51
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	60
8	Programme d'activité pour les années suivantes.....	62
Annexe 1	: Missions & organisation du CNR	68
1.1	Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés	68
1.2	Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :.....	69
1.3	Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements.	70
1.3.1	Surface, plan	70
1.3.2	Principaux équipements	71
1.4	Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,...	72
1.4.1	L'enjeu de l'accréditation.....	72
1.4.2	Structure qualité du laboratoire	72
1.4.3	Manuel qualité	73
1.4.4	Audit et formation qualité.	73
1.4.5	Contrôles de qualité.....	73
1.4.5.1	Contrôle qualité spa-type SeqNet-RIDOM	73
1.4.5.2	Contrôle qualité franco-belge	73
1.4.5.3	CQE Européen de l'ESGS	74
1.4.5.4	Mise en place d'un contrôle de qualité français	74
Annexe 2	: Capacités techniques du CNR.....	75
2.1	Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :.....	75
2.1.1	Techniques d'identification.....	75
2.1.2	Techniques de caractérisation de la virulence.....	75
2.1.3	Techniques immunologiques	77
2.1.4	Techniques de typage	78
2.1.5	Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques	81
2.2	Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles.....	83
2.3	Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :.....	83
2.4	Activités portant sur des agents de la menace et dans le cadre du réseau national des laboratoires Biotox	84
Annexe 3	: PHRC leucocidine de Panton Valentine	85
Annexe 4	: Lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques	88
Annexe 5	: ESCMID Postgraduate Education Course	90

Résumé analytique

Il s'agit de présenter, sous forme résumée, les enjeux de santé publique et les axes majeurs de la mission du CNR, les faits marquants, points clefs, et les principaux résultats de l'année N contribuant à la surveillance et à l'alerte. Le format idéal est celui de « l'Executive Summary ». Le résumé analytique doit apparaître au tout début du rapport.

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 2014 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 (2196) souches analysées, 472 souches et 434 ADN distribués avec un nombre de correspondants toujours très élevé

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

- la meilleure connaissance de l'épidémiologie des SARM communautaires par le démarrage d'une étude multicentrique européenne pour déterminer la prévalence des SARM communautaires dans les infections cutanées à *S. aureus* de patients admis dans les services d'urgence. Six pays participent actuellement au recrutement de patients dans le cadre d'une étude pilote coordonnée par le CNR Français.

- la participation active aux réseaux de surveillance européen, le CNR (représenté par le Dr 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 qui a permis d'actualiser les recommandations en matière de gestion des infections à SARM communautaires en France.

- 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'un SympoStaph en 2014 dans la lignée des éditions précédentes et par de multiples interventions didactiques des membres du CNR dans différents congrès (RICAI, JNI,...)

- par la création et l'animation d'un groupe spécifique Staphylocoques au sein de l'*European Society for Microbiology and Infectious Diseases (European Study Group on Staphylococci & Staphylococcal Infections)* dont le coordonnateur est F. Vandenesch (https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/staphylococci/). Ce groupe a d'ores et déjà organisé en 2014 une formation de niveau internationale (responsable F. Laurent), un contrôle de qualité Européen pour les CNR, ainsi que l'étude multicentrique décrite ci-dessus.

- 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 thématifiée 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 la découverte de l'origine ouest africaine du clone de SARM communautaire européen ST80 MRSA-IV et la prédiction d'un affaiblissement progressif de la démographie de ce clone sur la base de l'analyse Génomique d'une centaine de souches (Stegger et al, MBio 2014).

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 microévolution 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 trousse

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[®] 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 connus¹. Le kit a parfaitement détecté la leucocidine de Panton Valentine.

Au total, 56 pus (28 à *S. aureus* PVL+ et 28 à *S. aureus* PVL-) collectés ont été analysés. La sensibilité du kit commercial était de 96.4% et la spécificité de 100%, que l'analyse soit réalisée directement à partir du pus en poudrier ou à partir d'un eSwab préalablement immergé dans le poudrier, avec dans les deux cas un seul même échantillon discordant. L'analyse à partir d'un écouvillon sec trempé dans le poudrier de pus présentait une moindre sensibilité (Se=67.9%).

Aucun des pus à *Streptococcus pyogenes* n'a été détecté positif (n=5).

Les performances de détection des gènes codant la PVL directement à partir de prélèvement de pus à *S. aureus* par le kit RIDA GENE PVL (R-Biopharm) présentent une excellente sensibilité et spécificité sur les pus en poudrier ou sur eSwab. Le manque de sensibilité obtenue sur écouvillon sec confirme l'inadéquation de ce mode de prélèvement pour analyse bactériologique. Ce kit pourrait permettre une prise en charge rapide du sujet et de son entourage.

¹Dumitrescu 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.

Développement de la technique de *dru*-typing

Afin de disposer d'outils complémentaires de caractérisation des clones de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistant à la méticilline, un outil permettant de caractériser rapidement la nature des cassettes SCCmec insérées au sein du gène *orfX* a été implémenté au CNR en 2014. La technique, appelée *dru*-typing (direct repeat units-typing), a pour but d'amplifier une série de séquences répétées de 40 paires de composition variable située à côté de la séquence d'insertion IS431 présente au sein de la cassette SCCmec. Le produit d'amplification est ensuite séquencé. La nature (enchaînement de bases) et le nombre des séquences répétées permet de définir une combinaison particulière dénommée *dru*-type et signalée par le préfixe dt, un chiffre différent pour chaque combinaison. Plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir discriminant de cette approche pour différencier les clones de staphylocoques résistant à la méticilline. Cette technique a été utilisée avec succès en 2014 pour la caractérisation des souches de *Staphylococcus capitis* résistantes à la méticilline et notamment l'identification rapide et simple du clone S. capitis NRCS-A qui présente un *dru*-type spécifique dt11c.

Evaluation du kit Simplexa MRSA Direct (Focus Diagnostics)

Le dépistage précoce des patients porteurs de SARM est essentiel notamment en réanimation pour limiter les infections et la transmission. Le CNR a eu l'occasion de tester et évaluer de nombreux tests moléculaires pour cette application. Ils ont été conçus pour assurer une détection rapide et fiable de SARM dans les écouvillons nasaux. Ils ciblent classiquement à l'aide d'amorces spécifiques i) la jonction entre la cassette SCCmec *orfX* et, ii) un gène spécifique de *S. aureus*, et iii) le gène *mecA* lui-même. Récemment, l'identification d'un variant du gène *mecA*, nommé *mecC* et présentant moins de 70% d'homologie avec le gène *mecA*, a été signalé et complexifie encore un peu plus la détection de SARM en raison de l'inadéquation des amorces ciblant le gène *mecA*. Le test Simplexa Direct™ MRSA est une PCR en temps réel qui détecte uniquement les régions conservées de génome de *S. aureus* (gène *spa*) et les gènes de résistance à la méticilline (*mecA* et *mecC*). Le logiciel assure la comparaison automatique des résultats des Ct des différentes cibles afin de pouvoir discriminer la présence dans un prélèvement de SARM, de SASM ou de SCNRM suivant le principe qu'en cas de SARM, le nombre de copies des gènes *spa* et *mec* (et donc les Ct) est identique. Les tests sont réalisés en moins d'une heure sur la plateforme 3M Integrated Cycler avec le logiciel Studio Cycler version 5.0.

Dans ce contexte, en utilisant une collection très diversifiée d'isolats cliniques de SARM, nous avons évalué en 2014 un nouveau kit commercial de PCR en temps réel (Simplexa MRSA Direct) capable de détecter simultanément les deux gènes *mecA* et *mecC*. Cent quarante-huit SARM cliniques et quatre MSSA (utilisés comme témoins) ont été inclus. Les souches de SARM testées avaient été caractérisées génétiquement avec les méthodes de référence du CNR (PCR *mecA/mecC*, typage *agr*, puces à ADN (Alere)) et sélectionnées pour être représentatives des principaux clones SARM circulant actuellement dans le monde et couvraient 35 complexes clonales, plus de 70 *spa*-types. Parmi eux, 25 souches portaient le gène *mecC*.

Tous les isolats cliniques ont été classés correctement concernant l'activité des bêta-lactamines qu'ils soient sensibles (n= 4) ou résistants à la méticilline (n= 148). Tous les isolats ont été correctement identifiés comme *S. aureus*, à l'exception d'un isolat pour lequel aucune amplification du gène *spa*. Le séquençage du gène *spa* a montré que cette souche appartient aux souches très rares cas de *S. aureus* n'hébergeant pas de gène *spa*.

La réalisation du test Simplexa Direct SARM s'est avérée très simple et rapide directement à partir de colonies isolées. En utilisant une large collection de souches représentant les

principaux clones de SARM circulant à travers le monde, la spécificité du test Simplexa MRSA direct est excellente et s'établit à 99,34%. Il restera à évaluer la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de ce test lorsqu'il est utilisé en routine pour le dépistage des patients colonisés au niveau nasal.

Evaluation multicentrique des tests PBP2a Culture Colony Test™ (Alere) et Slidex® MRSA détection (bioMérieux) pour l'identification rapide des SASM et des SARM

La détection rapide de la résistance aux β -lactamines de *S. aureus* est une étape critique dans la prise en charge des patients infectés. Le test PBP2a Culture Colony Test™ (Alere) est basé sur une technique immunochromatographique originale capable de détecter l'expression de la PLP2a, codée par le gène *mecA*. Le test Slidex® MRSA détection (bioMérieux) est basé, lui, sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées.

Nous avons cherché à évaluer la performance des deux tests sur un panel de souches cliniques de SASM (n=10) et des souches de SARM (n=20) choisies de façon aléatoire au sein de la collection 2013-2014 du CNR des staphylocoques. Les essais ont été réalisés en routine et en aveugle dans cinq laboratoires (Lyon, Nantes, Tours, Montpellier, Nancy) par six techniciennes différentes au sein de chaque équipe.

L'ensemble des 20 SASM et des 20 SARM a été correctement détecté par le kit PBP2a Culture Colony Test™ dans tous les laboratoires. Les 20 souches de SASM ont été correctement identifiées par le kit Slidex® MRSA détection dans tous les laboratoires. En revanche, seulement 14/20, 15/20, 18/20, 20/20, 20/20 des souches de SARM ont été correctement détectées avec le kit Slidex® MRSA détection. Les souches ayant conduit à ces faux négatifs étaient différentes entre les différents laboratoires.

Les résultats révèlent un défaut de sensibilité de la technique d'agglutination pour la détection des souches de SARM ce qui est extrêmement inquiétant et fait courir un risque majeur pour la prise en charge des patients. La diversité des souches mal détectées dans les différents laboratoires suggère que ces faux négatifs sont directement liés à des difficultés dans la réalisation technique et/ou l'interprétation de ce test qui reste pourtant encore beaucoup utilisé. De son côté, le test PBP2a Culture Colony Test™ apparaît parfaitement sensible et spécifique et assure en routine une identification rapide et correcte des niveaux de résistance aux bêta-lactamines de l'ensemble des souches de *S. aureus*.

- 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.

En 2014, nous avons plus particulièrement transmis à plusieurs laboratoires demandeurs les protocoles PCR visant à permettre l'identification des souches de SARM portant le gène *mecC* et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leuocidine de Panton Valentine.

2.2 Présenter les activités d'expertise de l'année N et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées en précisant notamment :

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 2014, le CNR a reçu **2196** souches et ADN

- **1543** 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).
- **653** 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 anti-infectieux*

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

Au cours de l'année 2014, le CNR a distribué en France et à l'étranger **434** échantillons d'ADN de staphylocoques et **472** souches de référence ou souches d'origine clinique soit à la demande des laboratoires ; dans ce cas il s'agissait la plupart du temps de souches témoins pour la mise au point de techniques de diagnostic ou pour des contrôles de qualité soit dans le cadre d'études multicentriques : France (435 souches, 44 ADN), étranger et DOM-TOM (Allemagne, Pays bas, Portugal, Suède, Suisse, Royaume uni, Ile de la Réunion) (37 souches , 390 ADN)

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 **1543** souches reçues au CNR en 2014 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.

Ces souches provenaient de 104 départements ou DOM TOM. Environ 60 % des souches provenaient de 3 régions principales : 36 % (Rhône-Alpes), 13,5 % (Ile de France), 12 % (Provence Alpes Côte d'Azur), < ou = 5 % pour chacune des autres régions et DOM TOM. (Figure 1).

provenaient de 3 régions principales : 36 % (Rhône-Alpes), 13,5 % (Ile de France), 12 % (Provence Alpes Côte d'Azur), < ou = 5 % pour chacune des autres régions et DOM TOM. Nous avons reçu **653** 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 (Allemagne, Brésil, Grèce, Inde, Pays Bas, Portugal, Slovénie)

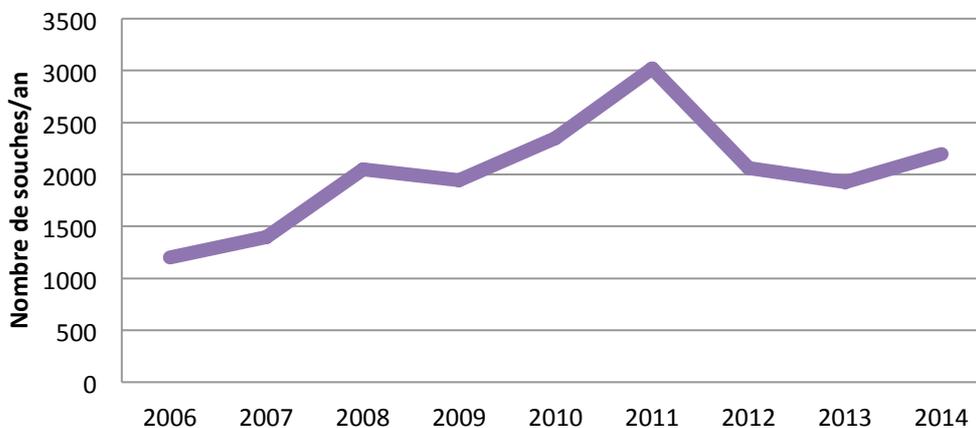


Figure 2- Evolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2014.

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines rapportées en France stable avec **141** cas en 2014 contre 144 cas en 2013 (Tableau 1).

Année	Syndrome 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
2014	26	28	82	5	141

Tableau 1- Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines par syndrome recensées par le CNR des Staphylocoques entre 2006 et 2014 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 toxiques (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 **486** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et **82** souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

En 2014, **82** cas de CTS ont été rapportés, dont **22 cas de CTS menstruels** ; ces chiffres, restent stables par rapport aux années précédentes. L'âge des patientes s'étend de 14 à 45 ans avec une médiane de **16 ans**. Le pronostic était favorable. Dix-neuf souches isolées appartenaient au complexe clonal CC30 dont 4 ne possédaient que le gène codant la TSST-1 et 15 possédaient les gènes codant la TSST-1, l'entérotoxine A et un allèle de type *agr3* correspondant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. Parmi les trois autres souches analysées, une appartenait au complexe clonal CC22, une autre au CC6 et une dernière au CC45, toutes possédaient la TSST-1. Enfin seule la souche appartenant au CC22 était résistante à la méticilline.

Dans les **60 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 88 ans avec une médiane d'âge de 43 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est 34/26. Il n'y a que 12 souches de SARM (un clone Lyon, cinq clones Géraldine, un clone « new pediatric », un clone « USA300 », deux clones CC8-MRSA IV, un CC22-MRSA IV et un clone non assigné). Trente sept souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 22 autres souches possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC), une seule souche possédait uniquement le gène codant l'entérotoxine P.

• **Cinq cas de scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 0 à 79 ans avec une médiane d'âge de 9 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ est de 3/2. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections cutanées communautaires principalement. Quatre souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, une souche possède au moins un gène codant un superantigène (SEB). Toutes les souches étaient sensibles à la méticilline.

Chocs toxiques staphylococciques et formes mineures

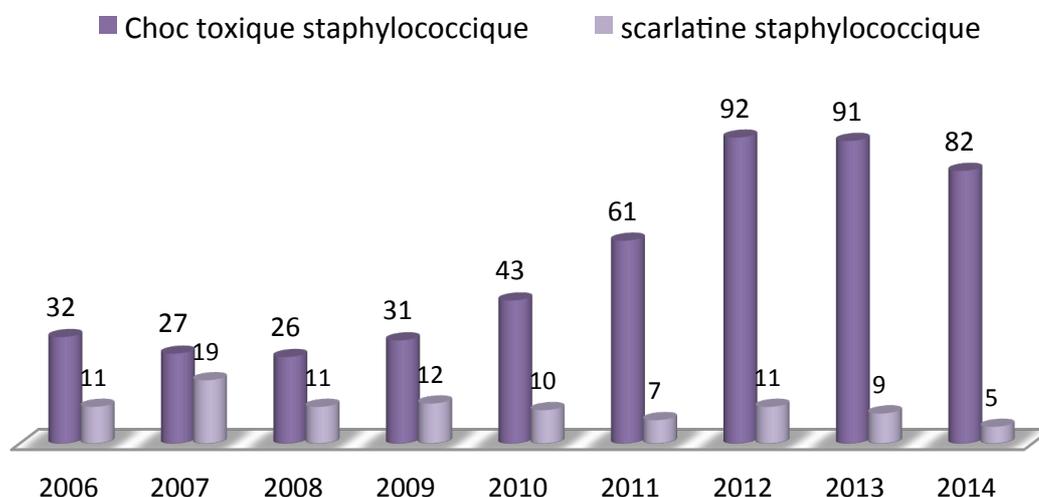


Figure 3- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et

formes mineures entre 2006 et 2014.

3.1.3.2 Détermination des 24 principaux « répertoires V β » 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

Pour rappel, *Staphylococcus aureus* produit 23 toxines superantigéniques dont les plus connues sont : la toxine du choc toxique staphylococcique TSST-1 (gène *tst*) ; les entérotoxines A (SEA), SEB, etc. codées respectivement par les gènes *sea*, *seb*. Agissant à de très faibles concentrations, ces toxines sont impliquées dans la survenue de chocs toxiques staphylococciques de forme menstruelle et non menstruelle dont le diagnostic repose sur l'association de signes cliniques codifiés par le CDC. Néanmoins, ces derniers peuvent être fugaces, absents ou parcellaires, rendant complexe le diagnostic. Ainsi, le CNR des Staphylocoques avait mis au point un test de cytométrie en flux permettant d'objectiver les activités superantigéniques induites par les toxines sur les cellules cibles : les lymphocytes T. Sous l'action des toxines, un ou plusieurs sous types de lymphocytes T porteurs d'une boucle V β spécifique de la toxine impliquée vont s'activer et se multiplier, induisant ainsi les signes cliniques du choc. La cartographie précise de chacune des toxines superantigéniques staphylococciques a été précédemment établie par le CNR des staphylocoques. Au total, la détermination de la présence ou non d'expansions du ou des « répertoires V β » ciblés par les toxines superantigéniques staphylococciques peut être utilisée comme test de diagnostic biologique des chocs toxiques staphylococciques permettant leurs mises en évidence et/ou leurs confirmations et la mise en route et/ou le maintien des thérapeutiques antitoxiniques (*i.e.* clindamycine et immunoglobulines polyvalentes IVIG). A noter que les toxines superantigéniques streptococciques induisent également des expansions massives de lymphocytes T exprimant certains répertoires V β ciblés par ces toxines, et *de facto*, sont responsables de chocs toxiques streptococciques.

Au cours de l'année 2014, **neuf déterminations** des « répertoires V β » des lymphocytes T ont été réalisées chez **7 enfants et 2 adultes**. La moyenne d'âge était de 10,9 ans et le sexe ratio de 4 ♂ pour 5 ♀. Ces déterminations provenaient : des services de l'hôpital pédiatrique des Hospices Civils de Lyon pour 6 cas, du service de réanimation de l'hôpital d'Annonay (Ardèche) pour 1 cas et du service des maladies infectieuses du CHU de Genève (Suisse) pour 2 cas, témoin de la notoriété du CNR des staphylocoques dans cette détermination dont l'acheminement des tubes doit être réalisé en moins de 24 heures, réduisant le périmètre de compétence du CNR des Staphylocoques.

Deux chocs toxiques staphylococciques non menstruels probables ont été détectés avec une signature pouvant évoquer les entérotoxines B ou C (signature redondante) par ce test sans qu'une souche n'ait été isolée. Deux cas de choc toxique staphylococcique menstruel sont également à recenser : dans un cas, l'expansion du répertoire V β 2 cible de la TSST-1 a été retrouvée tandis que dans l'autre cas, aucune expansion n'a été objectivé, la détermination ayant été réalisée moins de 12 h après l'injection d'IVIG. Dans ces 2 cas, une souche de *S. aureus tst+* a été isolée au niveau vaginal dont une souche a été expertisée par le CNR des Staphylocoques : elle est de fond génétique Agr 3 et possède les gènes *tst*, *sea*, *egc* et *seu*. Dans 3 cas, un diagnostic de choc toxique streptococcique a été objectivé avec la mesure d'expansions correspondant à la SPEA. Dans 2 de ces 3 cas, une souche de *S. pyogenes* possédant uniquement le gène codant la SPEA (détecté par le CNR des streptocoques) a été isolée d'une hémoculture et dans l'autre d'un liquide pleural : les souches sont de type M 1. Enfin, dans les 2 cas restant, le diagnostic de choc toxique a pu être exclu grâce à la négativité de ce test : le diagnostic de choc septique sans documentation a été posé dans un cas et d'une réaction allergique dans le second après

injection de vancomycine chez un patient immunodéprimé. Au total, la détermination des répertoires V β est un test pertinent pour le diagnostic et/ou la confirmation d'une étiologie superantigénique. Néanmoins, il reste l'apanage d'un laboratoire de référence tel que le CNR des Staphylocoques.

3.1.3.3 Syndromes d'exfoliation staphylococciques

En 2014, le CNR a analysé 51 souches de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **26 cas de maladie exfoliante généralisée** et **28 cas d'impétigo bulleux** (Figure 4). On constate une légère recrudescence du nombre de cas recensés au CNR par rapport à l'année précédente.

Une petite épidémie survenant dans une maternité a été déclarée cette année ainsi deux cas de diffusion intrafamiliale

Actuellement, grâce à l'expertise du Dr Pascal Del Giudice avec qui nous collaborons depuis 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 2014, 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 publication².

En 2014, pour les 26 cas de patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique classique**, l'âge s'étend de quelques jours à 87 ans avec une médiane à 2.5 jours tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est **10/14**. Dix souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), huit souches l'ETA seule et huit souches l'ETB seule. Quatre cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes souffrant d'insuffisance rénale majeure.

Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

En 2014, l'âge des 28 patients ayant présenté un **impétigo bulleux** s'étend de quelques jours à 40 ans avec une médiane de 4 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est **10/17**. Seize souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, douze souches l'ETA seule. Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

² 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.

Syndromes d'exfoliation staphylococciques

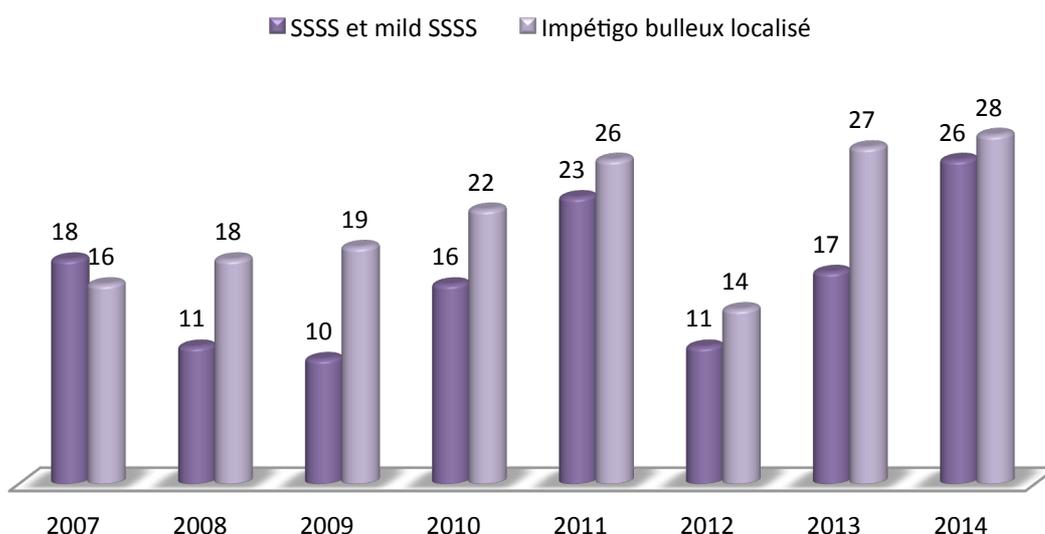


Figure 4- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2006 et 2014.

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 2014, nous avons expertisé **374 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès) **hors épidémies**. La proportion de souches PVL+ est de 50.7% au total mais de **90.6% dans les infections primitives** (Figure 5).

Infections suppuratives 2014 (n=374)

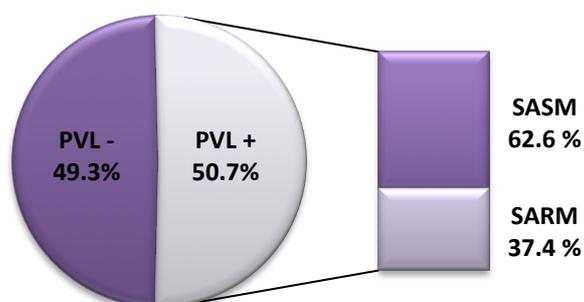
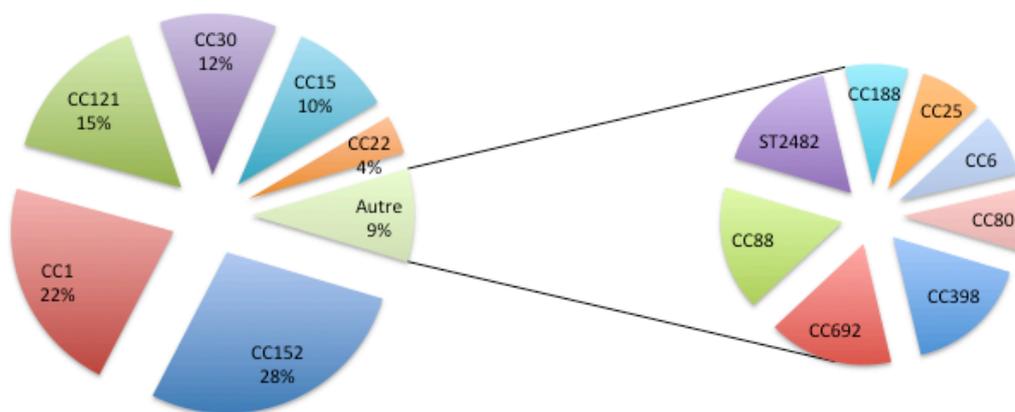


Figure 5- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2014.

Parmi les souches PVL+ :

- il y a **62.6 % de SASM** (Figure 5). Comme classiquement décrit, on note une plus grande diversité de clones de SASM PVL. Le clone majoritaire est le clone CC152 (Figure 6a).
- il y a **37.4 % 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).

a. Caractéristiques des clones de SASM PVL responsables d'infections suppuratives en 2014



b. Caractéristiques des clones de SARM PVL responsables d'infections suppuratives en 2014

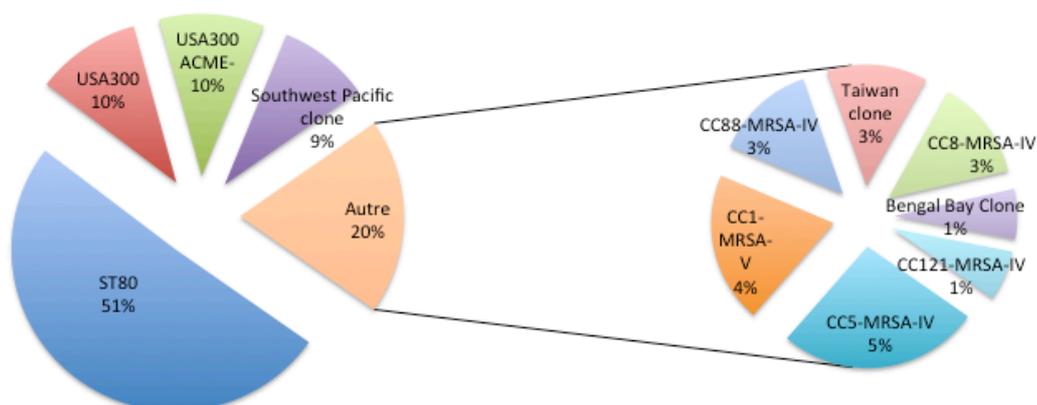


Figure 6- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL responsables d'infections suppuratives en 2014.

3.1.3.5 Furonculoses familiales

En 2014, en collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Yves Gillet, Dr Laure Hees), **18 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 10 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 façon, 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 2014**, **140** patients (sexe ratio ♂/♀ 77/64, de 1 mois à 82 ans) ayant présenté une pneumonie communautaire grave ont été inclus. Au total, 76 souches de *S. aureus* des patients inclus étaient porteuses de la toxine PVL.

Nous avons observé un parallélisme entre les pics de l'épidémie grippale et une augmentation de l'incidence des pneumonies communautaires à *S. aureus*, suggérant l'existence d'une relation entre l'infection virale et cette pneumonie. Cette tendance se confirme sur la période grippale 2013-2014. A noter que le nombre de cas de grippe rapporté représente les cas confirmés par le CNR de la grippe (Lyon) mais reflètent les tendances nationales. Une validation sur un plus grand nombre de sujets et sur d'autres saisons grippales est pourtant nécessaire (Figure 7).

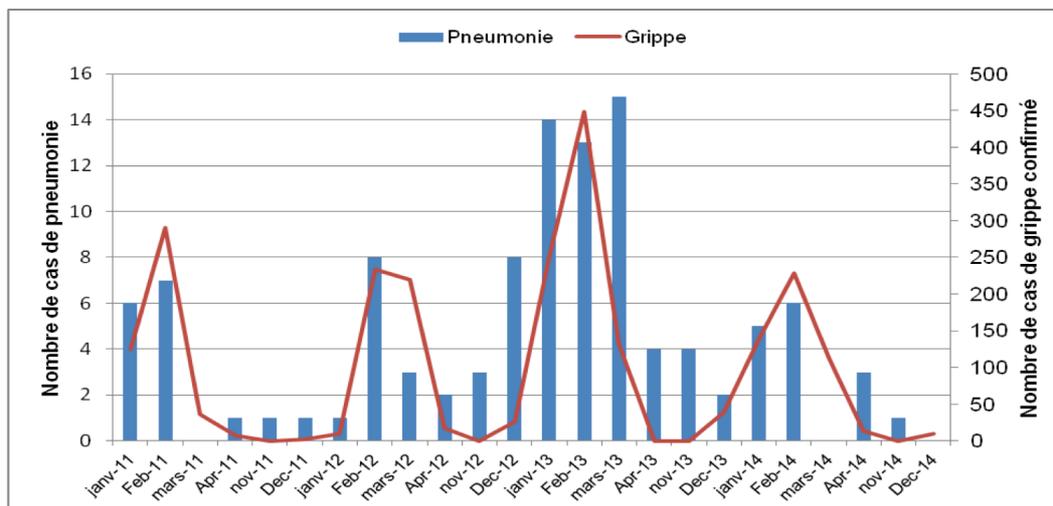


Figure 7- Incidence des pneumonies communautaires sévères à *S. aureus* au cours des épidémies grippales 2011-2014 (PHRC)

Les analyses réalisées sur les données cliniques disponibles de 112 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 (32,1 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, d'expectorations purulentes et de condensation unilatérale à l'admission. Ils étaient également caractérisés par des taux plus élevés de pneumothorax 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-.

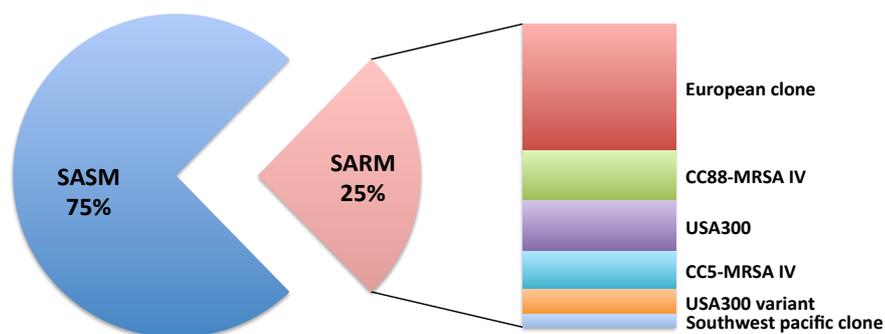
	PVL Positive (n=59)	PVL Négative (n=53)	p
Age (an)	32,1 (8-5)	55,1 (48-67)	<0,00
Médiane (25-75 percentile)			
Nombre Hommes	24	36	0,003
Délais entre symptômes et hospitalisation (jours)	3 (1-4)	4 (2-6)	0,03
Médiane (25-75 percentile)			
Présence de signes cliniques avant l'admission			
Syndrome pseudo-grippal	16	15	0,4
Diarrhée	8	6	0,5
Eruption cutanée	9	4	0,2
Présence de signes cliniques à l'admission			
Diarrhée	10	2	0,03
Hémoptysie	19	13	0,2
Expectoration purulente	15	21	0,04
Erythrodermie	12	4	0,05

Pneumothorax	4	0	0,07
Présence de signes durant le séjour			
Diarrhée	9	8	0,6
Hémoptysie	24	20	0,3
Erythrodermie	12	6	0,09
Pneumothorax	8	2	0,05
Signes radiologiques à l'admission			
Condensation unilatérale	25	13	0,05
Condensation bilatérale	32	36	0,09
Signes radiologiques durant le séjour			
Condensation unilatérale	21	12	0,03
Condensation bilatérale	37	43	0,2

Tableau 3- Caractéristiques des 112 cas avec les données cliniques et immunologiques disponibles entre **novembre 2010 et décembre 2014 (PHRC)**.

L'analyse de survie sur les 94 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+ (33,3% vs 15.6% parmi les PVL-, $p=0,04$).

Pneumonies communautaires sévères PVL+ novembre 2010-décembre 2014



Pneumonies communautaires sévères PVL- novembre 2010-décembre 2014

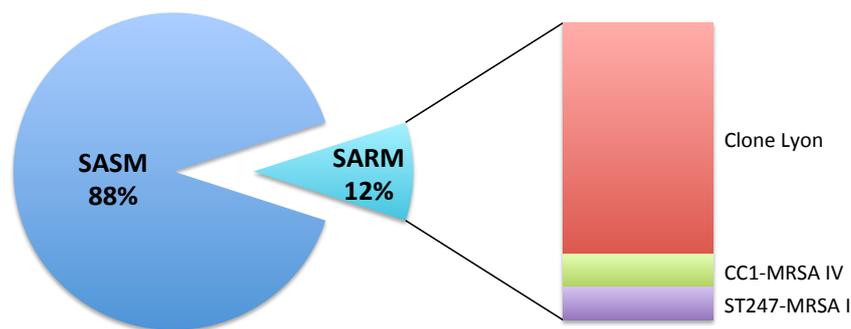


Figure 8- Caractéristiques des souches de *S. aureus* responsables de pneumonies communautaires sévères entre novembre 2010 et décembre 2014 (PHRC).

Les résultats préliminaires de la Figure 8 confirment la prévalence élevée de la résistance à la méticilline des souches PVL+ (**25%**). 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 **12%** 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 2014, trois suspicions de TIAC ont été signalées au CNR. Seule une recherche s'est avérée positive.

3.1.3.8 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2007, nous avons expertisé 207 souches d'infections ostéo-articulaires (33 en 2012, 50 en 2013, 64 en 2014) (Figure 9).

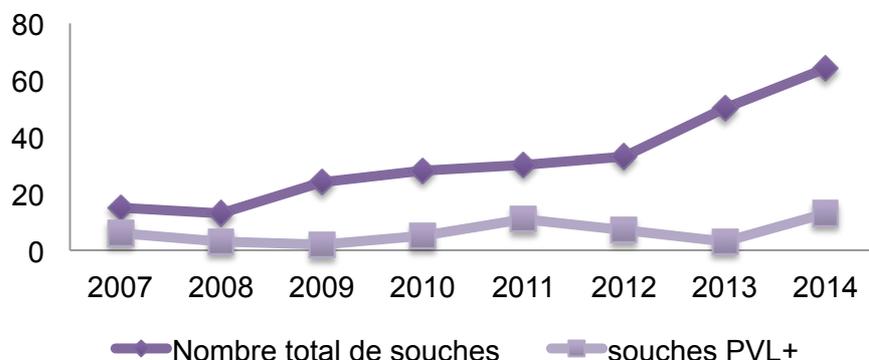


Figure 9- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour infection ostéo-articulaires entre 2007 et 2014.

En 2014, nous avons reçu pour expertise **64 souches** de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire, les patients étant âgés de 1 mois à 81 ans (médiane d'âge 46 ans) avec un sexe *ratio* ♂/♀ de 44/20. Douze souches sont des SARM (Figure 10).

Les tableaux cliniques sont très divers : ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèse,... Treize infections étaient dues à des souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine, sensibles à la méticilline (8 métiS et 5 métiR).

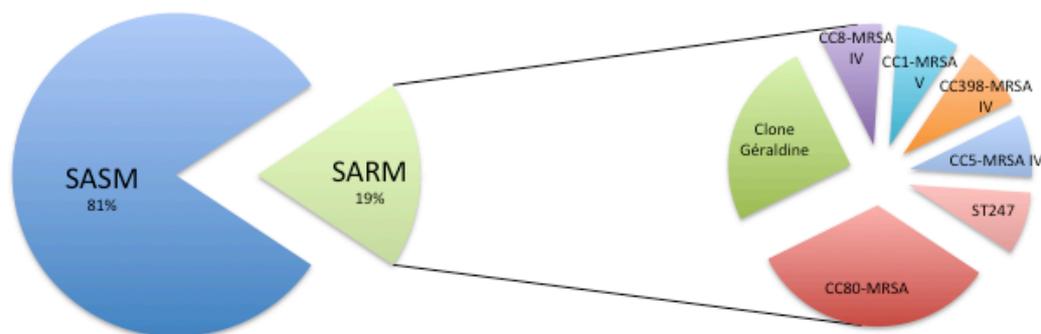


Figure 10- Caractéristiques des souches responsables d'infections ostéoarticulaires en 2014 (n=64).

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

Le CNR réalise deux techniques sérologiques pour l'aide au diagnostic et au suivi des pathologies associées à la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) et à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). La PVL est associée à des infections suppuratives sévères comme la pneumonie nécrosante, et la TSST-1 au choc toxique menstruel (MTSS) chez les femmes jeunes ne possédant pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine. Nous avons montré que la recherche des anticorps anti-PVL et anti-TSST-1 peut contribuer au diagnostic indirect d'infection à *S. aureus* PVL+ ou de MTSS lorsqu'un diagnostic direct est impossible, ainsi qu'à l'estimation du risque de récurrence de MTSS en cas de persistance d'un bas taux d'anticorps.

Pour définir des seuils de positivité et estimer les performances analytiques des méthodes, nous avons mesuré par technique ELISA les taux d'anticorps anti-PVL et anti-TSST-1 : (i) dans la population générale (patients adultes donneurs de sang, n=200) ; (ii) chez des patients présentant une infection à *S. aureus* PVL+ (n=24) ; et (iii) chez des patientes présentant un MTSS (n=6). Les taux d'anticorps ont été exprimés en unités arbitraire (UA), 1000 UA représentant le taux observé pour des immunoglobulines humaines polyclonales (Tégéline®) à 12,5 g/l.

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

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

Depuis leur mise en place fin 2010, ces techniques répondent à une attente réelle de la part des cliniciens confrontés au diagnostic de ces pathologies. La méthode de sérologie PVL a également fait l'objet d'un transfert de technologie à Brisbane, Australie. Une sérologie alpha-toxine (toxine quasi-constante chez *S. aureus*) a également été mise en place dans un but de contrôle (et non un but diagnostique) et réalisée au cours de certains protocoles dont le PHRC Pneumonies nécrosantes.

Activité sur l'année 2014

Le CNR a reçu **82 demandes** de sérologie staphylococciques sur l'année 2014. Quarante demandes concernaient une sérologie PVL, dont 15 étaient positives et 36 étaient en lien avec le PHRC Pneumonies Nécrosantes. Quarante-quatre demandes incluaient une sérologie TSST-1, dont 23 ont permis de détecter une séronégativité. L'ensemble des demandes émanait de 38 prescripteurs différents, montrant ainsi la diversité des sources et la bonne diffusion de l'information autour de ces sérologies au niveau national. Les principaux prescripteurs en volume étaient le CHU de Nantes (9 demandes), les HCL (7 demandes), l'APHP et le CHU de Rennes (5 demandes) et le CHU de Marseille (3 demandes). Dans le cadre du PHRC Pneumonies Nécrosantes, le CNR a réalisé 110 sérologies alpha-toxine pour comparaison avec les taux d'anticorps anti-PVL.

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

Au total **187 souches** ont été adressées spécifiquement au CNR pour une expertise sur la sensibilité aux antibiotiques en 2014.

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 **99 souches de staphylocoques** dont 90 souches de *S. aureus*. Au final, 40 souches de *S. aureus* étaient porteuses du gène *mecA*, 2 souches porteuses du gène *mecC* et 48 souches étaient sensibles à la méticilline. Parmi les souches de staphylocoques à coagulase négative, 5 étaient porteuses du gène *mecA*.

Il s'agissait :

- de 36 souches de *S. aureus* et 7 souches de SCN pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence de gène de type *mec*,
- de 30 souches de *S. aureus* pour lesquelles le système expert du laboratoire incitait à rechercher la présence du gène *mecC* devant un antibiogramme pouvant faire suspecter ce type de souche (notamment des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline mais multisensibles aux autres classes d'antibiotiques) : seulement 2 de ces souches se sont révélées porteuses du gène *mecC*. Vingt-trois étaient porteuses du gène *mecA*, confirmant que c'est le gène de loin le plus fréquemment associé à un phénotype de

méticillinorésistance. Cinq souches étaient en fait sensibles à la méticilline et ne portaient ni gène *mecA* ni gène *mecC*,

- 2 souches de *S. aureus* résistantes à au moins un aminoside mais retrouvées phénotypiquement sensibles à l'oxacilline pour lesquelles l'absence de gène *mecA/mecC* a toujours été confirmée, indiquant qu'il s'agissait probablement de souches ayant perdues la cassette *SCCmec* (SASM *mecA* "drop out"),

- 12 souches de *S. aureus* présentant une discordance entre une CMI oxacilline >4 mg/L en automate Vitek2® et un test de "screening céfoxitine" négatif : toutes ces souches se sont révélées sensibles à la méticilline avec absence des gènes *mecA* et *mecC*, indiquant une surévaluation de la résistance à l'oxacilline avec l'automate Vitek2®,

- 3 souches (1 staphylocoque à coagulase négative et 2 *S. aureus*) présentant la discordance inverse sur l'automate Vitek2® (test de "screening céfoxitine" positif, oxacilline sensible) : les 3 souches se sont révélées *mecA* positives, donc résistantes à la méticilline, témoignant de la meilleure sensibilité du test céfoxitine pour détecter cette résistance,

- 3 souches de *S. aureus* phénotypiquement résistantes à la méticilline mais non détectées comme SARM par le système de biologie moléculaire GenXpert. Ces trois souches ont été confirmées comme SARM *mecA* positifs au CNR. Ces 3 échecs du GenXpert correspondaient en fait à une incapacité de détection de la cassette *SCCmec* (le gène *mecA* étant détecté mais pas de la région de jonction *orfX-SCCmec* conduisant le GenXpert à rendre un résultat négatif). L'analyse de ces souches par puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere) a mis en évidence la présence de cassettes *SCCmec* atypiques, pouvant expliquer l'absence d'amplification par les amorces du système GenXpert,

- 3 souches de *S. aureus* phénotypiquement résistantes à la méticilline mais négatives pour la recherche de PLP2a par immunochromatographie (test PBP2a Culture Colony Test™, Alere) en absence d'induction par une bêta-lactamine. Au CNR, deux de ces souches sont apparues en fait phénotypiquement sensibles à la méticilline mais *mecA* positives en PCR alors que la troisième était phénotypiquement résistante à la méticilline. Ces souches correspondent à des souches de SARM cryptiques exprimant à très bas niveau la PLP2a. Les trois souches étaient positives pour la recherche de PLP2a par immunochromatographie après induction par la céfoxitine, démontrant qu'il ne s'agissait pas d'une absence complète d'expression de la PLP2a. La présence du gène *mecA*, même si la souche apparaît phénotypiquement sensible à la méticilline, doit conduire à les catégoriser comme des SARM.

3.2.1.2 Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

La recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides a été effectuée pour **61 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.

Sur les 44 souches de *S. aureus*, seize souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides après confirmation par les techniques de screening et de courbe de population. Vingt huit souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base de ces mêmes techniques.

Sur les 17 souches de staphylocoques à coagulase négative, cinq ont été confirmées comme résistantes au moins à la teicoplanine.

Il faut noter que parmi les 44 souches de *S. aureus*, la plupart ont été envoyées par des centres i) dont le système expert demandait une vérification de la CMI de la vancomycine ou de la teicoplanine en ETest pour des valeurs ≥ 2 mg/L en microdilution, et/ou ii) qui avaient obtenus des valeurs de CMI ETest ≥ 3 mg/L. Seulement 16 souches reçues dans ce contexte se sont révélées positives. Ces données confirment que la technique ETest surestime légèrement les valeurs de CMI de la vancomycine. Par ailleurs, certaines souches

ont présentées des CMI à la teicoplanine > 2 mg/L sans présenter les critères retenus par le CA-SFM pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type GISA par les test de screening et de confirmation, suggérant l'existence d'autres mécanismes de résistance à la teicoplanine. Néanmoins dans ce contexte, il convient de déconseiller l'utilisation de glycopeptides sur ces souches.

Deux souches de *S. aureus* ont été envoyées après un test positif de screening par la méthode dite de « gélose teicoplanine 5 mg/L » recommandée par le CA-SFM. Aucune des souches n'a été confirmée comme étant de sensibilité diminuée aux glycopeptides par le CNR (courbe de population). Il est à noter que la méthode « gélose teicoplanine 5 mg/L » n'est qu'un test de screening qui doit nécessairement être confirmée par analyse de population.

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 patients atteints de mucoviscidose. Aucune souche **n'a été détectée** de sensibilité diminuée au glycopeptides.

Concernant les staphylocoques à coagulase négative, dix-sept souches ont été adressées au CNR pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides. Le CA-SFM recommande uniquement de réaliser la mesure de la CMI par ETest avec un inoculum de 0,5 McF. Les analyses complémentaires sont inutiles pour les staphylocoques à coagulase négative. Seulement 5 des souches ont été confirmées comme résistantes à la teicoplanine par Etest.

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 résistance aux oxazolidinones est liée

. soit à l'acquisition du **gène plasmidique *cfr*** (chloramphenicol-florfenicol resistance) qui code une méthyltransférase de ARNr 23S cible de cette famille de molécule.

. soit à des **mutations du gène codant l'ARN ribosomal** entraînant un changement de conformation et une perte d'affinité du linézolide.

La prévalence de la résistance a toujours été faible en France mais l'augmentation croissante de l'utilisation de linézolide incite à surveiller le niveau de sensibilité à cet antibiotique. En 2014, le CNR a reçu **51 souches** de staphylocoques présentant une CMI augmentée pour le linézolide.

Trois souches appartenaient à l'espèce *S. aureus*. Ces souches ont été isolées uniquement chez des patients présentant une mucoviscidose : deux à Brest où deux autres souches résistantes au linézolide avaient été isolées en 2013 et une à Suresnes. Aucune des souches ne portaient le gène *cfr* (résistance enzymatique). Une des souches de Brest (CMI = 64 mg/L) présentait une mutation sur le gène codant de l'ARN ribosomal 23S en position 2576 (transversion G/T), connue pour conférer une résistance de bas niveau au linézolide (par perte d'affinité). Aucune mutation connue n'a été identifiée pour les deux autres souches malgré des CMI de 8 et > 256 mg/L.

S. aureus

L'isolement de 4 souches de *S. aureus* résistantes au linézolide en 2013 (n=2) et 2014 (n=2) toutes chez des patients atteints de mucoviscidose et qui, pour 3 d'entre elles présentaient une même mutation dans le gène codant l'ARN ribosomal 23S, a fait redouter une transmission croisée entre ces patients suivis dans un même centre référent (CHU de Brest) et/ou ayant séjourné dans les mêmes structures d'hospitalisation et de prise en charge (CH Roscoff). L'analyse moléculaire des souches par la technique des champs pulsés a permis de démontrer qu'il n'existait pas de liens entre les souches et de réfuter tout phénomène épidémique. Même si ces résultats sont rassurants sur le plan de la transmission inter-patient, l'apparition de ces souches chez des patients recevant des cures itératives de

linézolide mettent en avant le risque d'acquisition de résistance sous pression de sélection avec cette molécule notamment chez des patients chez lesquels on connaît la nature particulière du microenvironnement pulmonaire (stress, présence de variants hypermutateurs, etc.).

Staphylococcus à coagulase négative

Les 44 souches de staphylocoques à coagulase négatives résistantes au linézolide appartenaient à 3 espèces : *S. cohnii* (n=1), *S. capitis* (n=7), *S. epidermidis* (n=40).

L'année 2014 marque l'isolement des trois premières souches portant le gène *cf*. Deux souches appartenant à l'espèce *S. epidermidis* ont été isolées au CHU de Strasbourg. Pour ces deux souches la résistance par production de méthyltransférase était associée à une mutation sur l'ARNr 23S en position 2576 (G/2576/T). Une souche de *S. cohnii* isolée à Lille présentait elle isolément le gène *cf*. Cette résistance est inquiétante car, le gène étant en position plasmidique, la transmission inter-espèce, notamment à l'espèce *S. aureus*, est redoutée. Là encore, la prévalence exacte de ce mécanisme de résistance est inconnue, la sensibilité des souches de staphylocoques à coagulase négative au linézolide n'étant pas systématiquement testée, la résistance au linézolide étant probablement négligée et/ou peu rapportée et les souches concernées n'étant pas systématiquement adressées au CNR.

Pendant la même période, sept souches de *S. capitis* résistantes au linézolide ont été isolées dans 4 hôpitaux différents. Cinq (Bayonne, n=1 ; Lille, n=2 ; Strasbourg, n=2) de ces 6 souches présentaient une double mutation de l'ARNr 23S (T/2319/C, G/2576/T) et présentaient des profils en champs pulsés identiques témoignant d'une diffusion d'un clone particulier. Nous avons pu établir que trois autres souches de *S. capitis* résistantes au linézolide isolées en 2013 (n=2) et début 2015 (n=1) à Bayonne présentaient le même profil. Ces données suggèrent l'existence d'un clone de *S. capitis* linézolide résistant endémique en France ce qui à notre connaissance n'a jamais été rapporté dans la littérature.

Enfin, trente quatre souches appartenant à l'espèce *S. epidermidis* et résistantes au linézolide. Une souche présentait une mutation en position 2319 avec transition T/C. Pour deux souches, aucune mutation sur le gène de l'ARNr 23S n'a pu être mise en évidence dans les régions classiquement décrites. Quatorze souches (Bobigny, n=6 ; Lyon, n=4 ; Lille, n=3 ; Toulouse, n=1) portaient une mutation en position 2504 de l'ARN ribosomal 23S avec transversion T/A. Cette mutation très rare dans la littérature a été rapportée initialement par le CHU de Toulouse en collaboration avec le CNR dans le cadre d'un épisode épidémique en lien avec un clone particulier (profil de champs pulsé identique) entre 2009 et 2012 dans ce CHU. Nous avons déjà rapporté en 2013, la diffusion clonale de cette souche qui avait été rapportée à Nîmes, Lyon, Chalon sur Saône et Dijon. Les données 2014 confirment celles de 2013 et semblent indiquer que ce clone est devenu endémique en France.

Enfin 17 souches résistantes au linézolide et porteuses d'une mutation en position 2576 avec transversion G/T au niveau du gène de l'ARN 23S ont été identifiées (Lille, n=11 ; Bobigny, n=3 ; Créteil, n=1 ; Clermont, n=1 ; Rodez, n=1). Le caractère clonal de ces souches est en cours d'analyse.

La prévalence précise des souches de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistantes au linézolide en France reste à ce jour inconnue. Une étude de prévalence au niveau national est envisagée en 2015 (voir "Programme d'activité pour les années suivantes")

3.2.1.4 Détection de la résistance à la daptomycine

Le CNR a reçu pour confirmation de la résistance ou détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice à la daptomycine 8 souches de *S. aureus* au cours de l'année 2014. Seulement deux souches ont été confirmées comme résistantes et correspondaient à une sélection sous traitement au cours d'endocardites.

3.2.1.5 Détection de la résistance 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.

Deux souches de *S. aureus* ont été reçues pour vérification de la CMI ceftaroline : une souche a bien été confirmée résistante alors que la seconde était en fait sensible. Une souche de *S. haemolyticus* a été confirmée comme résistante à cet antibiotique (phénomène déjà décrit dans la littérature).

3.2.1.6 Résistance aux macrolides

Une souche a été reçue pour exploration de la résistance aux macrolides (souche résistante à la lincomycine de manière isolée, sensible à l'érythromycine et la pristinamycine). Le recours à la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® a permis de mettre en évidence le gène *Inu* dans cette souche, gène expliquant ce profil atypique de résistance aux macrolides.

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 nucleotide 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^{3,4} (Annexe 3).

Ce PHRC doit couvrir la période Septembre 2011 – Décembre 2015. Les données disponibles pour 2014 sont présentées au paragraphe 3.1.3.6.

³ Bustamante J. *et al.* Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Current Opinion in Immunology*. 2008; 20: 39-48.

⁴ von Bernuth H. *et al.* Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008; 321 (5889): 691-6.

Projet Ecofect : Impact du microbiote vaginal sur le développement du choc toxique staphylococcique menstruel

Justification/contexte : La flore commensale joue un rôle très important dans la santé humaine par sa capacité à prévenir la colonisation, la croissance et/ou la virulence de bactéries opportunistes. *Staphylococcus aureus* est à la fois un composant de la flore normale humaine et une des principales causes d'infection chez l'homme. La virulence de *S. aureus* est liée à la production de toxines telle que la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Le choc toxique staphylococcique est une maladie aigüe mettant en jeu le pronostic vital du patient. Ce choc peut survenir au cours des règles lors d'utilisation de tampon périodique chez des patientes jeunes en bonne santé, colonisées par une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1. Seule une très faible proportion de femmes utilisant des tampons périodiques et colonisées par une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1 développe un choc, suggérant que d'autres facteurs peuvent moduler la sensibilité des patientes à ce type de choc et/ou à la production de toxines au niveau vaginal. Certaines expériences de co-cultures *in vitro* confirment que certaines bactéries favorisent la production de TSST-1 par *S. aureus* alors que d'autres l'inhibent. Par ailleurs, certaines conditions biochimiques favorisent ou inhibent la production de TSST-1 *in vitro*. Nous émettons l'hypothèse que le microbiote vaginal joue un rôle prédominant dans la survenue de ces chocs, en favorisant ou inhibant la colonisation par une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1 et la production de toxine. Pour cette raison nous souhaitons pouvoir comparer les compositions des microbiotes vaginaux des patientes colonisées par une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1 aux microbiotes de patientes colonisées par une souche de *S. aureus* producteur de TSST-1 développant un choc toxique staphylococcique menstruel.

Objectif principal : Identifier les microbiotes vaginaux et paramètres biochimiques favorables au développement du choc toxique menstruel

Méthodologie : Etude épidémiologique observationnelle

Critères de jugement principal : Rôle de la composition du microbiote vaginal dans la survenue du choc toxique staphylococcique

Critères d'inclusion des cas : Patiente utilisant des tampons vaginaux en période menstruelle ayant développé un choc toxique menstruel

Critères de non inclusion : Présence d'une pathologie néoplasique gynécologique connue pouvant modifier l'écologie vaginale

Prélèvements : Recueil au cours de trois épisodes menstruels :

- du tampon périodique usagé (mis dans un poudrier stérile)
- à défaut écouvillonnage vaginal avec milieux de transport

Envoi de la souche de *S. aureus* isolée du prélèvement vaginal ou de l'urine

Retombées attendues : L'identification des communautés bactériennes vaginales favorables ou non à la production de TSST-1 va permettre de mieux connaître la physiopathologie de la maladie et de mettre au point des outils d'identification et de prévention des personnes à risque.

***Staphylococcus capitis* en réanimation néonatale : épidémiologie, caractérisation moléculaire et physiopathologie**

Le CNR des staphylocoques a rapporté en 2012 une fréquence particulièrement élevée des septicémies à *S. capitis* (39% des bactériémies versus 22.4% pour le *S. epidermidis*) au sein des 2 services de réanimation néonatale de Lyon. La caractérisation moléculaire (électrophorèse en champs pulsés) et microbiologique (profil de résistance aux antibiotiques) de ces souches avait permis de montrer que l'ensemble des souches appartenait à un même clone (NRCS-A). Des études ultérieures ont permis de montrer que ce clone était présent

dans les services de réanimation néonatale de plusieurs centres hospitaliers en France (>15 CHU concernés) et de façon surprenante dans divers pays du monde (Belgique, Australie, Royaume-Uni...). En revanche les souches isolées chez des patients adultes présentaient des profils différents, et variés.

Plus récemment, le CNR a pu mettre en évidence que toutes les souches de ce clone partageaient le même profil de résistance aux antibiotiques associant une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines, aux aminosides, à la fosfomycine, ainsi qu'une sensibilité diminuée (résistance ou hétérorésistance) aux glycopeptides avec une capacité d'adaptation à la vancomycine sous pression de sélection. Cette multi-résistance peut avoir des impacts en terme de traitement puisque la vancomycine est l'antibiotique de choix en cas d'infection néonatale à staphylocoque à coagulase négative. De plus, cette multi-résistance contrastait avec une sensibilité aux quinolones chez la majorité des souches, ce qui est très atypique pour un staphylocoque multi-résistant, mais qui est cohérent avec la pression de sélection existant en réanimation néonatale où cette classe d'antibiotique est exceptionnellement utilisée.

En 2014 nous avons poursuivi nos travaux portant sur le clone de *S. capitis* NRCS-A, tant sur les aspects épidémiologiques et moléculaires que cliniques et thérapeutiques.

Constitution d'une collection internationale de souches de *S. capitis* et caractérisation moléculaire par techniques d'électrophorèse en champs pulsés et *dru* typing

En 2014, nous avons cherché à déterminer l'étendue géographique de la diffusion du clone NRCS-A. Le CNR français a contacté les laboratoires nationaux de référence des staphylocoques ainsi que les services de microbiologie travaillant en lien avec les services de réanimation néonatale, dans de nombreux pays à travers le monde.

Ces services nous ont fourni des souches de *S. capitis* isolées d'hémocultures chez des nouveau-nés prématurés mais aussi chez des adultes. Nous avons ainsi pu établir une large collection internationale de plus de 300 souches d'origines géographique et temporelle variée (souches de 4 continents, entre 1994 et 2014).

La caractérisation moléculaire de ces souches est actuellement en cours. Nous avons déjà pu analyser par technique d'électrophorèse en champs pulsés près de 150 souches de *S. capitis*, ce qui a permis de mettre en évidence que le clone NRCS-A était présent dans de nombreux pays d'Europe (France, Belgique, Royaume Uni, Norvège, Pays Bas, Danemark, Allemagne) mais également en Asie (Corée), Océanie (Nouvelle Zélande et Australie), Amérique du Nord (USA, Canada) et du Sud (Brésil). Des analyses complémentaires sont actuellement menées sur les souches d'autres pays, reçues plus récemment.

En parallèle, nous avons mis au point au sein du CNR la technique de *dru* typing, qui consiste en la caractérisation d'une zone hypervariable au sein de la cassette *SCCmec* et qui permet d'étudier la proximité génétique de souches au sein d'un même clone. Sur 86 souches de *S. capitis* isolées chez des nouveau-nés de 4 pays différents, 83 (96%) présentaient le même *dru* type dt11c. Ce *dru* type dt11c n'était en revanche présent que chez 2 des 14 souches isolées de patients hors réa néonatal (1 patient de 4 ans et 1 adulte), et les 12 souches restantes présentaient une grande variété de *dru* types.

Ces différentes techniques ont permis de confirmer la diffusion mondiale d'un clone unique de *S. capitis*, spécifiquement en réanimation néonatale. Cette observation constitue la première description d'une dissémination internationale d'un clone de staphylocoque à coagulase négative multi-résistant, phénomène jusque là décrit et connu uniquement pour l'espèce *S. aureus*.

Epidémiologie descriptive des infections à staphylocoques à coagulase négative dans les réanimations néonatales de la France et recherche de facteurs favorisants/protecteurs

Grâce aux liens du CNR avec de nombreux services de microbiologie de France et à la présentation de nos résultats et travaux lors de différents congrès, nous avons pu échanger avec des collègues d'autres centres et noter que l'épidémiologie bactérienne des infections néonatales était variable d'une ville à l'autre, notamment en ce qui concerne la prévalence des infections à *S. capitis* NRCS-A.

Dans le but de préciser cette épidémiologie et de mettre en évidence des facteurs pouvant favoriser l'émergence, la diffusion et la persistance de ce clone au sein de certains services alors que d'autres en restent exempt, nous avons initié en 2014 deux études qui concernent les hôpitaux français disposant d'une maternité de niveau III c'est à dire disposant d'une unité d'obstétrique, d'une unité de néonatalogie et d'une unité de réanimation néonatale et pouvant assurer une prise en charge des grossesses à haut risque et des nouveau-nés présentant des détresses graves (correspondant aux prématurés de très petits poids de naissance).

La première, réalisée auprès des laboratoires de bactériologie (56 services concernés), est une étude de prévalence des infections néonatales à staphylocoques (*S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, autres staphylocoques blancs), dans le service de réanimation néonatale rattaché à leur activité. Nous disposons actuellement des données de 48 des 56 laboratoires et nous avons pu collecter une collection de souches des centres ayant isolé des *S. capitis*.

En parallèle une deuxième étude portant sur les pratiques cliniques au sens large a été mise en place dans les services de réanimation néonatale de ces mêmes hôpitaux. Elle concerne les pratiques d'hygiène (désinfection cutanée, désinfection de surface, port de masque, blouse, gants etc. ...). Ce recueil est actuellement en cours de finalisation, et les données obtenues seront ensuite confrontées aux données de prévalence afin de rechercher une association entre certaines pratiques et la présence ou non de *S. capitis* au sein d'un service.

Bases génétiques de la résistance aux glycopeptides chez *S. capitis* NRCS-A

Dans le cadre de l'étude de la résistance aux antibiotiques du clone NRCS-A et notamment de sa sensibilité diminuée aux glycopeptides, des travaux précédemment menés au sein du CNR ont permis de montrer que le clone NRCS-A était capable de s'adapter rapidement sous pression de sélection par la vancomycine in vitro. Cette acquisition de résistance à la vancomycine était associée à une résistance croisée avec la teicoplanine et la daptomycine mais pas le linézolide, et s'accompagnait d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi bactérienne des souches devenues résistantes.

Nous avons effectué un séquençage de génome entier de 2 couples de souches de *S. capitis* NRCS-A incluses dans le modèle d'acquisition de résistance (souche initiale comparée avec souches devenue résistante sous pression de sélection). La recherche de mutations ponctuelles dans des gènes connus comme étant associés à la résistance aux glycopeptides chez *S. aureus*, n'a pas permis de mettre en évidence ce type de mutation chez *S. capitis*. En revanche, nous avons de façon surprenante mis en évidence une délétion d'une fraction importante du génome de la bactérie (110 kb, soit une centaine de gènes concernés), identique dans nos 2 couples de souches. Nous avons ensuite recherché l'existence d'une telle délétion chez des souches cliniques de *S. capitis* en mettant au point une PCR ciblant les 2 extrémités du fragment délété. Sur 230 souches cliniques testées (incluant des souches résistantes à la vancomycine et des souches de bactériémies persistantes ayant acquis une résistance à la vancomycine in vivo) aucune ne présentait cette délétion. L'analyse des génomes entiers de notre collection internationale de souches cliniques de *S. capitis*,

confrontée aux CMI de vancomycine de ces mêmes souches, permettra peut-être de mettre en évidence les bases génétiques du phénotype de résistance/hétérorésistance à la vancomycine chez NRCS-A.

Etude de la sensibilité à la ceftaroline

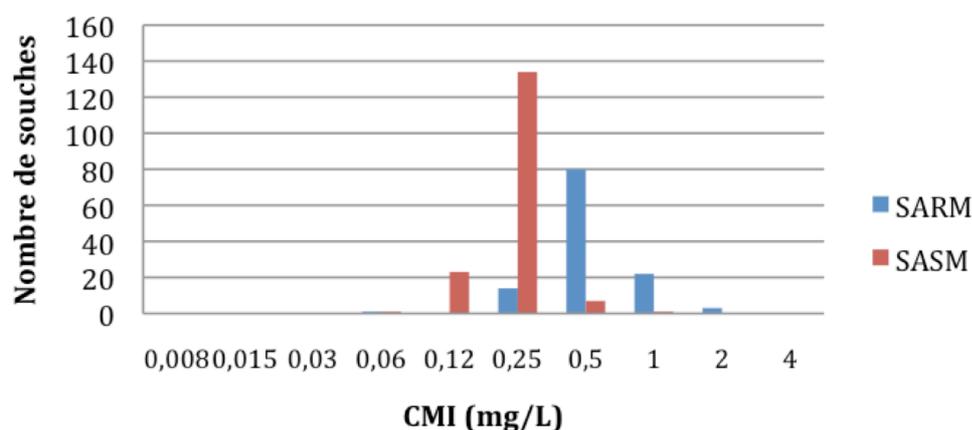
La ceftaroline est une céphalosporine de dernière génération présentant un spectre original incluant *S. aureus* (SA) qu'il s'agisse des souches sensibles (SASM) ou résistants (SARM) à la méticilline. Nous avons conduit une étude afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice de la ceftaroline sur une collection de 286 souches de *S. aureus* responsables de bactériémies et 139 souches isolées au cours de pneumopathies nécrosantes en France.

Ont été incluses dans l'étude : i) les cinq premières souches de SASM et de SARM responsables de bactériémies isolées au premier semestre 2011 dans 23 Hôpitaux français (Etude EARSS 2011) : SASM n= 166; SARM, n= 120; ii) une collection de souches de SA responsables de pneumonies communautaires sévères isolées dans les réanimations françaises entre 2009 et 2014 : SASM n= 110; SARM n= 29). Les CMI ont été déterminées en microplaques (Sensititre™, 36°C/24H) en présence de concentrations croissantes de ceftaroline (0.008 à 4 mg/L). Selon les recommandations CA-SFM/EUCAST, les souches ayant une CMI \geq 2mg/mL ont été considérées comme résistantes à la ceftaroline.

Parmi les souches de SASM, aucune n'était résistante à la ceftaroline. Parmi les SARM, seules 3/120 (2.5%) des souches de SARM isolées de bactériémies et 1/29 des souches de SARM de pneumopathies communautaires sévères de réanimation étaient résistantes, avec une CMI présentant seulement une dilution au dessus de la concentration critique.

		CMI en mg/L						
		Nbre cumulé de souches (% cumulé)						
		Total	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2
Bactériémie	SASM	166	1 (0.8)	24 (14.5)	158 (95.2)	165 (99.4)	166 (100)	-
	SARM	120	1 (0.6)	1 (0.8)	15 (12.5)	95 (79)	117 (97.5)	120 (100)
		286	2 (0.7)	25 (8.8)	173 (60.5)	260 (90.9)	283 (99)	286 (100)
Pn. com. sév.	SASM	110	0 (0)	28 (25.5)	106 (96.4)	110 (100)	110 (100)	-
	SARM	29	0 (0)	1 (3.4)	8 (27.6)	28 (96.6)	28 (96.5)	29 (100)
		139	0 (0)	29 (20.9)	114 (82)	138 (99.3)	138 (99.3)	139 (100)

Sensibilité à la ceftaroline des souches de SARM et SASM en France



Ainsi, au sein du large panel de souches de *S. aureus* testées ici, qui sont représentatives des souches cliniques impliquées dans les bactériémies et les pneumopathies

communautaires sévères en France, la ceftaroline présentait une activité sur 99.05% des souches. Seules 4 souches de SARM ont présenté une CMI supérieure à la concentration critique et n'étaient décalées que d'une dilution. Si elle ne dispose pas actuellement d'AMM dans ces indications, ces résultats suggèrent que la ceftaroline pourrait constituer une antibiothérapie de recours lorsque les molécules de référence ne peuvent être utilisées.

Etude de la sensibilité à la ceftaroline et aux antistaphylococciques de souches de staphylocoques méticillinorésistants responsables d'infections ostéoarticulaires.

Les staphylocoques dorés et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont les premiers agents d'infections ostéoarticulaires (IOA). Les souches résistantes à la méticilline (métiR) compliquent le traitement antibiotique des IOA. Les données de la littérature et des modèles animaux suggèrent que la ceftaroline (CPT), céphalosporine active sur les souches métiR, pourrait être une alternative thérapeutique intéressante, même si les IOA ne font pas partie actuellement des indications retenues. Notre objectif était d'étudier la sensibilité des souches de staphylocoques métiR isolées d'IOA au laboratoire Novescia à Lyon entre 2011 et 2013 vis-à-vis de la CPT et de 6 autres anti-staphylococciques : daptomycine, linézolide, rifampicine, teicoplanine, tigécycline, vancomycine.

L'identification des souches a été réalisée initialement sur Vitek® (bioMérieux) et confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex™ LT Bruker). La sensibilité aux antibiotiques sélectionnés a été mesurée par diffusion en gradient avec des bandelettes (MICE® Oxoid pour la CPT, Etest® bioMérieux pour les autres antibiotiques) et un inoculum de 0,5 McF sur gélose Mueller Hinton MH2 (bioMérieux). Au total, 61 souches de staphylocoques résistants à la méticilline ont été testées : 24 *S. aureus* et 37 SCN (dont 34 *S. epidermidis*). Toutes les souches de SARM étaient sensibles à la CPT (CMI [0,5-1] mg/L ; CMI₅₀=1mg/L). Toutes les souches de SCN résistants à la méticilline étaient également sensibles à la CPT, avec des CMI plus basses que les SARM (CMI [0,008-1] mg/L ; CMI₅₀=0,25mg/L).

L'étude de la résistance aux autres antibiotiques a révélé :

- parmi les SARM, 2 souches résistantes à la rifampicine, 1 résistante à la teicoplanine avec une CMI daptomycine limite à 1 mg/L et 21 souches sensibles aux 7 antibiotiques testés (à noter 23/24 souches avec une CMI vancomycine $\geq 1,5$ mg/L) ;
- parmi les SCN résistants à la méticilline, 4 souches résistantes à la rifampicine, 20 souches résistantes à la teicoplanine et 16 sensibles aux 7 antibiotiques testés.

La ceftaroline est apparue active sur les staphylocoques métiR isolés d'IOA. Les souches de SCN résistants à la méticilline sont plus sensibles que les souches de SARM, faisant de la ceftaroline un antibiotique potentiel de recours pour le traitement des IOA à SCN métiR, fréquemment multirésistants.

Staphylovasc : Etude du portage nasal à *S. aureus* chez des patients souffrant de vascularite avec ANCA (en collaboration avec le centre de référence "Maladies systémiques et auto-immunes rares", Pr Loïc Guillevin, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)

Les vascularites avec ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) représentent un sous-groupe de vascularites systémiques inflammatoires et nécrosantes qui touchent les vaisseaux de petits calibres. L'hypothèse du rôle pathogène de *S. aureus* dans la maladie a été évoquée sur des arguments épidémiologiques et anatomopathologiques. En revanche le rôle des SCVs et les conséquences d'un portage chronique dans la physiopathologie des vascularites à ANCA restent à ce jour inexplorés.

L'objectif de l'étude a été i) d'évaluer chez les patients suivis pour une vascularite à ANCA la fréquence de portage nasal des *S. aureus* et des SCV, leur association à l'activité de la

maladie en terme de rechute, ii) de caractériser génétiquement et phénotypiquement les SA identifiés. Au total, 210 patients (120 atteints de vascularites avec ANCA et 90 patients témoin (groupe contrôle)) ont été inclus dans l'étude sur une période d'un an. Le portage nasal à *S. aureus*, la formation de SCV et les manifestations cliniques ont été déterminées. Les premiers résultats ne montrent pas de différence dans le portage nasal entre les deux groupes. La caractérisation phénotypique et génotypique des souches est en cours, avec notamment la recherche de la résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à la mupirocine des souches de *S. aureus* isolées, ces molécules étant classiquement utilisées pour la décolonisation des patients atteints de vascularité à ANCA quand ils sont porteurs de *S. aureus*.

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 SARM PVL+ dans un foyer d'hébergement, épidémie de clone Géraldine dans les services de néonatalogie) 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'ArIn/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 a eu 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 :

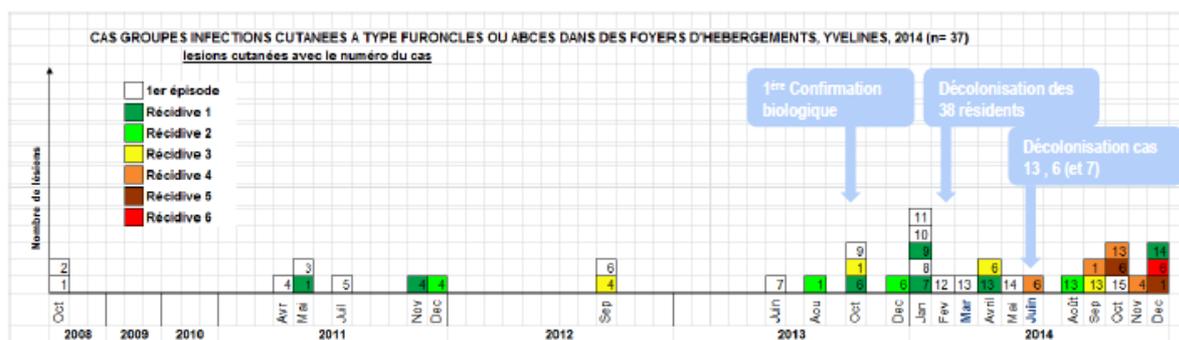
- (i) de surveiller et de suivre les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches de SARM et de SARM circulants en France,
- (ii) d'alerter l'InVS sur l'apparition de possibles cas groupés à partir des informations transmises au CNR et/ou des souches qui lui sont adressées,
- (iii) de détecter 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 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

4.2.1 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 et de travail pour handicapés. En décembre 2013, l'ARS Ile de France a informé l'Arin de l'existence d'une épidémie d'infections cutanées à type de furoncles et/ou d'abcès touchant depuis 2008 les résidents d'un foyer d'hébergement avec une recrudescence récente du nombre de cas.

Depuis 2008, des résidents du foyer présentent des lésions cutanées, dont certains ont présenté plusieurs épisodes ayant nécessité des hospitalisations pour mise à plat d'abcès. Le médecin généraliste en charge de certains de ces résidents avait constaté une recrudescence des cas d'infections cutanées au sein du foyer depuis l'été 2013, touchant notamment un groupe de 4 personnes de façon récidivante. 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. Elles appartiennent au complexe clonal CC1. Suite à plusieurs réunions téléphoniques de concertation entre le CNR, l'ARS, l'INVS et ARLIN, il a été décidé du fait de la notion de foyer fermé, une décontamination de l'ensemble des 38 résidents sans dépistage préalable, associée à un nettoyage renforcé de l'environnement et du linge a été réalisée en mars 2014. De plus, une surveillance active des nouveaux cas a été préconisée. Entre mars et juin 2014, de nouvelles lésions ont été observées chez 3 des 4 patients sujet aux récives, toutes liées au clone initialement décrit. Cela a amené à réitérer un protocole de décolonisation chez ces 3 patients en juin 2014. Depuis Juin 2014, 10 nouveaux épisodes d'infections cutanées avec cette même souche ont été répertoriés, affectant 6 patients dont les 4 sujets aux récives. Suite à de nouvelles réunions avec les différents interlocuteurs, il a été décidé début 2015 d'entreprendre un dépistage digestif des 4 patients sujets aux récives. En cas de portage digestif, une décolonisation digestive leur sera proposée, ainsi qu'à leur famille proche. A l'heure actuelle, aucun nouvel épisode ne nous a été signalé.



- L'épidémie s'étale sur plusieurs années avec une recrudescence marquée fin 2013-début 2014 puis à nouveau lors du dernier semestre 2014.
- Lors du dernier semestre 2014, les lésions cutanées signalées concernent des cas (n=4) pour la plupart déjà connus et pour lesquels des récives nombreuses sont (>2) documentées.

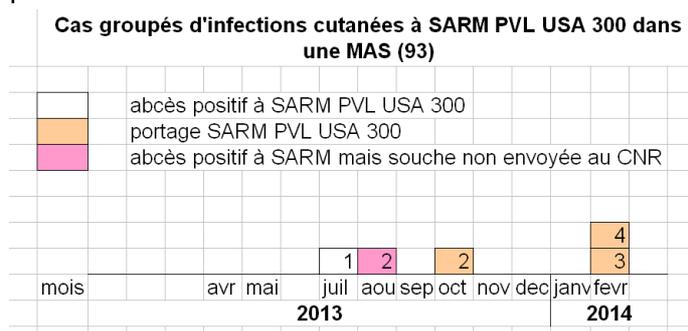
4.2.2 Epidémie d'infection à SARM-co USA300 dans une MAS

En 2014, le CNR en collaboration avec l'InVS a poursuivi l'investigation de cas groupés d'infections cutanées à SARM Co USA 300 en France

Un cluster persistait en 2014 :

Ile de France, Maison d'accueil spécialisée (MAS), Juillet 2013 – février 2014

Au total, 4 cas confirmés de SARM USA 300 PVL+ ont été identifiés dans la MAS accueillant des adultes polyhandicapés située en Ile 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/aïne) 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'Arln Ile 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, périnée) des personnes appartenant au premier cercle défini comme les résidents et personnels de la MAS.



Au total, sur les 106 personnes prélevées : 4 cas de portage ont été identifiés, uniquement chez des résidents (aucun personnel n'a été retrouvé porteur de SARM): 3 nouveaux cas asymptomatiques et un cas connu présentant une récurrence clinique. Un cercle étroit a pu ainsi être identifié et décontaminé. Pas de nouveaux cas rapportés à ce jour.

4.2.3 Epidémies de SARM Géraldine dans plusieurs services de néonatalogie en France

En 2014, le CNR en lien avec l'InVS a participé à l'investigation d'infections à SARM Géraldine dans différents services de néonatalogie en France (Limoges, Epinal, Lens). Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2015. L'origine de ces souches n'a pas été identifiée. Il est surprenant de voir que dans les différents cas ce n'est pas un clone nosocomial comme le clone Lyon qui est responsable de ces infections mais un clone à la fois communautaire et nosocomial. Dans les différents cas, il y a eu des bactériémies mais surtout une augmentation du portage à SARM dans ces services.

linézolide”). Cette situation est inquiétante et n’est pas classiquement rapporté à une telle échelle nationale dans la littérature où sont plutôt décrit des épidémies locales limitées à quelques établissements géographiquement proches et où la diffusion est clairement liée à des échanges directs de patients entre les établissements.

Cette situation nécessite une sensibilisation des bactériologistes français afin i) que la résistance au linézolide chez une souche de staphylocoque fasse l’objet d’une confirmation systématique avant d’être rendu aux cliniciens, ii) que toute souche de staphylocoque résistante au linézolide soit systématiquement adressées au CNR.

Enfin une information renouvelée auprès des prescripteurs concernant l’impact d’une trop forte pression de sélection liée à l’utilisation du linézolide sur l’émergence de souches résistantes est nécessaire afin de conserver à l’avenir cette molécule comme alternative et/ou recours possible en cas de souches multi-résistantes ou de patients chez qui les autres antibiotiques ne peuvent plus être utilisés.

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 de nombreux étudiants et stagiaires issues de diverses formations.

Thèse d’exercice

Laetitia Beraud. "Etude de l’influence des antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices sur l’expression des PSM α chez *Staphylococcus aureus*". Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard - Lyon I

Thèse d’université

- Florent valour. « Etude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la chronicité des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* » Ecole Doctorale E2M2 Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation, Université Claude Bernard – Lyon I.

- Sophie Trouillet « Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* : Etude de la réponse ostéoblastique et ostéoclastique » Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard - Lyon I.

- Céline Dupieux « Mécanismes de pathogénie intracellulaire des *Staphylococcus aureus* hypervirulents au cours de l’infection osseuse » Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard – Lyon I.

- Jason Tasse « Etude de l’impact de la formation de biofilm dans des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* » (Bourse CIFRE) Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard – Lyon I.

- Marine Butin « *Staphylococcus capitis* multirésistant responsable de sepsis en réanimation néonatale : épidémiologie, caractérisation moléculaire et physiopathologie » Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard – Lyon I.M2

- Emilie Martin. « Etude des mécanismes impliqués dans la modulation de la virulence de *Staphylococcus aureus* par les b-lactamines ». Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard - Lyon I

- Isaline Jacquemond. « Impact du microbiote vaginal sur le développement du syndrome du choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle ». Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard - Lyon I (co-encadrement avec D. Muller).
- Elisabeth Hodille. « Identification des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* capables d'activer les mastocytes humains cutanés » Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard - Lyon I
- Coralie Bouchiat. « Génétique et Génomique de l'endocardite infectieuse à *Staphylococcus aureus* » Ecole Doctorale E2M2 "Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation", Université Claude Bernard - Lyon I

Master 2

- Elisabeth Hodille. Master 2 Infectiologie Fondamentale, Université Claude Bernard - Lyon I
- Anaëlle Muggeo. Master 2 Infectiologie Fondamentale, Université Claude Bernard - Lyon I
- Lucie Lelievre, Master 2 Recherche Pathologie Humaine, Université d'Aix-Marseille
- Sacha FLAMMIER, Master de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Lyon
- Pauline Abrial, Master 2 Ecoscience Microbiologie, Université Claude Bernard - Lyon I

Master 1

- Manon Metrat « Caractéristiques cliniques, épidémiologiques des *S. aureus* USA300 versus *S. aureus* USA300 ACME négatif » Master I « Physiopathologie des maladies transmissibles »
- Cathie Faussat « PaleoStaph : Détection et séquençage haut débit de génomes anciens de *Staphylococcus aureus* sur des objets manipulés par *Homo sapiens* » Master I « Physiopathologie des maladies transmissibles »

Stagiaires IUT

- Laura VALOUR – IUT Lyon « Etude de la diversité des capacités d'internalisation des souches cliniques de *S. aureus* au cours des infections ostéo-articulaires »
- Caroline CAMUS – IUT Lyon « Etude de l'implication des mécanismes d'autophagie au cours des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* »

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

5.2 Les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

En 2014, le CNR a participé à l'élaboration des nouvelles recommandations sur la « Conduite à tenir lors d'épisodes de cas groupés d'infections cutanées suppuratives liées aux souches de SARM Co ».

<http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=453>

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 <http://cnr.univ-lyon1.fr> 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 2014 focalisée sur les données récentes du CNR des staphylocoques

Lina G. Panton-Valentine leukocidine: an underestimated virulence factor produced by *Staphylococcus aureus*. 4^{ème} Journée Recherche du Campus Santé Rennes, Janvier 2014, Rennes.

Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia epidemiology and pathogenesis. 14th International Symposium on Current Topics in Infectious Diseases. Grindelwald, Switzerland, January 26 to 31, 2014

Lina G. Impact of vaginal microbiote on the development of menstrual toxic shock syndrome. 2^{ème} journée Ecofect, Février 2014, Lyon.

Lina G. Les bactéries à Gram positives multirésistantes : probabilités de résistance ? Que craindre ? Académie de Médecine, Mars 2014, Paris.

Lina G. Comparaison CA-SFM / EUCAST : des exemples chez les bactéries à Gram positif. 10^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Mars 2014, Paris.

Laurent F. Interactions *Staphylococcus aureus*-Osteobalasts-Osteoclasts. Annual Oxford Bone Infection Conference, Avril 2014, Oxford

Vandenesch F. Facteurs de virulence du staphylocoque: Nouveaux paradigmes. Journées Nationales d'Infectiologie. Bordeaux, 11-13 juin 2104.

Vandenesch F. CA-MRSA emergence, virulence and spread : input of genomic. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Tristan A. DNA microarrays: principles and tools for data analysis. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Laurent F. SLST, MLST, MLVA, DNA microarrays: principles and tools for data analysis. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Vandenesch F. Spicilège of the 2014 Chicago ISSSSI. SympoStaph, Lyon, 20-21 octobre 2014.

Martins Simoes P. *Staphylococcus capitis* in nosocomial bacteraemia in intensive care neonates: worldwide distribution of an endemic methicillin-resistant clone (NRCS-A). SympoStaph 2014, Lyon, 20 Octobre 2014

Rasigade JP. Staphylocoques : Toxines & Co. en 2014. Sympostaph, 2014, Lyon, 20 octobre 2014

Laurent F. WGS and *Staphylococcus aureus* : Investigation of epidemiology and evolution
Journée de la section des agents antimicrobiens – Société Française de microbiologie, Paris, 26 Novembre 2014

Lina G. CA-SFM EUCAST : détection de la résistance aux glycopeptides. 34ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2014, Paris.

Vandenesch F. CA-MRSA emergence, virulence and spread: Europe vs USA. Hospital Infection Society Congress. Lyon, 16-18 Novembre 2014.

Vandenesch F. Vaccination anti-staphylococcique. Colloque de la Coordination Vaccinale du CHU de Lyon. Lyon, 25 novembre 2014

Vandenesch F. Approche Génomique de la Virulence chez *S. aureus*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Vandenesch F. Actualités du CNR des Staphylocoques. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Hodille E. Symposium « effets non antibiotiques des antibiotiques » : « Effets des antibiotiques et peptides antimicrobiens sur la virulence de *S. aureus* » Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Lina G. Panton-Valentine leukocidine: an underestimated virulence factor produced by *Staphylococcus aureus* ? Colloque d'infectiologie de l'hôpital Cantonale, Novembre 2014, Genève, Suisse.

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 a organisé du **30 Juin au 4 Juillet 2014** du **”PostGraduate Workshop for Microbiology Typing”** sous l'égide de **Société Européenne de Microbiologie et de maladies infectieuses (ESCMID)** (programme Annexe 5). Le CNR des staphylocoques a été chargé par l'ESGEM (European Study Group for Epidemiological Markers) et l'ESGS (European Study Group for Staphylococci) sous l'égide de l'ESCMID d'organiser un workshop européen dédié aux techniques de typage moléculaire des pathogènes (ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens) qui a eu lieu à Lyon du 30 Juin au 4 juillet. Il a regroupé près d'une trentaine de jeunes médecins, microbiologistes, vétérinaires venus de 15 pays différents. Ils ont pu écouter et échanger avec 18 experts européens impliqués dans la caractérisation moléculaires tant au niveau des outils les plus récents développés dans ce domaine que dans leur utilisation au quotidien. La partie théorique était complétée par des démonstrations techniques et par la prise en main des outils informatiques dans des salles équipées et dédiées à ces "travaux pratiques".

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 ont fait 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.

ESCMID - ESGS

Le CNR Français est à l'origine de la création au sein de l'ESCMID de l'European Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS). Ce groupe comporte actuellement 62 membres issues de 23 pays. Son comité exécutif est formé de 5 personnes dont 2 sont issues du CNR des staphylocoques français : F.Vandenesch (France, Chair), J.Lindsay (UK, Secretary), B. Kahl (Germany, Treasurer), M. Herrmann (Germany, Vice Secret), F.Laurent (France, Vice-Secret). Parmi les multiples missions de ce groupe, deux ont une importance majeure dans le cadre des missions du CNR :

- Organiser un contrôle de qualité externe pour les laboratoires de référence Européens. Cet EQC a été organisé en 2014 pour 11 laboratoires participants de 9 pays d'Europe (cf Annexe 1.4.5.3)
- Organiser une étude multicentrique européenne pour déterminer la prévalence des SARM communautaires dans les infections cutanées à *S. aureus* de patients admis dans les services d'urgence; le modèle étant celui de l'étude de Moran⁵. Six pays participent actuellement au recrutement de patients dans le cadre d'une étude pilote coordonnée par le CNR Français (cf chapitre 8).

⁵ Moran et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. N Engl J Med (2006) vol. 355 (7) pp. 666-74

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

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

Pour chacun de ces travaux, rappeler (i) les objectifs ; (ii) Les partenariats et l'apport du CNR, (iii) L'état d'avancement et le cas échéant les principaux résultats. Pour les travaux ayant fait l'objet d'une publication, il suffit de reporter le résumé (abstract).

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 22 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (<http://ciri.inserm.fr/en/>). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un axe 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 (y compris dans ses approches génomiques), la résistance et la clinique des infections staphylococciques ; il constitue l'axe le plus directement en lien avec l'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques.

En 2014, 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.

Evaluation des performances du GeneXpert pour la détection de *S. aureus* directement à partir des liquides articulaires

Journal. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Mar;78(3):313-5.

Title. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay.

Authors. Valour F, Blanc-Pattin V, Freydière AM, Bouaziz A, Chanard E, Lustig S, Ferry T, Laurent F; Lyon Bone Joint Infection Study Group.

Abstract. The GeneXpert MRSA/SA SSTI assay was compared to conventional cultures to detect *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistance from 91 bone and joint infection samples. Sensitivity and specificity were 94.4% and 100%. Three false-positive results were observed, in fact providing from patients known to be infected by *S. aureus* on the basis of other concomitant osteoarticular samples, which suggests that PCR was more sensitive than culture. This diagnosis accuracy may help shorten toxic and non-optimal empirical therapies such as glycopeptides in case of methicillin-susceptible strains.

Epidémiologie des *S. aureus* responsables d'infection ostéo-articulaires révélant une forte prévalence de la lignée CC398.

Journal. Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):O772-5.

Title. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex 398: high prevalence and geographical heterogeneity in bone and joint infection and nasal carriage.

Authors. Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lamy B, Chanard E, Verhoeven P, Decousser JW, Marchandin H, Bes M, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F; Lyon Bone and Joint Infection study group

Abstract. The prevalence of clonal complex (CC) 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) was unexpectedly high among bone and joint infections (BJIs) and nasal-colonizing isolates in France, with surprising geographical heterogeneity. With none of the major, most-known staphylococcal virulence genes, MSSA CC398 BJI was associated with lower biological inflammatory syndrome and lower treatment failure rates.

Revue et recommandations sur la place du linézolide dans l'arsenal thérapeutique des infections cutanées à *S. aureus*.

Journal. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20 Suppl 4:1-2.

Title. What is the place of linezolid in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia and complicated skin and soft tissue infections in Europe?

Authors. [Dumitrescu O](#), [Lina G](#).

Abstract. (pas d'abstract)

Travaux rapportant une épidémie d'infections à SASM producteurs de PVL dans une prison de l'Ouest de la France.

Journal. PLoS Curr. 2014 Mar 7;6

Title. Outbreak of Skin Infections Due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a French Prison in 2010-2011

Authors. Bourigault C, Corvec S, Brulet V, Robert PY, Mounoury O, Goubin C, Boutoille D, Hubert B, [Bes M](#), [Tristan A](#), [Etienne J](#), Lepelletier D.

Abstract. Background. An outbreak of PVL-positive MSSA skin and soft tissue-infections (SSTIs) was suspected in May 2010 when recurrent SSTI was diagnosed in an inmate of a large prison in Nantes, France. Methods and findings. Retrospective and prospective investigations were performed. Microbiological characterisation was by DNA microarray testing (*S. aureus* genotyping - Identibac, Alere). We identified 14 inmates meeting our clinical and microbiological case definition for PVL-MSSA SSTI between March 2010 and April 2011. The SSTIs developed in tattooed areas in 4 patients and in areas shaved daily with a mechanical razor in 4 other patients. All case isolates exhibited a similar Smal pulsed-field gel electrophoresis pattern. Microarray analysis showed that all 14 isolates harboured genes encoding PVL and enterotoxins (A, H, K, and Q) and belonged to clonal complex 1 (CC1). Individual and collective hygiene measures, education delivered to inmates and prison employees, and antibiotic treatment of SSTIs were successful in controlling the outbreak. No new cases were identified after April 2011. Routine screening for PVL-positive MSSA carriage was not feasible. Conclusions. Our data suggest that tattooing and shaving with mechanical razors may constitute risk factors for SSTIs among previously colonised inmates and contribute to the PVL-MSSA outbreak in the prison. Allowing inmates access to professional tattooists and to the hygiene and safety conditions available to people in the community would help to prevent tattoo-related infections.

Travaux rapportant l'épidémie d'infections à *S. aureus* USA300 dans une crèche familiale du massif central.

Journal. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct;33(10):1757-62.

Title. First outbreak of community-acquired MRSA USA300 in France: failure to suppress prolonged MRSA carriage despite decontamination procedures.

Authors Baud O, Giron S, Aumeran C, Mouly D, Bardon G, Besson M, Delmas J, Coignard B, [Tristan A](#), [Vandenesch F](#), [Illes G](#), Lesens O

Abstract. The first French outbreak of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) USA300 clone was investigated. After outbreak investigation, hygiene measures were implemented in all family households and

childminders' homes. Several decontamination procedures were performed, which used a combination of topical mupirocin, total body application of chlorhexidine, chlorhexidine gargle (if >6 years old) and a course of antibiotic therapy in cases of infection or decontamination failure. Patients were followed up for MRSA skin and soft tissue infections (SSTIs) and carriage. Strains were characterised by antimicrobial drug resistance profile, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and DNA microarrays. Between June 2011 and June 2012, six children and six adults among the ten corresponding relatives developed 28 SSTIs. None of the family members, including the index case, had any contact with foreigners or individuals known to have SSTIs. After infection control measures and prolonged decontamination have been implemented with a high adherence, six patients remained sustained CA-MRSA USA300 carriers, including one who developed mupirocin resistance and six who experienced minor CA-MRSA-related SSTIs. A baby was identified as an MRSA carrier 2 months after delivery. CA-MRSA decontamination using mupirocin and chlorhexidine in the community setting may also be a questionable strategy, associated with failure and resistance to both agents. Close monitoring of CA-MRSA SSTIs is required in France and in other European countries where MRSA USA300 has recently emerged. We showed that a closed management based on hygiene measures reinforcement, decolonisation and extended screening may fail to suppress CA-MRSA carriage and subsequent infections.

Travaux montrant que la résistance aux glycopeptides chez *S. aureus* peut être induite par une exposition aux antibiotiques de type bêta-lactamines

Journal. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5306-14.

Title. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*.

Authors. Roch M, Clair P, Renzoni A, Reverdy ME, Dauwalder O, Bes M, Martra A, Freydière AM, Laurent F, Reix P, Dumitrescu O, Vandenesch F.

Abstract. Glycopeptides are known to select for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (h-VISA) from susceptible strains. In certain clinical situations, h-VISA strains have been isolated from patients without previous exposure to glycopeptides, such as cystic fibrosis patients, who frequently receive repeated treatments with beta-lactam antibiotics. Our objective was to determine whether prolonged exposure to beta-lactam antibiotics can induce h-VISA. We exposed 3 clinical vancomycin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains to ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, and vancomycin (as a control) at subinhibitory concentrations for 18 days in vitro. Population analyses showed progressive increases in vancomycin resistance; seven of the 12 derived strains obtained after induction were classified as h-VISA according to the following criteria: area under the curve (AUC) on day 18/AUC of Mu3 of $\geq 90\%$ and/or growth on brain heart infusion (BHI) agar with 4 mg/liter vancomycin. The derived isolates had thickened cell walls proportional to the level of glycopeptide resistance. Genes known to be associated with glycopeptide resistance (*vraSR*, *yvqF*, SA1703, *graRS*, *walKR*, and *rpoB*) were PCR sequenced; no de novo mutations were observed upon beta-lactam exposure. To determine whether *trfA*, a gene encoding a glycopeptide resistance factor, was essential in the selection of h-VISA upon beta-lactam pressure, a *trfA*-knockout strain was generated by allelic replacement. Indeed, beta-lactam exposure of this mutated strain showed no capacity to induce vancomycin resistance. In conclusion, these results showed that beta-lactam antibiotics at subinhibitory concentrations can induce intermediate vancomycin resistance in vitro. This induction required an intact *trfA* locus. Our results suggest that prior use of beta-lactam antibiotics can compromise vancomycin efficacy in the treatment of MRSA infections.

Travaux révélant que l'immunité vis à vis de la leucodine de Panton Valentine dans la population est corrélée à la prévalence des infections à *S. aureus* PVL Positives.

Journal. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Jan 10.

Title. The levels of antibodies to Panton-Valentine leukocidin (PVL) vary with PVL prevalence along a north-to-south gradient

Authors. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Breurec S, Antri K, Lina G, Bes M, Tristan A, Badiou C, Bernelin M, Fall C, Ramdani-Bouguessa N, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F.

Abstract. Recent research on *Staphylococcus aureus* vaccine development has focused on active immunization against Panton-Valentine leukocidin (PVL), a potent leukotoxin associated with both superficial and severe deep-seated infections. PVL prevalence is highly variable worldwide, but it is unknown to what extent immunity to PVL varies between patients from geographic areas with different PVL-positive *S. aureus* prevalences. We conducted a retrospective multicentric study of anti-PVL and anti-alpha-toxin (Hla) antibody levels in uninfected adult patients from France (low PVL prevalence; n = 200), Algeria (moderate prevalence; n = 143), and Senegal (high prevalence; n = 228). The antibody levels were quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. Because Hla is present in virtually all *S. aureus* strains, its corresponding antibody levels were considered to reflect population exposure to *S. aureus*. Compared with French participants, the average anti-PVL antibody levels were 2.5-fold and 8.2-fold higher in Algerian and Senegalese participants, respectively ($p < 0.001$). Conversely, anti-Hla antibody levels did not differ between participants from the three countries, suggesting that the observed differences in anti-PVL antibody levels were not biased by variations in population exposure to *S. aureus*. Hence, anti-PVL antibody levels in the general populations of France, Algeria, and Senegal vary widely and match variations in PVL-positive *S. aureus* strain prevalence, with an increasing north-to-south gradient. To conclude, immunity to PVL in a given population correlates with local PVL prevalence. This finding can help to inform PVL vaccine strategies.

Travaux révélant la présence du SARM communautaire USA 300 en France à des taux similaires à celui des autres SARM co, en particulier ST80

Journal. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Jan 10.

Title. The incidence of *Staphylococcus aureus* ST8-USA300 among French pediatric inpatients is rising.

Authors. van der Mee-Marquet N, Poisson DM, Lavigne JP, Francia T, Tristan A, Vandenesch F, Quentin R, Bertrand X.

Abstract. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) formerly colonized and infected only inpatients in hospitals, but have been reported in community settings worldwide over the last 20 years. In France, the prevalence of such MRSA remains low and outbreaks have, until now, been mainly due to the ST80 clone. However, there were two outbreaks of MRSA clone ST-USA300 recently in France, including one involving children. To investigate epidemiological developments, we studied the 77 MRSA isolated from pediatric patients hospitalized between 2008 and 2013 in three French hospitals. The median incidence of MRSA was stable and low (0.137 per 100 admissions). The prevalence of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive MRSA was high (33.8 %). The 26 PVL-positive MRSA were genetically diverse, with two clones being predominant: ST80 (12 isolates, 46.1 %) and ST8-USA300 (8 isolates, 30.8 %). The incidence of ST8-USA300 increased over the 6-year period. We believe that screening for ST8-USA300 should be improved: medical biologists should be encouraged to search for PVL genes in all MRSA isolates recovered from abscesses, whatever the susceptibility pattern of the isolate, and not only when suggestive of ST80.

Travaux proposant l'utilisation d'un modèle cellulaire simple pour redéfinir les molécules antibiotiques les plus appropriées dans le cadre des infections ostéo-articulaires à *S. aureus*.

Journal. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):2029-36.

Title. Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*.

Authors. Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade JP, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F.

Abstract. Although *Staphylococcus aureus* persistence in osteoblasts, partly as small-colony variants (SCVs), can contribute to bone and joint infection (BJI) relapses, the intracellular activity of antimicrobials is not currently considered in the choice of treatment strategies for BJI. Here, antistaphylococcal antimicrobials were evaluated for their intraosteoblastic activity and their impact on the intracellular emergence of SCVs in an ex vivo osteoblast infection model. Osteoblastic MG63 cells were infected for 2 h with HG001 *S. aureus*. After killing the remaining extracellular bacteria with lysostaphin, infected cells were incubated for 24 h with antimicrobials at the intraosseous concentrations reached with standard therapeutic doses. Intracellular bacteria and SCVs were then quantified by plating cell lysates. A bactericidal effect was observed with fosfomicin, linezolid, tigecycline, oxacillin, rifampin, ofloxacin, and clindamycin, with reductions in the intracellular inocula of -2.5, -3.1, -3.9, -4.2, -4.9, -4.9, and -5.2 log₁₀ CFU/100,000 cells, respectively ($P < 10^{-4}$). Conversely, a bacteriostatic effect was observed with ceftaroline and teicoplanin, whereas vancomycin and daptomycin had no significant impact on intracellular bacterial growth. Ofloxacin, daptomycin, and vancomycin significantly limited intracellular SCV emergence. Overall, ofloxacin was the only molecule to combine an excellent intracellular activity while limiting the emergence of SCVs. These data provide a basis for refining the choice of antibiotics to prioritise in the management of BJI, justifying the combination of a fluoroquinolone for its intracellular activity with an anti-biofilm molecule, such as rifampin.

Travaux révélant qu'un marqueur simple issu de l'identification MALDI TOF de routine permet de prédire la propension de *S. aureus* à donner des infections ostéo-articulaires chroniques

Journal. Clin Microbiol Infect. 2015 Feb 10.

Title. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation.

Authors. Valour F, Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, Lacour C, Bes M, Lustig S, Bénet T, Chidiac C, Etienne J, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F; Lyon BJI Study Group.

Abstract. Biofilm formation, intra-osteoblastic persistence, small-colony variants (SCVs) and the dysregulation of agr, the major virulence regulon, are possibly involved in staphylococcal bone and joint infection (BJI) pathogenesis. We aimed to investigate the contributions of these mechanisms among a collection of 95 *Staphylococcus aureus* clinical isolates from 64 acute (67.4%) and 31 chronic (32.6%) first episodes of BJI. The included isolates were compared for internalization rate, cell damage and SCV intracellular emergence using an ex vivo model of human osteoblast infection. Biofilm formation was assessed in a microbead immobilization assay (BioFilm Ring test). Virulence gene profiles were assessed by DNA microarray. Seventeen different clonal complexes were identified among the screened collection. The staphylococcal internalization rate in osteoblasts was significantly higher for chronic than acute BJI isolates, regardless of the genetic background. Conversely, no differences regarding cytotoxicity, SCV emergence, biofilm formation and virulence gene distribution were observed. Additionally, agr dysfunction, detected by the lack of delta-toxin production using whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-

TOF) analysis (n = 15; 15.8%), was significantly associated with BJI chronicity, osteoblast invasion and biofilm formation. These findings provide new insights into MSSA BJI pathogenesis, suggesting the correlation between chronicity and staphylococcal osteoblast invasion. This adaptive mechanism, along with biofilm formation, is associated with agr dysfunction, which can be routinely assessed by delta-toxin detection using MALDI-TOF spectrum analysis, possibly providing clinicians with a diagnostic marker of BJI chronicity at the time of diagnosis.

Travaux révélant les origines africaines du clone de SARM communautaire ST80 et prédisant une déclin démographique de ce clone

Journal. MBio. 2014 Aug 26;5(5):e01044-14.

Title. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. MBio. 2014 Aug 26;5(5):e01044-14.

Authors. Stegger M, Wirth T, Andersen PS, Skov RL, De Grassi A, Simões PM, Tristan A, Petersen A, Aziz M, Kiil K, Cirković I, Udo EE, del Campo R, Vuopio-Varkila J, Ahmad N, Tokajian S, Peters G, Schaumburg F, Olsson-Liljequist B, Givskov M, Driebe EE, Vigh HE, Shittu A, Ramdani-Bougessa N, Rasigade JP, Price LB, Vandenesch F, Larsen AR, Laurent F. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. MBio. 2014 Aug 26;5(5):e01044-14.

Abstract. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) was recognized in Europe and worldwide in the late 1990s. Within a decade, several genetically and geographically distinct CA-MRSA lineages carrying the small SCCmec type IV and V genetic elements and the Panton-Valentine leukocidin (PVL) emerged around the world. In Europe, the predominant CA-MRSA strain belongs to clonal complex 80 (CC80) and is resistant to kanamycin/amikacin and fusidic acid. CC80 was first reported in 1993 but was relatively rare until the late 1990s. It has since been identified throughout North Africa, the Middle East, and Europe, with recent sporadic reports in sub-Saharan Africa. While strongly associated with skin and soft tissue infections, it is rarely found among asymptomatic carriers. Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) CC80 strains are extremely rare except in sub-Saharan Africa. In the current study, we applied whole-genome sequencing to a global collection of both MSSA and MRSA CC80 isolates. Phylogenetic analyses strongly suggest that the European epidemic CA-MRSA lineage is derived from a PVL-positive MSSA ancestor from sub-Saharan Africa. Moreover, the tree topology suggests a single acquisition of both the SCCmec element and a plasmid encoding the fusidic acid resistance determinant. Four canonical SNPs distinguish the derived CA-MRSA lineage and include a nonsynonymous mutation in accessory gene regulator C (*agrC*). These changes were associated with a star-like expansion into Europe, the Middle East, and North Africa in the early 1990s, including multiple cases of cross-continent imports likely driven by human migrations.

Travaux non publiés contribuant à mieux prédire l'évolution de l'épidémiologie des SARM USA300.

Parmi les faits marquants non publiés, l'approche génomique utilisée pour l'étude phylogéographique de ST80 (cf supra) a été appliquée à la lignée USA300. Les souches issues de 24 cas sporadiques et de 4 mini-épidémies survenues en France au cours des 11 dernières années ont été séquencées et comparées aux génomes de 469 isolats d'origine américaine sur une période de 15 ans. L'analyse phylogénétique révèle que les souches issues des cas Français sont diverses et s'intercalent parfaitement au sein de la diversité des souches américaines. Ce résultat révèle de multiples introductions en France de souches USA300 d'origine américaine, multiples introductions qui n'ont pas trouvé à ce jour un environnement favorable à une diffusion épidémique massive. Par ailleurs, la

démographie de la population d'USA300 calculée sur un modèle bayésien (taille effective de la population au cours du temps) révèle une évolution démographique en deux temps avec une première expansion dans les années 1970 (probablement en Amérique du Sud) puis d'une deuxième vague dans les années 1990 coïncidant avec l'acquisition de l'élément ACME. Cette expansion atteint son apogée en 2005 et est suivie depuis d'une décroissance de la population suggérant un déclin de ce clone. Cette observation supporte le modèle globalement observé en Europe actuellement selon lequel le clone USA300 n'est pas en phase majeure d'expansion en Europe et ne devrait pas constituer une menace pour la santé publique dans un avenir proche.

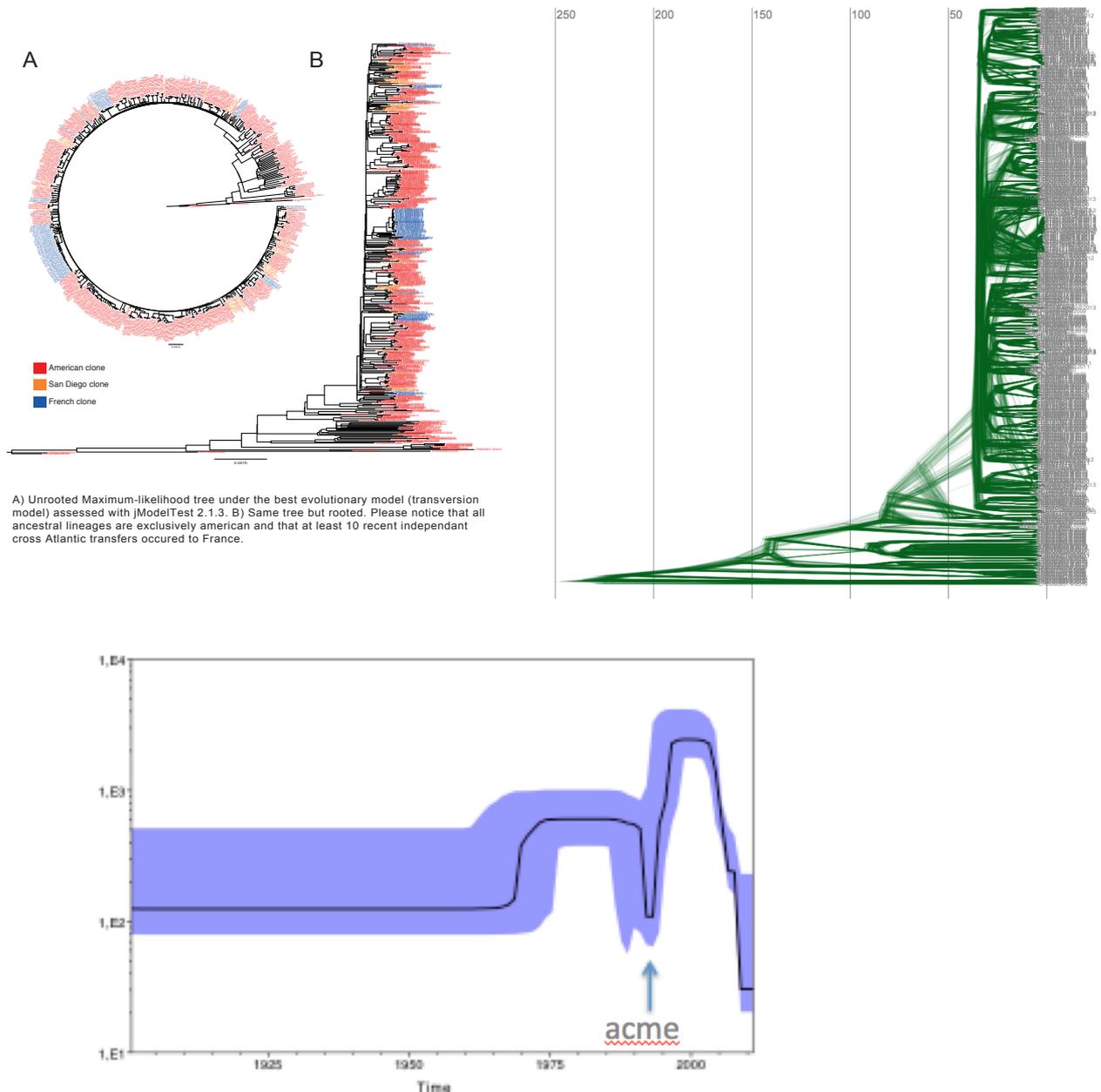


Figure 12- Bayesian analyses of the USA300 lineage. A) DensiTree representation of the Bayesian coalescent trees using a strict clock model. Tips of the trees are constrained by year of isolation, the time scale is shown at the top. B) Effective population size through time (Bayesian skyline) of the *S. aureus* USA300 lineage. The shaded area represents the 95% confidence intervals, and the arrows point to potential 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 ci-dessous surlignées en **vert**. Pour une **vision plus intégrée** 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 staphylocoques. Les publications **en noir** sont celles du laboratoire de Microbiologie clinique hors champ des staphylocoques.

2014

Rasigade JP, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:510-4.

Senneville E, Brière M, Neut C, Messad N, Lina G, Richard JL, Sotto A, Lavigne JP; French Study Group on the Diabetic Foot. 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. 2014 Apr;20(4):O274-7.

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

Valour F, Karsenty J, Bouaziz A, Ader F, Tod M, Lustig S, Laurent F, Ecochard R, Chidiac C, Ferry T; 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;58(2):746-55.

Cornut PL, Boisset S, Romanet JP, Maurin M, Carricajo A, Benito Y, Vandenesch F, Chiquet C. Principles and applications of molecular biology techniques for the microbiological diagnosis of acute post-operative endophthalmitis. Surv Ophthalmol. 2014 May-Jun;59(3):286-303.

Valour F, Blanc-Pattin V, Freydière AM, Bouaziz A, Chanard E, Lustig S, Ferry T, Laurent F; Lyon Bone Joint Infection Study Group. 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. 2014 Mar;78(3):313-5.

Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Danel C, Couzon F, Dumitrescu O, Lilin T, Perronne C, Etienne J, Lina G, Vandenesch F. α -Hemolysin, not Panton-Valentine leukocidin, impacts rabbit mortality from severe sepsis with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. J Infect Dis. 2014 Jun 1;209(11):1773-80.

Croisier-Bertin D, Hayez D, Da Silva S, Labrousse D, Biek D, Badiou C, Dumitrescu O, Guerard P, Charles PE, Piroth L, Lina G, Vandenesch F, Chavanet P. In vivo efficacy of ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* rabbit pneumonia model. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(4):1855-61.

Valour F, Tasse J, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lamy B, Chanard E, Verhoeven P, Decousser JW, Marchandin H, Bes M, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F; Lyon Bone and Joint Infection study group. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clonal complex 398: high prevalence and geographical heterogeneity in bone and joint infection and

nasal carriage. Clin Microbiol Infect. 2014 Oct;20(10):O772-5.

Dumitrescu O, Lina G. What is the place of linezolid in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia and complicated skin and soft tissue infections in Europe? Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20 Suppl 4:1-2.

Bourigault C, Corvec S, Brulet V, Robert PY, Mounoury O, Goubin C, Boutoille D, Hubert B, Bes M, Tristan A, Etienne J, Lepelletier D. Outbreak of Skin Infections Due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a French Prison in 2010-2011. PLoS Curr. 2014 Mar 7;6.

Romilly C, Lays C, Tomasini A, Caldelari I, Benito Y, Hammann P, Geissmann T, Boisset S, Romby P, Vandenesch F. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog. 2014 Mar 20;10(3):e1003979.

Fall C, Richard V, Dufougeray A, Biron A, Seck A, Laurent F, Breurec S. *Staphylococcus aureus* nasal and pharyngeal carriage in Senegal. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20(4):O239-41.

Haenni M, Châte P, Tasse J, Nowak N, Bes M, Madec JY, Laurent F. Geographical clustering of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in France. J Antimicrob Chemother. 2014 Aug;69(8):2292-3.

Bouchiat C, Mehenni C, Meugnier H, Bes M, Tristan A, Vandenesch F. Limitations of staphylokinase as a marker for *Staphylococcus aureus* invasive infections in humans. J Infect Dis. 2014 Oct 15;210(8):1341-3.

Baud O, Giron S, Aumeran C, Mouly D, Bardon G, Besson M, Delmas J, Coignard B, Tristan A, Vandenesch F, Illes G, Lesens O. First outbreak of community-acquired MRSA USA300 in France: failure to suppress prolonged MRSA carriage despite decontamination procedures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct;33(10):1757-62.

Traore P, Bourgeois-Nicolaos N, Ruimy R, Laurent F, Labrune P, Doucet-Populaire F, Decousser JW. First autochthonous familial cluster of invasive community-acquired leukocidin-positive methicillin-resistant USA300 *Staphylococcus aureus* in France. Folia Microbiol (Praha). 2014 Nov;59(6):473-6.

Labrousse D, Perret M, Hayez D, Da Silva S, Badiou C, Couzon F, Bes M, Chavanet P, Lina G, Vandenesch F, Croisier-Bertin D, Henry T. Kineret®/IL-1ra blocks the IL-1/IL-8 inflammatory cascade during recombinant Panton Valentine Leukocidin-triggered pneumonia but not during *S. aureus* infection. PLoS One. 2014 Jun 6;9(6):e97546.

Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. Clin Microbiol Infect. 2014 Jul;20(7):587-8.

Roch M, Clair P, Renzoni A, Reverdy ME, Dauwalder O, Bes M, Martra A, Freydière AM, Laurent F, Reix P, Dumitrescu O, Vandenesch F. Exposure of *Staphylococcus aureus* to subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics induces heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5306-14.

Trouillet-Assant S, Gallet M, Nauroy P, Rasigade JP, Flammier S, Parroche P, Marvel J, Ferry T, Vandenesch F, Jurdic P, Laurent F. Dual impact of live *Staphylococcus aureus* on the osteoclast lineage, leading to increased bone resorption. J Infect Dis. 2015 Feb 15;211(4):571-81.

Dermota U, Zdovc I, Strumbelj I, Grmek-Kosnik I, Ribic H, Rupnik M, Golob M, Zajc U, Bes

M, [Laurent F](#), [Mueller-Premru M](#). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples in Slovenia. *Epidemiol Infect.* 2015 Apr;143(5):1105-8.

[Hammann P](#), [Parmentier D](#), [Cerciat M](#), [Reimegård J](#), [Helfer AC](#), [Boisset S](#), [Guillier M](#), [Vandenesch F](#), [Wagner EG](#), [Romby P](#), [Fechter P](#). A method to map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biochimie.* 2014 Nov;106:175-9.

[Valour F](#), [Bouaziz A](#), [Karsenty J](#), [Ader F](#), [Lustig S](#), [Laurent F](#), [Chidiac C](#), [Ferry T](#); Lyon BJI study group. Determinants of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* native bone and joint infection treatment failure: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2014 Aug 16;14:443.

[Gatin L](#), [Saleh-Mghir A](#), [Tasse J](#), [Ghout I](#), [Laurent F](#), [Crémieux AC](#). Ceftaroline-Fosamil efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rabbit prosthetic joint infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Nov;58(11):6496-500.

[Dubos M](#), [Barraud O](#), [Fedou AL](#), [Fredon F](#), [Laurent F](#), [Brakbi Y](#), [Cypierre A](#), [François B](#). Prostatic abscesses and severe sepsis due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *BMC Infect Dis.* 2014 Aug 27;14:466.

[Stegger M](#), [Wirth T](#), [Andersen PS](#), [Skov RL](#), [De Grassi A](#), [Simões PM](#), [Tristan A](#), [Petersen A](#), [Aziz M](#), [Kiil K](#), [Cirković I](#), [Udo EE](#), [del Campo R](#), [Vuopio-Varkila J](#), [Ahmad N](#), [Tokajian S](#), [Peters G](#), [Schaumburg F](#), [Olsson-Liljequist B](#), [Givskov M](#), [Driebe EE](#), [Vigh HE](#), [Shittu A](#), [Ramdani-Bougessa N](#), [Rasigade JP](#), [Price LB](#), [Vandenesch F](#), [Larsen AR](#), [Laurent F](#). Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 2014 Aug 26;5(5):e01044-14.

[Mairpady Shambat S](#), [Haggard A](#), [Vandenesch F](#), [Lina G](#), [van Wamel WJ](#), [Arakere G](#), [Svensson M](#), [Norrby-Teglund A](#). Levels of alpha-toxin correlate with distinct phenotypic response profiles of blood mononuclear cells and with agr background of community-associated *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One.* 2014 Aug 28;9(8):e106107.

[Dupieux C](#), [Camus C](#), [Lina G](#), [Vandenesch F](#), [Laurent F](#), [Rasigade JP](#). Does β -toxin Production Contribute to the Cytotoxicity of Hypervirulent *Staphylococcus aureus*? *J Infect Dis.* 2015 Mar 1;211(5):846-7.

[Lemriss H](#); [Martins Simões P](#), [Lemriss S](#), [Butin M](#), [Ibrahimi A](#), [El Kabbaj S](#), [Rasigade J](#), [Laurent F](#). Non-contiguous finished genome sequence of *Staphylococcus capitis* CR01 (pulsotype NRCS-A). *Stand Genomic Sci.* 2014 Apr 15;9(3):1118-27.

[Trouillet-Assant S](#), [Bes M](#), [Meugnier H](#), [Tigaud S](#), [Etienne J](#), [Vandenesch F](#), [Laurent F](#). Evaluation of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay as a method for detection of MRSA isolates, using a large collection of European and North African isolates. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec;52(12):4372-4.

[Lays C](#), [Romilly C](#), [Tomasini A](#), [Caldelari I](#), [Benito Y](#), [Hammann P](#), [Geissmann T](#), [Boisset S](#), [Romby P](#), [Vandenesch F](#). [RsaA non-coding RNA promotes bacterial persistence and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus*]. *Med Sci (Paris).* 2014 Oct;30(10):839-41.

[Spaan AN](#), [Vrieling M](#), [Wallet P](#), [Badiou C](#), [Reyes-Robles T](#), [Ohneck EA](#), [Benito Y](#), [de Haas CJ](#), [Day CJ](#), [Jennings MP](#), [Lina G](#), [Vandenesch F](#), [van Kessel KP](#), [Torres VJ](#), [van Strijp JA](#), [Henry T](#). The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun.* 2014 Nov 11;5:5438.

2015

[Cardot Martin E](#), [Michel A](#), [Raynal B](#), [Badiou C](#), [Laurent F](#), [Vandenesch F](#), [Etienne J](#), [Lina G](#), [Dumitrescu O](#). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jan;45(1):19-24.

[Rasigade JP](#), [Trouillet-Assant S](#), [Breurec S](#), [Antri K](#), [Lina G](#), [Bes M](#), [Tristan A](#), [Badiou C](#), [Bernelin M](#), [Fall C](#), [Ramdani-Bougouessa N](#), [Etienne J](#), [Vandenesch F](#), [Laurent F](#). The levels of antibodies to Pantone-Valentine leukocidin (PVL) vary with PVL prevalence along a north-to-south gradient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jan 10.

[van der Mee-Marquet N](#), [Poisson DM](#), [Lavigne JP](#), [Francia T](#), [Tristan A](#), [Vandenesch F](#), [Quentin R](#), [Bertrand X](#). The incidence of *Staphylococcus aureus* ST8-USA300 among French pediatric inpatients is rising. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jan 10.

[Mancini S](#), [Laurent F](#), [Veloso TR](#), [Giddey M](#), [Vouillamoz J](#), [Vandenesch F](#), [Moreillon P](#), [Entenza JM](#). In Vivo Effect of Flucloxacillin in Experimental Endocarditis Caused by *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* Showing Temperature-Dependent Susceptibility In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Apr;59(4):2435-8.

[Valour F](#), [Trouillet-Assant S](#), [Riffard N](#), [Tasse J](#), [Flammier S](#), [Rasigade JP](#), [Chidiac C](#), [Vandenesch F](#), [Ferry T](#), [Laurent F](#). Antimicrobial Activity against Intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Apr;59(4):2029-36.

[Buffière-Morgado A](#), [Demongeot C](#), [Battistella M](#), [Taieb F](#), [Viguiet M](#), [Rybojad M](#), [Tristan A](#), [Bagot M](#), [Petit A](#). [Ecthyma gangrenosum associated with infection involving a methicillin-sensitive, Pantone-Valentine-negative strain of *Staphylococcus aureus*]. *Ann Dermatol Venereol*. 2015 Jan 21.

[Nitzan M](#), [Fechter P](#), [Peer A](#), [Altuvia Y](#), [Bronsky D](#), [Vandenesch F](#), [Romby P](#), [Biham O](#), [Margalit H](#). A defense-offense multi-layered regulatory switch in a pathogenic bacterium. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb 18;43(3):1357-69.

[Deplanche M](#), [Filho RA](#), [Alekseeva L](#), [Ladier E](#), [Jardin J](#), [Henry G](#), [Azevedo V](#), [Miyoshi A](#), [Beraud L](#), [Laurent F](#), [Lina G](#), [Vandenesch F](#), [Steghens JP](#), [Le Loir Y](#), [Otto M](#), [Götz F](#), [Berkova N](#). Phenol-soluble modulins α induce G2/M phase transition delay in eukaryotic HeLa cells. *FASEB J*. 2015 Feb 3.

[Glasner C](#), [Pluister G](#), [Westh H](#), [Arends JP](#), [Empel J](#), [Giles E](#), [Laurent F](#), [Lager F](#), [Marstein L](#), [Matussek A](#), [Mellmann A](#), [Pérez-Vásquez M](#), [Ungvári E](#), [Yan X](#), [Žemličková H](#), [Grundmann H](#), [van Dijk JM](#). *Staphylococcus aureus* spa type t437: identification of the most dominant community-associated clone from Asia across Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Feb;21(2):163.e1-8.

[Valour F](#), [Rasigade JP](#), [Trouillet-Assant S](#), [Gagnaire J](#), [Bouaziz A](#), [Karsenty J](#), [Lacour C](#), [Bes M](#), [Lustig S](#), [Bénet T](#), [Chidiac C](#), [Etienne J](#), [Vandenesch F](#), [Ferry T](#), [Laurent F](#); Lyon BJI Study Group. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Feb 10.

[Chiquet C](#), [Maurin M](#), [Altayrac J](#), [Aptel F](#), [Boisset S](#), [Vandenesch F](#), [Cornut PL](#), [Romanet JP](#), [Gain P](#), [Carricajo A](#). Correlation between clinical data and antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from 68 patients with acute post-cataract endophthalmitis. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Feb 10.

[Viana D](#), [Comos M](#), [McAdam PR](#), [Ward MJ](#), [Selva L](#), [Guinane CM](#), [González-Muñoz BM](#), [Tristan A](#), [Foster SJ](#), [Fitzgerald JR](#), [Penadés JR](#). A single natural nucleotide mutation alters

(ii) *Communications nationales*

Dauwalder O, Charretier Y, Franceschi C, Degout-Charrette E, Zambardi G, Cecchini T, Freydiere AM, Lacoux X, Bes M, Fortin T, Beaulieu C, Perrot N, Dechaume D, Girard V, Salvador A, Tristan A, Theretz A, Chatellier S, Gervasi G, Lemoine J, Durand G, Vandenesch F, Charrier JP. Identification bactérienne, résistance et virulence par spectrométrie de masse electrospray. SFM les 30 Avril et 1^{er} Mars 2014 à l'Institut Pasteur de Paris.

Butin M, Rasigade J-P, Ben Saïd M, Vandenesch F, Claris O, Picaud J-C, Laurent F. Septicémies néonatales à *S. capitis* : multirésistance et alternatives thérapeutiques. Congrès de la Société Française de Pédiatrie (SFP), Lyon, 22-24 mai 2014.

Martins Simoes P, Butin M, Rasigade JP, Meugnier H, Goering R, Angela Kearns, Deighton MA, Denis O, Claris O, Vandenesch F, Picaud JC, Laurent F. *Staphylococcus capitis* NRCS-A : un clone endémo-épidémique mondial du prématuré. SympoStaph, Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme. Lyon, 20-21 octobre 2014.

Wirth T, Stegger M, Vandenesch F, Larsen A, Laurent F. "Out of Africa" ou l'histoire évolutive du clone communautaire européen ST80. SympoStaph, Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme. Lyon, 20-21 octobre 2014.

Marion S, Souche A, Pages L, Commun C, Meugnier H, Bes M, Freney J, Tristan A, Laurent F, Reix P, Bouveyron C, Freydière AM, Vandenesch F, Doléans-Jordheim A. Diversité génétique de souches de *Staphylococcus aureus* isolées chez des patients Lyonnais atteints de mucoviscidose. SympoStaph, Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme. Lyon, 20-21 octobre 2014.

Flammier S, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F. Activité de la PVL et des pore-forming toxins : les ostéoclastes aussi ! SympoStaph, Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme. Lyon, 20-21 octobre 2014.

Bouchiat C, Moreau K, Geissmann T, Bes M, Tristan A, Mosnier A, Vandenesch F. Subtiles différences génétiques entre les souches d'endocardite infectieuse et de bactériémie à *S. aureus*. SympoStaph, Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme. Lyon, 20-21 octobre 2014.

Trouillet-assant S, Gallet M, Nauroy P, Flammier S, Lustig S, Rasigade J-P, Ferry T, Vandenesch F, Jurdic P, Laurent F. Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* - interactions ostéoclastes-*S. aureus*. Congrès SOFCOT, Paris, 8-13 novembre 2014.

Laurent F, Simonin C, Bertucat V, Delouere L, Bouveyron C, Decousser JW, Bes M, Lina G, Tristan A, Vandenesch F, Dumitrescu O. Activité de la ceftaroline sur les souches de SASM et de SARM responsables de bactériémies et de pneumopathies communautaires sévères isolées en France. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Bietrix J, Tasse J, Haenni M, Bes M, Tristan A, Madec JY, Vandenesch F, Laurent F. SARM porteur du gène *mecC* : forte prévalence dans les exploitations de vaches laitières en Meurthe et Moselle. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Trouillet-Assant S, Lelièvre L, Rasigade JP, Flammier S, Tasse J, Valour F, Ferry T, Vandenesch F, Martins-Simoes P, Laurent F. Adaptation *in vivo* de *Staphylococcus aureus* lors d'infections persistantes. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Dauwalder O, Charretier Y, Franceschi C, Degout-Charrette E, Zambardi G, Cecchini T, Bes M, Lemoine J, Durand G, Vandenesch F, Charrier JP. Apport de spectrométrie de masse electrospray pour l'identification bactérienne, la détection de résistances et de facteurs de virulence en moins de 2 heures à partir des colonies ou des hémocultures. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Bouchiat C, Bouveyron C, Dumoulin V, Laurent F, Bes M, Vandenesch F, Tristan A. Evaluation d'un kit commercial pour la détection des gènes codant la PVL dans les prélèvements de pus à *S. aureus*. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Rouzic N, Laurent F, Ramel S, Lasserre C, Le Bihan J, Rault G, Hery-Arnaud G. Risque d'émergence de la résistance au linézolide chez les patients atteints de mucoviscidose (CF)? 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

S. Goutelle S, S. Roux S, M.C. Gagnieu M-C, F. Valour F, S. Lustig S, F. Ader F, Laurent F, Chidiac C, Ferry T. Variabilité pharmacocinétique inter-individuelle et intra-individuelle de la daptomycine au cours du traitement des infections ostéo-articulaires complexes. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Tasse J, Caillon J, Perret A, Bemer P, Dupieux C, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Laurent F. Evaluation bicentrique des performances des tests PBP2a Culture Colony Test™ (Alere) et Slidex® MRSA detection (BioMérieux) pour l'identification rapide des SASM et des SARM. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Meugnier H, Tasse J, Garriga A, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Laurent F. Evaluation of Simplexa™ MRSA (Focus Diagnostics) on a large collection of *mec-A* and *mecC*-positive *S. aureus* representing the major MRSA clones circulating throughout the world. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Flammier S, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F. Infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* : activité cytotoxique directe des toxines staphylococciques sur les ostéoclastes humains. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Flammier S, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Badiou C, Vandenesch F, Laurent F. *Staphylococcus aureus* superantigen TSST-1 activates human osteoclasts and promotes bone resorption. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Bonjean M, Allam C, Nkoud Mongo C, Beghin M, Paris M, Dumont Y, Dumitrescu O, Laurent F, Rasigade JP, Vandenesch F, Lina G. Détection de la résistance à la méticilline chez les staphylocoques par méthode de diffusion EUCAST/CA-SFM 2014 : sensibilité et spécificité de la céfoxitine et du moxalactam sur une cohorte nationale. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

Jeannoel M, Dumitrescu O, Lina G. Étude de l'effet immunomodulateur d'antibiotiques anti-staphylococciques sur une lignée monocyttaire stimulée par des facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014.

(iii) Communications internationales

Butin M, Rasigade J-P, Martins-Simoes P, Claris O, Vandenesch F, Laurent F, Picaud J-C. Multidrug resistance and rapid acquisition of vancomycin resistance in *Staphylococcus capitis* involved in late-onset sepsis in neonates: urgent need for evaluation of alternative therapies. Pediatric Academic Societies Meeting, Vancouver, USA, 3-6 may 2014.

Valour F, Riffard N, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Chidiac C, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F. Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus* : a new therapeutic concept for bone and joint infection ? 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Stegger M, Wirth T, Andersen PS, Skov RL, De Grassi A, Martins-Simoes P, Price LB, Vandenesch F, Larsen AR, Laurent F. Sub-Saharan origin of the European ST80 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage, assessed by whole genome sequencing of a time-based and geographically diverse collection. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Martins-Simoes P, Butin M, Lemriss S, Picaud JC, Kearns A, Denis O, Goering R, Vandenesch F, Rasigade JP, Laurent F. *Staphylococcus capitis* in nosocomial bacteraemia in intensive care neonates : worldwide distribution of an endemic methicillin-resistant clone (NRCS-A). 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Trouillet-Assant S, Gallet M, Nauroy P, Rasigade JP, Flammier S, Parroche P, Marvel J, Vandenesch F, Jurdic P, Laurent F. Dual role of live intracellular *Staphylococcus aureus* on osteoclast lineage leading to increased bone resorption. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Dupieux C, Sapin A, Trouillet-Assant S, Lina G, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F, Rasigade JP. Phagosomal escape of hypervirulent *Staphylococcus aureus* is not dependent on betatoxin expression. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Saadatian-Elahi M, Tristan A, Gillet Y, Bes M, Bouchiat C, Dumitrescu O, Picard C, Argaud L, Vandenesch F. Community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* in France : interim results of a prospective cohort study. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Pages L, Commun C, Bardel C, De Montclos M, Reix P, Durieux I, Vandenesch F, Freney J, Cournoyer B, Doléans-Jordheim A. Description of pulmonary bacterial floras associated with the presence of two pathogens, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, in patients with cystic fibrosis. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Roch M, Clair P, Renzoni A, Bes M, Matra A, Freydiere AM, Laurent F, Reix P, Dumitrescu O, Vandenesch F. Beta-Lactam antibiotics can induce vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Ranc AG, Laurent F, Bes M, Freydiere AM, Lina G, Vandenesch F, Tristan A. Human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage : a study based on culture and mass spectrometry. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Martin E, Michel A, Badiou C, Bes M, Laurent F, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 resists protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Mairpady Shambat S, Hagggar A, Vandenesch F, Lina G, Van Wamel W, Arakere G, Svensson M, Norrby-Teglund A. Community-associated *Staphylococcus aureus* isolates display distinct phenotypic profiles : link to *agr* type alpha-toxin levels. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelone, 10-13 mai 2014.

Bourdeau S, Imbert PRC, Hernandez D, Martins-Simões P, Campergue JB, Jeannoel M, Meunier H, Tristan A, Dumitrescu O, Laurent F, Bes M, Vogel V, Schrenzel J, Vandenesch F, Salcedo S, Francois P, Lina G. New SCC*mec* element encoding TIR in ST5 MRSA Géraldine clone linking resistance and virulence genetic determinants. 16th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Chicago, 26-29 Août 2014.

Mairpady Shambat S, Chen P, Hoang ATN, Vandenesch F, Lina G, Monk IR, Foster TJ, Arakere G, Svensson M, Norrby-Teglund A. Toxin mediated pathology in a model of *S. aureus* necrotizing pneumonia using human 3D organotypic lung tissue. 16th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Chicago, 26-29 Août 2014.

Diep BA, Badiou C, Le HN, Duong AH, Castro Dip E, Le VT, Basuino L, Marbach H, MaiTT, Sarda NN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Sellman BR, Chambers HF, Lina G. Mechanisms of action of human IVIG for treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. 16th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections. Chicago, 26-29 Août 2014.

Butin M, Rasigade JP, Vandenesch F, Claris O, Picaud JC, Laurent F. Retrospective evaluation of linezolid and vancomycin therapy in intensive care neonates with staphylococcal late-onset sepsis. European Academy of Pediatric Societies. Barcelone, 17 - 21 October 2014.

Butin M, Martins Simões P, Lemriss H, Lemriss S, Vandenesch F, Claris O, Picaud JC, Rasigade JP, Laurent F. *Staphylococcus capitis* in neonatal late-onset sepsis: unexpected worldwide dissemination of an endemic multi-resistant clone. European Academy of Pediatric Societies. Barcelone, 17 - 21 October 2014.

Roux S, Valour F, Karsenty J, Gagneux M-C, Perpoint T, Lustig S, Martha B, Laurent F, Chidiac C, Ferry T. Daptomycin >6mg/kg/d in patients with complex bone and joint infection: prospective cohort study in a referral center. 54th ICAAC, Washington, USA, 5-9 septembre 2014.

Goutelle S, Roux S, Gagnieu MC, Valour F, Lustig S, Ader F, Laurent F, Chidiac C, Ferry T, Lyon BJI Study group. Daptomycin Pharmacokinetics During Prolonged Therapy: Interindividual And Intraindividual Variability. 54th ICAAC, Washington, USA, 5-9 septembre 2014.

(iv) Conférences sur invitations

Lina G. Panton-Valentine leukocidine: an underestimated virulence factor produced by *Staphylococcus aureus*. 4^{ème} Journée Recherche du Campus Santé Rennes, Janvier 2014, Rennes.

Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia epidemiology and pathogenesis. 14th International Symposium on Current Topics in Infectious Diseases. Grindelwald, Switzerland, January 26 to 31, 2014

Lina G. Impact of vaginal microbiote on the development of menstrual toxic shock syndrome. 2^{ème} journée Ecofect, Février 2014, Lyon.

Lina G. Les bactéries à Gram positives multirésistantes : probabilités de résistance ? que craindre ? Académie de Médecine, Mars 2014, Paris.

Lina G. Comparaison CA-SFM / EUCAST : des exemples chez les bactéries à Gram positif. 10^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Mars 2014, Paris.

Laurent F. Interactions *Staphylococcus aureus*-Osteoblasts-Osteoclasts. Annual Oxford Bone Infection Conference, Avril 2014, Oxford

Vandenesch F. Facteurs de virulence du staphylocoque: Nouveaux paradigmes. Journées Nationales d'Infectiologie. Bordeaux, 11-13 juin 2104.

Vandenesch F. CA-MRSA emergence, virulence and spread : input of genomic. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Tristan A. DNA microarrays: principles and tools for data analysis. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Laurent F. SLST, MLST, MLVA, DNA microarrays: principles and tools for data analysis. ESCMID Postgraduate Education Course - Molecular Typing Methods for Pathogens, 30 June-4 July 2014, Lyon

Vandenesch F. Spicilège of the 2014 Chicago ISSSSI. SympoStaph, Lyon, 20-21 octobre 2014.

Martins Simoes P. *Staphylococcus capitis* in nosocomial bacteraemia in intensive care neonates: worldwide distribution of an endemic methicillin-resistant clone (NRCS-A). SymptoStaph 2014, Lyon, 20 Octobre 2014

Rasigade JP. Staphylocoques : Toxines & Co. en 2014. Sympostaph, 2014, Lyon, 20 octobre 2014

Laurent F. WGS and *Staphylococcus aureus* : Investigation of epidemiology and evolution Journée de la section des agents antimicrobiens – Société Française de microbiologie, Paris, 26 Novembre 2014

Lina G. CA-SFM EUCAST : détection de la résistance aux glycopeptides. 34ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Novembre 2014, Paris.

Vandenesch F. CA-MRSA emergence, virulence and spread: Europe vs USA. Hospital Infection Society Congress. Lyon, 16-18 Novembre 2014.

Vandenesch F. Vaccination anti-staphylococcique. Colloque de la Coordination Vaccinale du CHU de Lyon. Lyon, 25 novembre 2014

Vandenesch F. Approche Génomique de la Virulence chez *S. aureus*. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Vandenesch F. Actualités du CNR des Staphylocoques. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Hodille E. Symposium « effets non antibiotiques des antibiotiques » : « Effets des antibiotiques et peptides antimicrobiens sur la virulence de *S. aureus* » Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-Infectieuse. Paris, 27-28 Novembre 2014.

Lina G. Panton-Valentine leukocidine: an underestimated virulence factor produced by *Staphylococcus aureus* ? Colloque d'infectiologie de l'hôpital Cantonale, Novembre 2014, Genève, Suisse.

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène 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
- Si les collaborations entre le CNR et le LNR ne sont pas effectives, préciser les perspectives et/ou conditions de renforcement des liens

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.

Etude StaphNAC

Au cours de l'année 2014, le CNR en lien avec la Clinique Vétérinaire de l'Arche à Valence a mis en place une étude de prévalence et de caractérisation moléculaire des souches de SARM et SASM chez les nouveaux animaux de compagnie (NAC) qui incluent notamment les oiseaux, les rongeurs, les poissons, les reptiles, les amphibiens, les insectes, les araignées, voire des porcs, ou des fennecs. En effet si le portage de *S. aureus* a été relativement bien étudié chez les chats et les chiens, les données concernant les animaux de compagnie moins classiques sont peu nombreux. Hors les évolutions récentes de l'épidémiologie par exemple des SARM dans le nord de l'Europe ont démontré que des groupes d'animaux qui n'avaient pas été identifiés comme des réservoirs potentiels pouvaient avoir un impact majeur dans l'émergence, la diffusion et la transmission à l'Homme de souches de *S. aureus* résistantes ou virulentes. A ce jour, 37 animaux ont été prélevés. Quatre infections à *S. aureus* (SARM, n=1, CC8 Clone Lyon chez une tortue ; SASM, n=3, CC101 chez une buse, CC5 chez un chinchilla, CC97 chez un perroquet). Ce protocole se poursuivra sur l'ensemble de 2015 afin de constituer un large échantillonnage représentatif.

EquiSARM : Etude des infections à SARM en France chez les chevaux (en collaboration avec l'ANSES Lyon et le réseau ResaPath)

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

Après des études conduites chez les animaux de compagnie (chien et chat), dans les élevages porcins, et chez les bovins (mammites) les travaux du CNR sur le versant animal en collaboration avec l'ANSES ont porté en 2014 sur l'étude rétrospective des infections à *S. aureus* chez les chevaux.

Chez le cheval, *S. aureus* est responsable d'infections cutanées, d'arthrites, d'ostéomyélites, de septicémies et d'omphaloplébites chez les poulains. Il est également une cause majeure d'infection post-opératoire dans les cliniques vétérinaires équinnes. Si les b-lactamines constituent le traitement de choix des infections staphylococciques, le développement des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) et à toutes les b-lactamines pose un problème majeur en santé humaine et animale en réduisant et compliquant les choix thérapeutiques. Chez le cheval, les colonisations et infections à SARM ont été rapportées depuis les années 1990 et un portage nasal et digestif est observé dans cette espèce avec une fréquence variant de 0 à 14.3% des chevaux probablement en raison de la pression de sélection des traitements antibiotiques (Weese et al., 2012). La communauté génétique des souches de SARM isolées chez l'Homme et le cheval ainsi que les contacts étroits et privilégiés entre chevaux, personnels des haras ou centres équestres, et cavaliers fait craindre de possibles transferts de souches mais aussi échanges génétiques réciproques de facteurs de virulence et/ou colonisation entre clones équins et clones humains. Ces éléments soulignent l'importance de suivre l'expansion de ces souches dans la population équine et chez les personnes évoluant au contact des chevaux, d'autant que des cas de transmission cheval/homme ont déjà été identifiés en milieu hospitalier vétérinaire (Weese et al., 2008).

L'objectif de l'étude rétrospective conduite était de déterminer la prévalence des infections à SARM chez les chevaux en France et de caractériser au niveau moléculaire les souches isolées pour les comparer aux données des autres pays. Entre janvier 2011 et janvier 2014, 630 souches équinnes de Staphylocoques à coagulase positive ont été isolées dans les laboratoires du réseau ResaPath dont 43 souches de SARM soit près de 7% des souches, dont 41 portant le gène *mecA* et 2 le gène *mecC*. Les souches appartenant au complexe clonal CC398 était le plus prévalent et représentaient 65.1% de l'ensemble des souches, alors que le clone USA500 était détecté pour 23.3% des SARM. Au sein du CC398; la plupart des souches appartenait à un spa-type équin spécifique rapporté dans la littérature mais qui portait de façon surprenante dans près de 18% des cas un cluster d'évasion immunitaire (IEC) spécifique des souches adaptées à l'Homme. Les deux souches présentant le gène *mecC* appartenaient pour l'une au complexe clonal CC130 bien connu chez les bovins pour abriter ce gène et au sequence type (ST) 49 décrit récemment en Belgique chez l'Homme uniquement.

Nos résultats confirment que les SARM sont présents et responsables d'infections chez les équidés français. Cette prévalence préoccupante est principalement liée à la diffusion du clone CC398 décrits dans de nombreux pays. On note par ailleurs chez ces SARM la présence fréquente des gènes de l'IEC classiquement décrit comme un signe d'"humanisation des souches" témoignant généralement d'échanges génétiques entre souches humaines et animales qui s'expliquent probablement par des épisodes de co-colonisation chez l'Homme et/ou le cheval. L'étude conduite a aussi permis pour la première fois de détecter chez le cheval des souches porteuses du gène *mecC*, ce qui témoigne de la diversité des animaux touchés et de la diffusion de ce mécanisme de résistance. Les données d'infection avec des chiffres élevés pose la question du niveau de colonisation des équidés qui pourraient i) être plus important encore, ii) être lié à d'autres clones moins virulents ou avirulents chez le cheval, comme cela est le cas pour les SARM CC398 chez le porc. Des travaux en ce sens seront conduits en 2015 dans le cadre du Projet BIOREQUI (voir la section "Activités programmées des années N+1 et N+2").

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 2015 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 créé en 2017 l'Institut des Agents Infectieux qui

regroupera l'ensemble des activités de bactériologie, virologie, parasitologie-mycologie des Hospices Civils de Lyon ainsi que les CNR des staphylocoques, des légionnelles, de la grippe et des entérovirus.

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

- 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 :

- 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. Un autre objectif sera d'évaluer l'efficacité de la décontamination et d'évaluer le risque de récurrence.

- **Epidémiologie des infections à *S. aureus* dans les services de néonatalogie** de la région Rhône-Alpes. L'objectif est de mieux identifier les patients à risque et les clones de *S. aureus* impliqué ainsi que la résistance des souches à la mupirocine.

- **Epidémiologie de *S. aureus* chez les animaux**

Afin de prolonger les travaux rétrospectifs conduits sur les infections à *S. aureus* chez les équidés en collaboration avec l'ANSES, le CNR participera en 2015 à une vaste étude sur la résistance des agents infectieux. Les travaux réalisées dans le cadre du projet BIOREQUI sous l'égide de l'IFCE (Institut Français du cheval et de l'équitation) et des haras nationaux permettront de déterminer simultanément et sur un panel de plus de 1200 chevaux, répartis dans 40 centres équestres et haras nationaux, la prévalence de la résistance i) des strongles aux trois grandes classes d'antihelminthiques, ii) des souches d'*E.coli* multi-résistantes et/ou

produisant des bêta-lactamases (BLSE, AmpC et carbapénémases), iii) des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM).

- **Etude « Moran-like »** : prévalence des SARM communautaires dans les infections de la peau et des tissus mous parmi les patients se présentant aux services des urgences : une étude pilote prospective multicentrique européenne. Les SSTIs représentent l'une des causes les plus fréquentes de consultation des services des urgences des établissements de santé. Les formes peu sévères sont traitées par antibiothérapie orale ou locale. Les formes les plus graves sont principalement causées par des streptocoques du groupe A ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et peuvent nécessiter une hospitalisation. Le *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) communautaire est l'un des principaux pathogènes des SSTIs aux USA. Par rapport aux SARM d'origine hospitalière, les SARM communautaires présentent en général moins de résistance aux antibiotiques et ont un profil toxique différent [Naimi 2003].

Des études réalisées aux Etats Unis ont montré que la forte prévalence d'infection à SARM des SSTIs est plutôt liée au clone USA300 [Moran 2006 ; Roi 2006]. En Europe, différents taux de SARM ont été rapportés allant de 0,9 % aux Pays-Bas [Mithoe 2012], à 14,5 % en France [Lamy 2011] et 30,7 % en Grèce [Vourli 2009]. Quelle que soit la sensibilité des souches isolées (SASM ou SARM), il semble qu'une grande proportion des souches de *S. aureus* des SSTIs produisent la toxine leucocidine de Panton-Valentine (PVL) [Lamy 2011; Sjolund 2008]. Ceci est particulièrement vrai pour les lésions folliculaires (primitives) comme les folliculites et les furoncles [Del Giudice 2011]. Cependant, les données de la littérature sur la prévalence des SARM communautaires et plus généralement la prévalence de la PVL ainsi que le ou les clones majoritaires responsables des SSTIs sont limitées en Europe.

La mise en place d'une étude prospective multicentrique dans plusieurs pays européens permettrait d'avoir une meilleure compréhension de la prévalence des SASM, des SARM et de la PVL dans la survenue des SSTIs et de la divergence ou convergence de ces souches à travers l'Europe. Toutefois, les politiques locales en ce qui concerne la prise en charge des SSTIs et les analyses microbiologiques peuvent varier entre pays.

Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle étude, une étude pilote basée sur 6 centres dans 6 pays européens (Grèce, France, Norvège, Angleterre, Espagne, Hollande) est actuellement en cours. Les principaux objectifs de cette étude pilote sont d'évaluer l'hétérogénéité à travers les pays participants et de recueillir des informations permettant de déterminer la prévalence de *S. aureus* et la contribution relative des souches de SASM, de SARM et de la PVL parmi tous les échantillons de SSTIs recueillis au cours de l'étude dans chaque centre. Les résultats de cette étude permettront également d'identifier les facteurs qui doivent être harmonisés ou pris en considération pour la mise en place d'une étude prospective plus vaste impliquant plusieurs pays européens et disposant de plusieurs centres par pays pour couvrir des zones géographiques différentes dans chaque pays.

En matière de surveillance de la résistance, le CNR a pour projet 2015 :

Comme nous l'avons indiqué dans la partie « Surveillance de la résistance » de ce rapport, la prévalence précise des souches de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistantes au linézolide en France reste à ce jour inconnue alors même que plusieurs phénomènes d'épidémie locale, de diffusion géographique large voire même d'endémie sont suggérés par les données recueillies par le CNR.

Il est intéressant de noter que les 4 souches brestoises de *S. aureus* ont fait l'objet d'un envoi au CNR en raison d'interactions spécifiques entre le CNR et le CHU de Brest sans lien direct avec des problématiques de résistances. De même certaines séries de souches de staphylocoques à coagulase négative résistantes au linézolide étudiées et rapportées dans ce rapport ont été adressées au CNR après demande spécifique de celui-ci après qu'une

souche ait été envoyée et identifiée. Il est donc probable que le nombre de souches résistantes au linézolide soit sous-estimé en France, que ces souches résistantes au linézolide soient sous-déclarées et peu envoyées au CNR. Par ailleurs, cette sous-estimation est probablement renforcée par le fait qu'un certain nombre de systèmes automatisés commerciaux et qu'un certain nombre de laboratoires utilisant la technique de diffusion en milieu solide n'incluent pas le linézolide dans leur panel. Dans ce contexte, il apparaît important qu'une étude soit lancée au niveau national afin d'évaluer le niveau de résistance des souches de staphylocoques à cette famille d'antibiotiques qui constitue une alternative majeure en cas de multirésistance chez les staphylocoques. Cette nécessité est renforcée par le fait que des génériques du linézolide devraient être bientôt être disponibles ce qui pourrait conduire à une augmentation du nombre de prescriptions en raison de la baisse du prix du médicament et donc conduire à une augmentation de la pression de sélection favorisant l'émergence et la diffusion des souches et clones résistants.

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 :

- 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 (cf chapitre 3.4).
- **Développement d'une technique d'identification rapide du clone *S. capitis* NRCS-A par PCR spécifique**

Dans le but de pouvoir définir rapidement l'appartenance ou non d'une souche de *S. capitis* au clone mondial endémique NRCS-A, nous avons travaillé sur la mise au point d'une PCR spécifique du clone.

Dans un premier temps, la comparaison de génomes complets de *S. capitis* NRCS-A (séquencés en collaboration avec une équipe Marocaine) avec des génomes de *S. capitis* n'appartenant pas au clone (génomes publics disponibles), a permis de trouver une trentaine de gènes spécifiques du clone NRCS-A. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés au gène de la nisine, qui est un peptide antimicrobien, habituellement présent chez les bactéries à Gram négatif, et ciblant les bactéries à Gram positif. Sa présence dans le génome de NRCS-A est donc atypique et pourrait constituer un élément de diagnostic rapide, sensible et spécifique du clone. Nous avons dessiné des amorces et mis au point une PCR ciblant ce gène chez *S. capitis*. La prochaine étape est de tester cette PCR sur un grand panel de souches isolées chez des nouveau-nés mais également des adultes, et de définir la sensibilité et spécificité de ce test comme diagnostic rapide d'appartenance au clone NRCS-A.

Si cette technique ne s'avérait pas probante, une PCR multiplex ciblant cette fois-ci la cassette *SCCmec* devrait constituer une alternative intéressante pour caractériser le clone NRCS-A. En effet des travaux préalables au sein du CNR des staphylocoques ont permis de caractériser la cassette *SCCmec* du clone NRCS-A et de mettre en évidence que cette cassette était atypique puisqu'elle porte deux gènes de recombinaison (*ccrC* et le gène *ccrA1B3*). La combinaison de ces 2 PCR ciblant ces différents *ccr* devrait permettre d'identifier spécifiquement le clone.

- **Recherche de portage de *S. capitis* chez les patients et/ou soignants, ainsi que dans l'environnement immédiat du nouveau-né et recherche de *S. capitis* dans la flore vaginale des femmes enceintes**

Si la diffusion du clone est maintenant attestée, sa source et son réservoir ainsi que les

raisons de sa persistance au sein d'un service sont pour le moment inexplorés et posent questions.

Notre but est donc de rechercher le clone *S. capitis* NRCS-A dans l'environnement immédiat du nouveau-né en réanimation néonatale. Pour cela des prélèvements vont être réalisés au sein d'un service de réanimation néonatale (hôpital de la Croix Rousse, Lyon) à la fois sur les surfaces inertes entourant le nouveau-né (couveuse, scope, respirateur...) mais également chez les soignants (portage manuel), et les nouveau-nés eux-mêmes (recherche d'une colonisation cutanée).

En parallèle, nous avons débuté une recherche de portage vaginal de *S. capitis* chez les femmes enceintes, qui pourraient éventuellement constituer un réservoir comme cela existe pour le Streptocoque du groupe B.

- **Evaluation du niveau de résistance aux antiseptiques chez les souches cliniques de *S. capitis***

Des variations épidémiologiques des infections à *S. capitis* ont été décrites au sein de certains services de réanimation néonatale. En particulier l'expérience d'un autre CH de la région Rhône Alpes a décrit la disparition des bactériémies à *S. capitis* lors d'un changement d'antiseptiques au sein du service (utilisation du Dakin® au lieu de la Biseptine®) et la réapparition de *S. capitis* après reprise du protocole antérieur (Biseptine®). Nous souhaitons mettre au point une technique d'évaluation de la résistance aux antiseptiques ciblant les molécules habituellement utilisées en réanimation néonatale (ammonium quaternaires et chlorhexidine) afin de rechercher une résistance à ces antiseptiques chez le clone NRCS-A. De plus, la comparaison des pratiques de désinfection cutanée (par le biais de la fiche de recueil envoyée aux différents services de réanimation néonatale de France) entre les hôpitaux avec/sans bactériémies néonatales à *S. capitis* (voir étude de prévalence ci-dessus), pourrait appuyer l'hypothèse d'une résistance aux antiseptiques chez NRCS-A, pouvant alors expliquer la prévalence élevée de ces infections chez les nouveau-nés. Si cette hypothèse est confirmée, elle pourrait aboutir à une modification des pratiques cliniques au sein des services de réanimation néonatale (protocole de désinfection adapté au profil de résistance de la bactérie).

- **Fond Unique Interministériel (FUI) "Smartbandage"**

En France, le Fonds unique interministériel (ou FUI) est un programme destiné à soutenir la recherche appliquée, pour aider au développement de nouveaux produits et services susceptibles d'être mis sur le marché à court ou moyen terme. Il permet de financer les projets de R&D collaboratifs (grandes entreprises, PME, laboratoires) des pôles de compétitivité.

Le projet Smart Bandage, labellisé par deux pôles de compétitivité Techtera (pôle de compétitivité des textiles techniques et textiles fonctionnels en Rhône-Alpes) et Lyonbiopôle (pôle de compétitivité dédiée aux maladies infectieuses et au secteur des Sciences de la Vie (cancer, nutrition, métabolisme, pathologies du système nerveux) a pour objectif de développer un pansement permettant une réponse diagnostic intégrant l'identification du microorganisme et sa résistance à un antibiotique. Concrètement, ce projet de recherche vise à concevoir un biocapteur simple et peu coûteux intégré dans un pansement au sein duquel serait révélée la présence de staphylocoques dorés sensibles ou résistants à la méticilline potentiellement impliqués dans un processus pathogène. Ces pansements "intelligents" seraient destinés au monde hospitalier et participerait au diagnostic précoce et à la lutte contre les infections nosocomiales à *S. aureus*, au grand public et aux animaux de compagnie. Ce programme innovant est porté par le groupe BioMérieux, acteur majeur dans le domaine du diagnostic, qui travaille sur ce projet avec des partenaires aux compétences complémentaires: Bluestar Silicone, Fibroline, Montdor, l'Université Claude Bernard Lyon 1,

les Hospices Civils de Lyon et le Centre International de Recherche en Infectiologie et le Centre National de Référence des Staphylocoques. Le projet a été lancé le 1^{er} Janvier 2015. Le CNR, le CIRI et les HCL sont impliqués dans le développement d'un exsudat artificiel et d'un modèle ex vivo de plaie cutanée à staphylocoque doré. Le CNR apportera son expertise, son savoir faire et l'accès à des collections de souches parfaitement caractérisées.

- **Fond Unique Interministériel (FUI) "PHOSA"**

Le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des infections staphylococciques constitue un enjeu majeur de santé publique dans un contexte d'augmentation de l'antibiorésistance et de réduction du nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché ou à venir. Le projet PHOSA a pour objectif la mise au point d'un cocktail de bactériophages lytiques efficaces contre les infections ostéo-articulaires avec ou sans biofilm provoquées par les staphylocoques (*Staphylococcus aureus* et staphylocoques blancs), notamment contre les souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques. Les partenaires sont les sociétés Pherecydes, Biofilm Control, Vivexia, les hospices Civils de Lyon, le Centre international de Recherche en Infectiologie (CIRI) et le CNR des staphylocoques. À l'issue du projet, l'objectif ultime est l'obtention des autorisations réglementaires pour le lancement d'un essai clinique pour ce cocktail. Le Projet PHOSA est organisé en 3 étapes : mise au point du cocktail de phages, évaluation préclinique in vitro (sur bactérie et biofilm) et in vivo (modèle animaux d'infections ostéo-articulaires), préparation de l'essai clinique chez l'Homme. Le CNR apportera là encore son aide au développement de ce projet innovant via son expertise, son savoir faire et l'accès à des collections de souches parfaitement caractérisées. Le projet a été lancé le 19 Décembre 2014.

Annexe 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 :

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

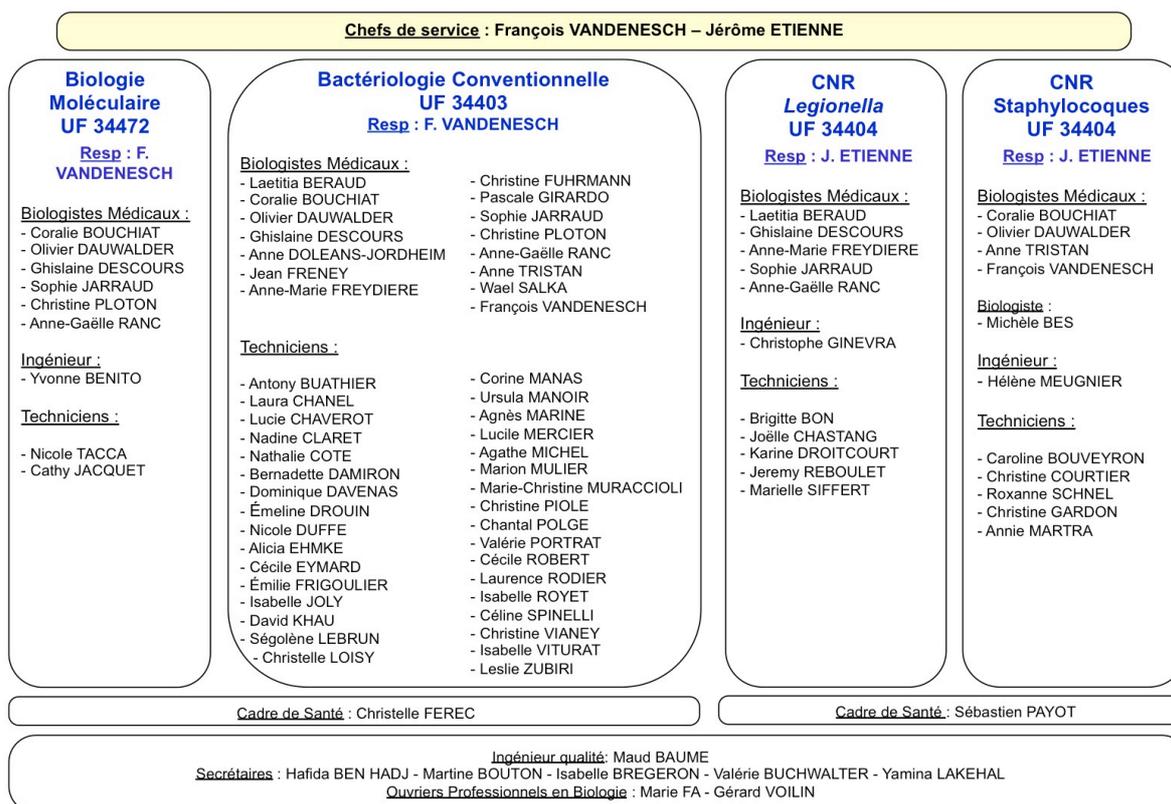
Les personnels affectés à l'activité du CNR pour tout ou partie de leur temps de travail sont les suivants :

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

Hélène Meugnier Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 80 E-mail : helene.meugnier@chu-lyon.fr
Mitra Saadatian-Elahi Epidémiologiste - Centre de Biologie Est	Tél : 04 27 85 51 48 E-mail : mitra.elahi@chu-lyon.fr
Florence Couzon Ingénieur – U1111, Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 78 77 86 57 E-mail : florence.couzon@univ-lyon1.fr
Cédric Badiou Ingénieur – U1111, Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 78 77 86 57 E-mail : cedric.badiou@univ-lyon1.fr
Cadre Sébastien Payot Techniciennes Caroline Bouveyron Christine Courtier Christine Gardon Annie Martra Roxane Schnel	

o Organigramme

ORGANIGRAMME DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE (CR : 31471 – Resp : B. LINA)



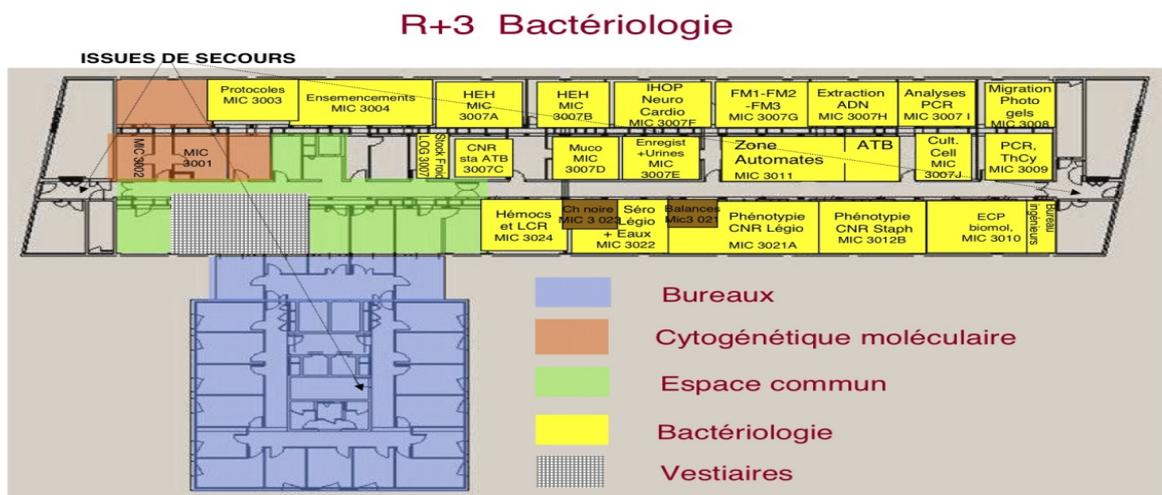
1.3 Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés) en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements.

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^{ème} étage. Au 3^{ème} 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^E), 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.



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,...

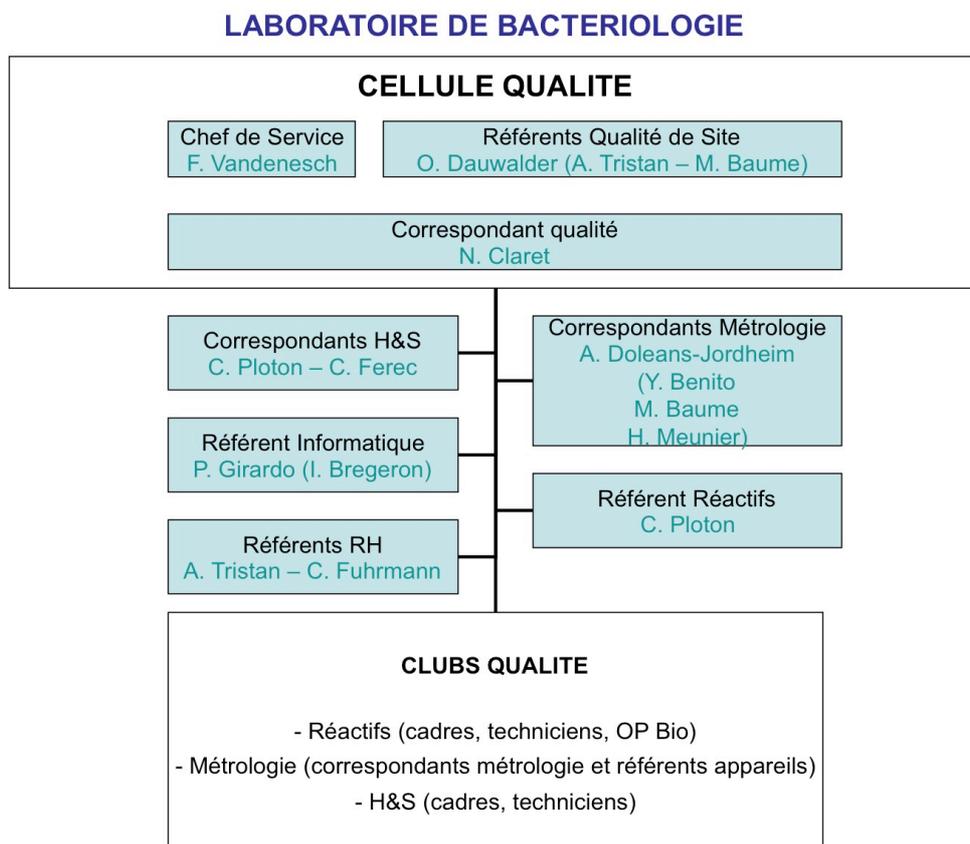
1.4.1 L'enjeu de l'accréditation

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 légionelles, 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 légionelles. 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 15189.

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).

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 qui est une analyse d'urgence permettant une amélioration rapide de la prise en charge des patients avec la mise en place de mesures thérapeutiques adaptées et une gestion plus rapide des situations de cas groupés. L'année suivante, la technique de puces à ADN sera présentée à l'accréditation.

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 en 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®
- Formation en 2015 de deux biologistes du CNR à l'audit

1.4.5 Contrôles de qualité

Le CNR participe à plusieurs 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 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: *mecA*, *mecC*, *nuc*, 16S staphylocoque, *mupA*, *cfr* (linézolide), *lukS*-PV et *lukF*-PV (PVL), *tst* (TSST-1), *eta*, *etb*, *etd*, *arcA*, *seh*, *aphA3*, *aadC*, *aacA-aphD*, *ermA*, *ermC*, *msrA* *evatB*, *tetK*, *tetM* ; PCR pour la détermination du type SCC*mec*, *spa* typing

1.4.5.3 CQE Européen de l'ESGS

Au cours du 24^e congrès de l'ESCMID à Barcelone en mai 2014, le groupe ESGS (ESCMID Study Group on Staphylococci) dirigé par le Professeur François Vandenesch a décidé d'organiser un **contrôle de qualité externe (CQE)** destiné principalement aux Centres Nationaux de Référence caractérisant un grand nombre de souches de *Staphylococcus aureus*.

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

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

Le panel de base incluant l'identification, la détermination des CMI de l'oxacilline, de la céfoxitine et de la mupirocine, la détection des gènes de résistance (*mecA*, *mecC* et *mupA*), des gènes codant les toxines (PVL, TSST, ETA, ETB et entérotoxines A, B, C, D et E) et le typage par une méthode génotypique (*spa*-typing, MLST, ...)

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

Onze laboratoires incluant 9 pays européens ont participé à ce premier CQE organisé par le laboratoire de référence de Belgique (Bruxelles – Pr Olivier Denis) : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n =1), France (n=1), Allemagne (n= 2), Grèce (n=1), Pologne (n=1), Portugal (n= 1) et Pays-Bas (n=1).

Les résultats de ce premier CQE sont en cours d'analyse.

Notre CNR des Staphylocoques organisera le prochain CQE en 2015

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 : 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 diagnostique de base pour toute souche arrivant au CNR⁶.

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 coagulase 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 SM⁷.

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 CNR⁸. 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 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

⁶ 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.

⁷ 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

⁸ 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

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*, *saeR/S*, *vraR/S*, *sarA*). 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 utilise une extraction rapide manuelle et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *lukSF-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 (Lg).

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 Pantone-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 β » 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 β 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)⁹. Le CNR a établi une correspondance entre les superantigènes et leurs principaux répertoires V β cibles introduisant la notion de « signature V β »¹⁰.

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 β » 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 β 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 certitude 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 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 emboîtée¹¹ développée par le CNR. La divergence des allèles *agr* est un événement évolutif ancien qui permet de

⁹ 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.

¹⁰ Thomas D et al. *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. *Infect Immun*, 2009. 77(5): p. 2043-50.

¹¹ 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.

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 *mecA*) pour toutes les souches lors de leur arrivée au CNR.

Caractérisation de la Cassette SCC*mec*

L'élément génétique mobile portant le gène *mecA* est appelé cassette SCC*mec* ou « *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* ». Il existe plusieurs types de cassette dont la structure et la taille varient. Elles sont toutes formées de deux éléments essentiels: le complexe *mec* et les gènes codant les recombinases. Le complexe *mec* est composé du gène *mecA*, des éléments de régulation *mecl* 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* » (<http://www.spaserver.ridom.de/>). L'utilisation d'un tel outil permet de collecter et d'harmoniser l'ensemble des données. De plus, les séquences saisies sont automatiquement contrôlées permettant un haut niveau de qualité. Cette technique génère alors des « types *spa* » (par exemple t004), que le logiciel regroupera au sein de « *spa-CC* » ou complexes clonaux « *spa* », contenant des « types *spa* » proches. Cette technique apparaît comme plus discriminante que la MLST et de réalisation plus facile 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 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*) (<http://www.mlst.net>) 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 reliés entre eux et peuvent être alors regroupés au sein d'une même unité : le complexe clonal (CC). Chaque CC est désigné par le numéro du ST considéré comme l'ancêtre à l'aide du logiciel eBURST® permettant de définir des familles. Cette technique, appliquée à partir de 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 pénicilline.

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-hsdS1* des souches de ce CC décrite par nos collègues danois¹². 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 *mecA* 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-cerveille 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 6.10⁸ UFC/mL (2McFarland), incubation à 35-37°C et lecture à 24 et 48 heures à la recherche de La présence d'au moins 4 colonies permettant de suspecter très fortement le caractère hétéro-VISA. La confirmation définitive se fait par la technique de référence d'analyse de population¹³. 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-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

¹² 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

¹³ 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.

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

Détection du gène *vanA/B* par PCR

Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une dizaine de souches de *S. aureus* à travers le monde mais son apparition et sa dissémination en France constituent une source d'inquiétude majeure. Le CNR dans le cadre de son rôle d'alerte dispose donc des outils de PCR spécifiques permettant la détection des gènes *vanA*, *vanB* et *vanC*. 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 *vanA*, *vanB*, et *vanZ*.

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 (*msrA*) et enzymes (*linA*) conférant la résistance aux macrolides, les enzymes altérant les aminosides, mais aussi les gènes *mup* (résistance à la mupirocine) ou *qac* (résistance aux ammoniums quaternaires), les résistances aux glycopeptides des entérocoques de type *van* (*vanA*, *vanB*, *vanZ*, potentiellement transférables chez *S. aureus* comme cela a été décrit sporadiquement) sont notamment inclus. Au total, la caractérisation moléculaire de la cassette *SCCmec* est aussi possible grâce à cet outil.

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

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 23S¹⁴ 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 adressés, 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 CMI 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 collaboration avec nos collègues danois, une technique 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*, *pvl*) avec révélation des amplicons en gel d'agarose.

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 *SSCmec*, 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
- 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.

¹⁴ 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.

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 réglementaire 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 réglementaires pour l'acquisition, la détention et la mise en œuvre permanente pour cette toxine.

Dans les cadres réglementaires 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 francois.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 laurent.argaud@chu-lyon.fr
Pédiatrie : Dr. Y. Gillet yves.gillet@chu-lyon.fr
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

Titre de l'étude	Leucocidine de Panton Valentine : Facteur indépendant de gravité des pneumonies à <i>Staphylococcus aureus</i> .
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 <i>S. aureus</i> - Etude immunogénétique parmi les patients présentant une pneumonie à <i>S. aureus</i> producteur de PVL et les membres de leur famille
Objectifs	- Confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité indépendant des pneumonies à <i>S. aureus</i> . - Rechercher une éventuelle prédisposition génétique rendant certains patients susceptibles aux pneumonies nécrosantes à <i>S. aureus</i> producteur de PVL.

Taille de l'échantillon Etude épidémiologique	- 97 patients avec une pneumonie à <i>S. aureus</i> producteur de PVL (PVL+) et 97 patients PVL-
Etude immunogénétique	- Tous les patients PVL+ et 130 membres de leur famille
Critères d'inclusion Etude épidémiologique Etude immunogénétique	- Consentement éclairé - Sujets affiliés (ou bénéficiaire) à un régime de sécurité sociale. - Présence de signes cliniques, biologiques et radiologiques de pneumopathie à <i>S. aureus</i> dont l'état clinique justifie une hospitalisation dans une unité de réanimation ou de surveillance continue - Présence de <i>S. aureus</i> 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 entraînant 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 Staphylocoques 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 hospitalisation en réanimation. Les caractéristiques cliniques associées étaient 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 reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRS ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.

- Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.

- Le Demandeur s'engage à utiliser le MATERIEL selon les lois et réglementations en cours.

- Le MATERIEL est accessible gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition)

Le Demandeur et le 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 de 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 de la personne :

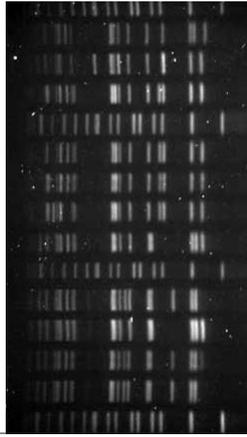
Organisation :

Adresse :

Signature

Date

Annexe 5 ESCMID Postgraduate Education Course Molecular Typing Methods for Pathogens organisé à LYON en 2014



Target Audience
15 – 20 young microbiologists with basic knowledge in bacteriology and virology who want to get an updated overview of the theoretical and practical use of molecular typing methods and epidemiological markers for pathogens.

Confirmed Faculty Members

- David Aarnesen, London, United Kingdom
- Michèle Bes, Lyon, France
- Maude Bouscambert, Lyon, France
- Sylvain Brisse, Paris, France
- Alex Friedrich, Groningen, The Netherlands
- Valeria Gial, Bellinzona, Switzerland
- Christophe Grievya, Lyon, France
- Richard Coering, Omaha, United States
- Hajo Gurdaman, Groningen, The Netherlands
- Dag Harnsen, Klampenborg, Denmark
- Tim Harrison, London, United Kingdom
- Sophie Jarraud, Lyon, France
- Anders Rhod Larsen, Copenhagen, Denmark
- Frédéric Laurent, Lyon, France
- Hélène Meugnier, Lyon, France
- John Rossen, Groningen, The Netherlands
- Raquel Sá-Leão, Lisbon, Portugal
- Paul Savvelkou, Maastricht, The Netherlands
- Patricia Simoes Martins, Lyon, France
- Robert Skov, Copenhagen, Denmark
- Aine Hrisan, Lyon, France
- François Vandenesch, Lyon, France
- Guido Werner, Wernigerode, Germany
- Thierry Wirth, Paris, France

Contact

Contact Person

Dr Frédéric Laurent
Hospices Civils de Lyon
Centre de Biologie Nord
Laboratoire de Bactériologie
Hôpital de la Croix-Rouisse
103, Grande Rue de la Croix-Rouisse
69004 Lyon
France

Phone +33 472 07 18 37

frederic.laurent@chu-lyon.fr

Administrative Secretariat

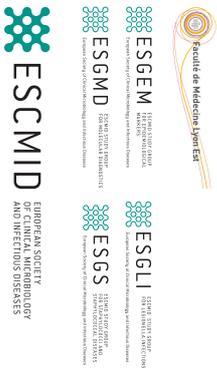
Hélène Meugnier
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
Centre national
de référence des staphylocoques
59, Boulevard Pinel
69677 Bron Cedex
France

Phone +33 472 12 96 21

Fax +33 472 12 96 26

helenemeugnier@chu-lyon.fr

Scientific picture outside: Whole genome sequences, © Frédéric Laurent
Scientific picture inside: Ribbed field gel electrophoresis, © Frédéric Laurent



© ESCMID, January 2014



ESCMID Postgraduate Education Course Molecular Typing Methods for Pathogens

Lyon, France
30 June – 4 July 2014



ESCMID Postgraduate Education Course

Molecular Typing Methods for Pathogens

Organisers

- ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESSEM)
- Lyon East Medical School

Supporters

- ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI)
- ESCMID Study Group for Molecular Diagnostics (ESGMD)
- ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS)

Course Coordinators

- Alex Friedrich, Groningen, The Netherlands
- Frédéric Laurent, Lyon, France

Course Objectives

- Provide young microbiologists with basic knowledge in bacteriology and virology with an updated overview of molecular typing methods for pathogens
- Give participants the opportunity to get insights and technical experience of the most common methods (including NGS approaches) in the daily infection control practice