

Plan du rapport annuel d'activité

2017

Centre national de référence des Staphylocoques

Directeur : Pr F. Vandenesch

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



Année
d'exercice
2016

Institut des Agents Infectieux

LBMMS du CHU de Lyon
Hôpital de la Croix Rouse
Centre de Biologie Nord - Bâtiment O
103 Grande rue de la Croix Rouse
69317 LYON cedex 04
@ : cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	7
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année N	7
2.1.1. Techniques développées ou en développement	7
2.1.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux	9
2.1.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.2. Présenter les activités d'expertise de l'année N et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées en précisant notamment :	12
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 ...)	12
2.2.2. Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	13
2.2.3. Nombre de souches ou échantillons issus des collections du CNR distribué.	13
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	13
3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	13
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	13
3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées	14
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	15
3.1.3.1. Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique	15
3.1.3.2. Syndromes d'exfoliation staphylococcique	18
3.1.3.3. Infections suppuratives à <i>S. aureus</i> PVL+	19
3.1.3.4. Furonculoses familiales	22
3.1.3.5. Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Pantone Valentine	22
3.1.3.6. Intoxications alimentaires individuelles et collectives	26
3.1.3.7. Ostéites et infections ostéo-articulaires	26
3.1.3.8. Sérologies PVL et TSST-1	27
3.1.3.9. Application du NGS	28
3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	30
3.2.1. Définition de l'échantillon de souches testées	30
3.2.2. Définitions utilisées pour exprimer la résistance	31
3.2.3. Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances	31
3.2.3.1. Résistance aux bêta-lactamines	31
3.2.3.2. Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides	33
3.2.3.3. Détection de la résistance au linézolide	34
3.2.3.4. Détection de la résistance à la daptomycine	36
3.2.3.5. Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole	37
3.2.3.6. Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux	37
3.2.4. Analyse des tendances	38
3.3. Participation aux réseaux de surveillance	38
3.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	39
4. ALERTE	40
4.1. La procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année	40

4.2.	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	41
4.2.1.	Epidémies de <i>S. aureus</i> dans plusieurs services de néonatalogie en France	41
4.2.2.	Cas groupés d'infections à SARM communautaire CC88 dans une maternité	43
4.2.3.	Recherche de lien de clonalité	43
4.3.	Analyser des tendances et le fonctionnement du système lors de l'alerte	44
5.	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	44
5.1.	Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	44
5.2.	Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	45
5.3.	Décrire les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR	45
5.4.	Décrire les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)	46
5.5.	Lister les activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de Santé publique France, des autres agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structures européennes (ECDC, ...) ou internationale (OMS, ...)	46
6.	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	48
6.1.	Décrire les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.	48
6.2.	Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR	53
7.	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	60
8.	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES	62
8.1.	Activités d'expertise	62
8.1.1.	le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer	62
8.1.2.	Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu	62
8.1.3.	les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés	63
8.1.4.	les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.	64
8.2.	Activités de conseil, formation et information	68
8.2.1.	les projets de formation envisagés	68
8.2.2.	les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR (p.ex. création, développement d'un site internet dédié)	68
8.2.3.	les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales	68
8.3.	Contribution à la surveillance épidémiologique	69
8.3.1.	les projets de constitution, développement animation de réseaux de partenaires	69
8.3.2.	la contribution à la détection, l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels	70
8.3.3.	la contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux	70
8.3.4.	les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance	71
8.4.	Contribution à l'alerte	72

ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR -----	73
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR -----	82
ANNEXE 3- PHRC LEUCOCIDINE DE PANTON VALENTINE : FACTEUR INDEPENDANT DE GRAVITE DES PNEUMONIES A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> -----	91
ANNEXE 4- LETTRE D'AGREMENT POUR TRANSFERT DE MATERIEL DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES STAPHYLOCOQUES -----	94
ANNEXE 5- PROGRAMME POSTGRADUATE EDUCATION COURSE - VIRULENCE AND RESISTANCE IN <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>: 2016 STATE OF THE ART"-----	96
ANNEXE 6- SOMMAIRE DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES DU CHU DE LYON -----	97

Résumé analytique

Expertise, surveillance, alerte, information, formation et conseil sont les mots clés des missions des CNR. Sur cette base les principaux résultats et faits marquants de l'année 2016 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 (2163) souches et ADN analysées, 440 souches et ADN distribués avec un nombre de correspondants toujours très élevé

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

- la meilleure connaissance de l'épidémiologie des SARM communautaires par le réalisation d'une étude pilote multicentrique européenne coordonnée par le CNR Français pour déterminer la prévalence des SARM communautaires dans les infections cutanées à *S. aureus* de patients admis dans les services d'urgence. Les résultats révèlent une prévalence faible en France de SARM (7%), au contraire des pays du Sud de l'Europe (Grèce, Italie) où la prévalence peut atteindre plus de 25%. En revanche le SARM-CO USA300 est notoirement absent de l'ensemble des patients inclus dans cette étude suggérant un risque actuellement limité de diffusion épidémique de ce clone,

- un nombre croissant d'épidémies d'infections à *S. aureus* dans les services de *néonatalogie*, à SAMS et SARM issus de différents clones, posant la question du risque infectieux chez des prématurés de plus en plus fragiles et/ou des conséquences d'un turnover de plus en plus élevé des professionnels de soins dans les équipes hospitalières,

- la détection croissante de souches de staphylocoques résistantes au Linezolid, notamment mais non exclusivement chez les staphylocoques à coagulase négative,

- 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, de formation, d'information et d'animation scientifique**, outre leur participation à différentes cellules de gestion d'épidémie, le CNR a poursuivi son activité de diffusion de la connaissance :

- par l'organisation d'un SympoStaph en 2016 dans la lignée des éditions précédentes avec une innovation du côté de l'ouverture au grand public de ce congrès. Ainsi deux sessions organisées en fin de journée étaient tout particulièrement ciblées vers un public non professionnel

- par l'animation d'un groupe spécifique Staphylocoques au sein de *l'European Society for Microbiology and Infectious Diseases (European Study Group on Staphylococci & Staphylococcal Infections)* dont le coordonnateur est F. Vandenesch (https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/staphylococci/). Ce groupe a organisé en 2016 une formation de niveau internationale (responsable F. Laurent), un contrôle de qualité Européen pour les CNR, ainsi que l'étude multicentrique décrite ci-dessus.

- enfin, le CNR participant d'une **recherche intégrée** « *bed to bench & bench to bed* » associée à notre unité INSERM thématique 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 mise en évidence de multiples imports avortés en Europe du clone de SARM communautaire Américain USA300 et la prédiction d'un affaiblissement démographique progressif de ce clone sur la base de l'analyse Génomique de 500 de souches (Glaser et al, MBio 2016).

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.

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

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est à présenter en annexe.

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

2.1.1. Techniques développées ou en développement

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

Cette méthode, qui était en phase d'évaluation/validation au sein du CNR des Staphylocoques tout au long de l'année 2016, est aujourd'hui validée et fonctionnelle. En ce qui concerne l'accès au séquenceur NextSeq (Illumina), au sein de la plate-forme de séquençage génomique des HCL, il est prolongé pour les années 2016-2018.

Le CNR des Staphylocoques bénéficie d'un run par mois, d'environ 40 souches, en utilisant un séquençage « pair-end » (2x150 bp) comme optimisé dans la phase d'évaluation.

Les « pipelines » d'analyses testés et retenus au CNR sont :

1- Pour toutes les souches séquencées l'analyse de base réalisée est la suivante :

- La **vérification et le nettoyage des reads** sont faits systématiquement pour toutes les souches séquencées. La qualité des données brutes est déterminée (logiciel FastQC <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Les données sont nettoyées (Trimmomatic v0.36¹) des adaptateurs, duplicatas et autres séquences contaminantes et leur qualité est ré-analysée.

¹ Bolger AM et al (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. Aug 1;30(15):2114-20.

- **L'identification (MLST) *in silico*** est réalisée à partir des reads nettoyés (comme décrit précédemment) avec une stratégie de *mapping* des reads contre la base de données MLST publique de *S. aureus* ou d'autres espèces de staphylocoques (pour lesquelles ce système de typage est validé). Le logiciel SRST2 est utilisé pour obtenir la version la plus récente de la base MLST souhaitée et pour mapper les reads de chaque génome contre l'ensemble de allèles connus pour chacun des 7 gènes de ménage. Ainsi, la détermination des ST est faite quand on trouve des allèles connus pour chacun des gènes de ménage. Si les allèles trouvés dans les génomes séquencés sont différents de ceux présents dans la base MLST, les nouveaux allèles sont extraits et une soumission d'un nouvel allèle est faite à la base MLST publique.

- L'identification de la **présence de gènes de résistance aux antibiotiques**. Pour les gènes de résistance aux antibiotiques, la même stratégie de *mapping* de *reads*, avec le logiciel SRST2, est utilisée. Cette fois-ci, on utilise une base de données publique et manuellement vérifiée (base ARGannot) de gènes de résistances aux antibiotiques. Cette base permet de détecter la présence / absence de gènes de résistances aux antibiotiques mais pas les mutations associées au gain de résistance (Ex : mutations dans les protéines ribosomales L3 et/ou L4 associées à la résistance au linézolide). La construction d'une base de données pour la détection de mutations et compatible avec le logiciel SRST2 est prévue.

2- Pour déterminer des liens de clonalité. Dans les cas de micro-épidémies suspectées, le *pipeline* d'analyse nullarbor (Nullarbor v 1.20, <https://github.com/tseemann/nullarbor>), dédié aux analyses NGS en Microbiologie de données Illumina « *pair-end* », a été testé, adapté et implémenté aux besoins du CNR. Ce pipeline permet de réaliser des analyses « par souche » des analyses comparatives entre « groupes souches ».

Pour les analyses « par souche » :

- 1.nettoyage des *reads* (Trimmomatic v 0.36)
- 2.identification d'espèce, par une approche k-mer contre une base de données de génomes connus (Kraken v 0.10.5-beta)
- 3.assemblage de novo (SPAdes v 3.10.0)
- 4.annotation des génomes (Prokka v 1.11)
- 5.détermination de MLST, à partir des génomes assemblés et avec une détection automatique du système MLST pour l'espèce (mlst v 2.7)
- 6.résistome, identification des gènes de résistance à partir des génomes assemblés (abricate v 0.3)
- 7.détermination de variants (polymorphismes d'un ou plusieurs nucléotides, insertions et délétions), à partir du *mapping* de *reads* par rapport à un génome de référence (Snippy v 3.1)

Pour les comparaisons de « groupes souches » :

- 1.extraction des SNPs (*Single Nucleotid Polymorphism*) du *core* génome, pour cela les variants obtenus par souche (Snippy) sont filtrés pour extraire que les SNPs (*Snippy-core*). Pour cela, évidemment, le même génome de référence doit être utilisé pour toutes les souches
- 2.reconstruction d'un arbre phylogénétique basé sur les SNPs du *core* génome (FastTree v 2.1.8 Double precision) et détermination de la matrice de distance de Seps (script PERL afa-pairwise.pl du outil Newick-Utils)
- 3.détermination du pan-génome, basée sur la présence et/ou absence de gènes dans les génomes comparés à partir des résultats obtenus par Prokka (Roary v 8.0)

4. production d'un rapport avec le tableau des souches, informations sur le séquençage (rendement, couverture, etc), identification de l'espèce (Kraken), MLST, résistome, bilan de l'assemblage, résumé du *core*-génom, phylogénie
Des alignements globaux de génomes annotés (avec Prokka) sont aussi utilisés comme outil complémentaire pour l'analyse de la présence/absence de gènes.

Pour les applications en routine au CNR Voir paragraphe 3.1.3.9

2.1.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats

Résistance à la daptomycine

Comme cela est développé dans le bilan d'activité du CNR des staphylocoques, la résistance à la daptomycine, lipopeptide dont la prescription est en forte augmentation, constitue une source d'inquiétude notamment dans le cadre du traitement des infections chroniques sur matériel. En l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de gènes spécifiques conférant la résistance à la daptomycine. L'élévation des CMI est classiquement associée à des mutations ponctuelles dans certains gènes (*mprF*, *rpoB*, *WalRK*). Ainsi le CNR souhaite mettre en place une recherche de mutations sur le gène *mprF* pour les souches qui présentent une CMI daptomycine > 1 mg/L. La preuve de concept a été réalisée en 2016. Pour deux de ces souches, le séquençage du gène *mprF* a mis en évidence des mutations précédemment décrites comme associées à la résistance à la daptomycine, notamment la mutation Thr/345/Ile. Nous allons poursuivre le séquençage de ces souches afin de mieux identifier les mécanismes impliqués dans la résistance à la daptomycine.

Evaluation de la performance des techniques de dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides chez *S. aureus*.

La sensibilité diminuée aux glycopeptides de *Staphylococcus aureus* (GISA) est responsable d'échecs thérapeutiques dans le cas d'infections sévères traitées par glycopeptides. La présence d'une population hétérogène rend difficile l'identification de ces souches par les méthodes d'antibiogramme classiques. Cinq techniques de dépistage ont été évaluées pour leurs performances de détection de GISA en comparaison de la technique de référence, l'analyse des populations résistantes à la vancomycine (APOP).

Une collection de 108 souches de *S. aureus* adressées au CNR dans la période janvier 2010 à mars 2016 a été caractérisée pour la sensibilité aux glycopeptides par la technique de référence APOP. Cinq techniques de dépistage ont été évaluées : la détermination des CMI par bandelette avec gradient de concentration (E-test), la réalisation de CMI par microdilution en barrette prête à l'emploi (MIC Strip Biocentric), le test de la macro-bandelette (E-test avec un inoculum 2McF sur milieu gélosé cœur-cervelle), le test Teico 5 (ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 mg/L de teicoplanine, par dépôt en spot de 10 µl d'une suspension 2 McF) et le test de la bandelette en gradient enrichie pour détection de la résistance aux glycopeptides GRD (bioMérieux).

Résultats : Les performances des différents tests sont résumées dans le tableau ci-dessous et ont fait l'objet d'une présentation à la RICAI 2016.

Tableau 1- Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des différentes méthodes de dépistage des souches GISA (108 souches (55 VISA, 53 VSSA))

		E-test 0.5McF	MIC Strip Biocentric	E-test 2McF	GRD	Teico5 GISA	MH-
Critère VISA		VA ou TP >2	VA ou TP >2	VA et TP≥8 ou TP≥12	VA ou TP ≥ 8	≥ 4 col	
VISA	VP	41	42	30	44	35	
	FN	14	13	25	11	20	
VSSA	VP	3	4	13	6	15	
	VN	50	49	30	47	28	
Sensibilité		74.5%	76.4%	54.5%	80.0%	63.3%	
Spécificité		93.2%	91.3%	76.9%	88.7%	70.0%	

*déterminé par analyse de population ; VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; FP : faux positif, VN : vrai négatif

Conclusion : Les deux techniques de détermination des CMI, E-test et MIC-Strip ont conduit à de résultats très similaires. Le screening par bandelette GRD a montré les meilleures performances par rapport à la technique de référence. Cette méthode étant moins fastidieuse, plus rapide et plus adaptée aux laboratoires non-spécialisés, constitue la meilleure alternative pour le dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides de *S. aureus*. Malheureusement, il semble que leur fabrication vienne d'être arrêtée.

Alere™ PLP2aSA Culture Colony Test : Evaluation de la nouvelle génération du test

Introduction. La détection rapide de la résistance à la méticilline de *S. aureus* (SA) est cruciale pour la prise en charge des patients infectés. Alere™ PLP2a SA Culture Colony Test (Alere™ PLP2a SA CCT) est un test immunochromatographique qui détecte en 5 minutes l'expression de la PLP2a codée par le gène *mecA* à partir d'une culture primaire. Un test nouvelle génération a été commercialisé avec une lisibilité améliorée par un marquage rouge des bandes contrôle et PLP2a.

Matériels et méthodes. Les performances du test ont été évaluées sur :

- . une collection de souches de SA sensibles à la méticilline (SASM, n=10) et de SA résistants à la méticilline (SARM) *mecA*+ (n=80) et *mecC*+ (n=10) représentatifs des clones circulants en France et en Europe,
- . un panel de staphylocoques à coagulase négative (SCN) sensibles (n=13, 1 souche par espèce) et résistants (n=98, 1 à 11 souches par espèce) à la méticilline représentatives des espèces les plus fréquemment isolées en routine.

Les tests ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur après subculture (36°C/18h) sur gélose au sang (COS, bioMérieux). En cas de non détection sur culture primaire, le test a été répété après induction en prélevant des colonies autour d'un disque de céfoxitine.

Résultats. Les 10 souches de SASM et 80 souches de SARM *mecA*+ ont été correctement identifiées sur isolement primaire sans induction (Se=Sp=100%). En revanche **aucune des souches *mecC*+ n'a été détectée même après induction**, contrairement à la version précédente du test. Pour les SCN, les 10 souches de SCNSM et 92 des 98 souches de SCNRM ont été correctement identifiées sur isolement primaire (Se=93,9% ; Sp=100%). Les faux-négatifs appartenaient aux espèces *S. haemolyticus* (n=1/11), *S. hominis* (2/11), *S. capitis* (1/11) et *S. saprophyticus* (2/11). Après induction toutes ces souches étaient détectées positives.

Conclusion. Ces résultats confirment que le test Alere™ PLP2a SA CCT peut être utilisé sur isolement primaire pour détecter la résistance à la méticilline pour les SARM *mecA*+ mais pas pour les SCN (6,1% de faux-négatifs qui sont détectés positifs après induction).

Simple et rapide, le test Alere™ PLP2a SA CCT peut donc être utilisé pour les SA lorsqu'une antibiothérapie adaptée précoce est indispensable (patients fragiles, infections sévères) ou en complément d'une autre technique pour confirmer la présence de PLP2a pour les SA et les SCN (présentation à la RICAI 2016).

chromIDTM *S. aureus* ELITE (SAIDE, bioMérieux)

Introduction. La prévalence de la colonisation pulmonaire par *S. aureus* (SA) de l'arbre bronchique chez les patients atteints de mucoviscidose est élevée. La présence de ce pathogène chez ces patients contribue à une dégradation des fonctions pulmonaires, à des atteintes pulmonaires sévères ainsi qu'à une augmentation de mortalité. La détection et l'isolement rapide de SA dans les échantillons respiratoires constituent un réel défi compte tenu de la flore associée. Le but de cette étude a été d'évaluer la performance d'un nouveau milieu chromogène (chromIDTM *S. aureus* ELITE (SAIDE, bioMérieux) destiné à l'isolement de SA sur divers échantillons pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose.

Matériels et méthodes. De façon prospective, des échantillons respiratoires (n = 202) collectés chez des patients atteints de mucoviscidose ont été ensemencés sur chromIDTM *S. aureus* ELITE (SAIDE, bioMérieux), chromIDTM *S. aureus* (SAID, bioMérieux), BBLTM CHROMagar™ *S. aureus* (BBL, Becton Dickinson) et gélose au sang Columbia + CNA (CNA, bioMérieux). Trois lectures ont été effectuées après 24h, 48h et 72h d'incubation à 36°C. L'identification des colonies chromogènes a été confirmée par la technologie MALDI-TOF. La sensibilité, la spécificité et la sélectivité ont été évaluées indépendamment pour chaque milieu. Les différences observées entre le milieu SAIDE et les trois autres milieux (SAID, BBL, CNA) ont été évaluées selon les recommandations CLSI EP12-A2.

Résultats. Les résultats ont montré une meilleure sensibilité pour la détection de SA du milieu SAIDE quel que soit le temps de lecture. Cette différence était toujours significative par rapport au milieu BBL après 24, 48 et 72h d'incubation. La spécificité était élevée (100% pour SAIDE et BBL) et non significativement différente pour l'ensemble des milieux quel que soit le temps de lecture. Sur la base du nombre de colonies non chromogènes détectées sur chaque gélose, la sélectivité sur SAIDE se trouvait quant à elle significativement plus élevée que celles des trois autres milieux.

Tableau 2- Performances des quatre milieux chromogènes pour la détection de *S. aureus*

Lecture	Milieux	Vrai Négatif	Vrai Positif	Faux Négatif	Faux Positif	Sensibilité		Spécificité	
						Sensibilité	Différence de sensibilité -2- sided 95% CI	Spécificité	Différence de spécificité -2- sided 95% CI
24h	SAIDE	94	91	17	0	84,3% [76,2 ; 88,9%]		100% [96,2 ; 100] %	
	BBL	94	77	31	0	71,3% [62,1 ; 79] %	13,0% [6,14 ; 20,12] % S	100% [96,2 ; 100] %	0,0% [-3,85 ; 3,85] % NS
	SAID	93	66	42	1	61,1% [51,7 ; 69,8] %	23,1% [14,67 ; 31,46] % S	98,9% [94,2 ; 100] %	1,1% [-2,92 ; 5,79] % NS
	CNA	94	88	20	0	81,3% [73,1 ; 87,7] %	2,8% [-2,60 ; 8,40] % NS	100% [96,2 ; 100] %	0,0% [-3,85 ; 3,85] % NS
48h	SAIDE	94	102	6	0	94,4% [88,4 ; 97,4] %		100% [96,2 ; 100] %	
	BBL	94	91	17	0	84,3% [76,2 ; 89,9] %	10,2% [3,73 ; 17,56] % S	100% [96,2 ; 100] %	0,0% [-3,85 ; 3,85] % NS
	SAID	92	93	15	2	86,1% [78,3 ; 91,4] %	8,3% [2,25 ; 15,36] % S	97,9% [92,5 ; 99,7] %	2,1% [-2,15 ; 7,48] % NS
	CNA	94	96	12	0	88,9% [81,6 ; 93,5] %	5,6% [-0,57 ; 12,37] % NS	100% [96,2 ; 100] %	0% [-3,85 ; 3,85] % NS
72h	SAIDE	94	103	5	0	95,4% [89,5 ; 98,5] %		100% [96,5 ; 100] %	
	BBL	94	95	13	0	88% [80,5 ; 92,8] %	7,4% [0,83 ; 14,73] % S	100% [96,2 ; 100] %	0,0% [-3,85 ; 3,85] % NS
	SAID	89	98	10	5	90,7% [83,8 ; 94,9] %	4,6% [-1,40 ; 11,31] % NS	94,7% [88,1 ; 97,7] %	5,3% [-0,42 ; 11,85] % NS
	CNA	94	99	9	0	91,7% [84,9 ; 95,6] %	3,7% [-2,73 ; 10,63] % NS	100% [96,2 ; 100] %	0,0% [-3,85 ; 3,85] % NS

(S : Significatif / NS : Non Significatif)

Conclusion. En utilisation en conditions réelles sur des échantillons provenant de patients atteints de mucoviscidose, le milieu chromID™ *S. aureus* ELITE a démontré des performances intéressantes avec une détection plus rapide, plus sensible et une lecture plus facile tout en conservant une parfaite spécificité par rapport aux milieux classiquement utilisés jusque-là chez cette population de patients (présentation à la RICAI 2016).

Thermo Scientific™ Sensititre™ susceptibility MIC plates (Thermo Fisher Scientific). Le CNR dispose actuellement de différentes techniques d'antibiogramme en routine (VITEK, diffusion en disque, CMI-Etest). Les correspondants qui nous adressent les souches disposent le plus souvent de ces techniques, techniques qu'ils ont utilisé avant de nous adresser les souches présentant des profils particuliers, atypiques, et/ problématique en terme d'interprétation. Il nous semble donc pertinents pour le CNR de disposer d'une technologie complémentaire qui nous permette de nous approcher au mieux de la technique de référence que constitue la mesure des CMI en milieu liquide en routine. Dans ce contexte notre intérêt se porte vers les réactifs SENSITITRE qui se présentent sous la forme d'antibiotiques lyophilisés avec des dilutions de raison deux dans une microplaque 96 puits. Ce format permet de tester un panel large d'antibiotique pour le staphylocoque. Une phase d'évaluation en utilisant les kits commerciaux « Gram positif » a été réalisée en 2016 avec les automates de préparation et de lecture (Thermo Scientific™ Sensititre™ OptiRead™ System, Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ System). L'étude n'a pas été finalisée et se poursuit sur le premier semestre 2017.

2.1.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

En 2016, nous avons notamment transmis à plusieurs laboratoires les protocoles PCR et les souches contrôles permettant l'identification des souches de SARM portant le gène *mecC* et les protocoles PCR permettant la détection des gènes codant la leucocidine de 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 2016, le CNR a reçu **2163** souches et ADN

- **1956** 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).

- **207** 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 3.2. *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 2016, le CNR a distribué en France et à l'étranger 440 souches de référence ou souches cliniques ou ADN à nos correspondants en France (y compris Lyon) (312 souches ou ADN) et à l'étranger (Suisse : 52 ; Danemark : 40 ; Belgique : 25, USA : 6, Autriche : 5), pour la mise au point de techniques de diagnostic ou pour des contrôles de qualité soit dans le cadre d'études multicentriques

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.

En 2016, les **1956** souches reçues par le CNR pour expertise (virulence et résistance) sont donc bien le reflet de l'épidémiologie de l'ensemble des régions françaises hors protocoles.

Ces souches provenaient des **13 régions françaises** ou des DROM COM. Plus de 65 % des souches provenaient de 4 régions principales : 30 % (Auvergne- Rhône-Alpes), 16 % (Ile de France), 14 % (Provence Alpes Côte d'Azur), 8 % (Hauts de France), 7 % venaient des DROM COM), et \leq 5 % pour chacune des autres régions (Figure 1).

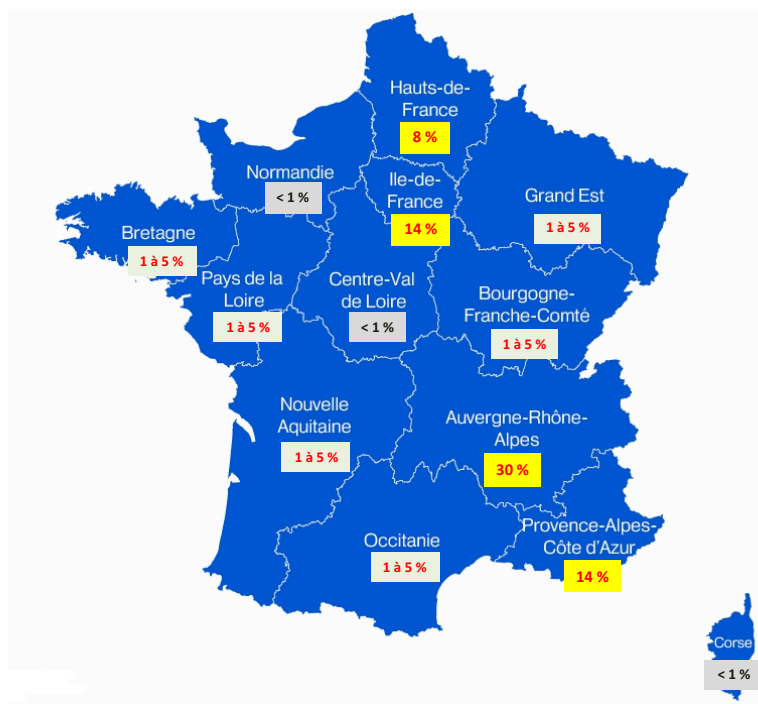


Figure 1- Répartition géographique des souches reçues en 2016 pour expertise (identification, recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques)

3.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées

Entre 2006 et 2016, le CNR a reçu 23125 souches de staphylocoques pour expertise (Figure 2) avec une augmentation constante du nombre de souches reçues pour expertise. (A noter les pics en 2011 et 2015 qui correspondent aux nombreuses souches reçues au CNR dans le cadre de différents protocoles.)

En 2016, le CNR a reçu **1956** souches pour expertise. 13 régions françaises ou des DROM COM. Plus de 65 % des souches provenaient de 4 régions principales : 30 % (Auvergne-Rhône-Alpes), 16 % (Ile de France), 14 % (Provence Alpes Côte d'Azur), 8 % (Hauts de France), 7 % venaient des DROM COM), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (Figure 1).

Sur cette même période, deux cent sept souches ont également été reçues dans le cadre de différents protocoles et provenaient de France, de divers pays en Europe.

Le CNR a distribué **440 souches** ou ADN à nos correspondants en France (y compris Lyon) (312 souches ou ADN) et à l'étranger (Suisse : 52 ; Danemark : 40 ; Belgique : 25, USA : 6, Autriche : 5).

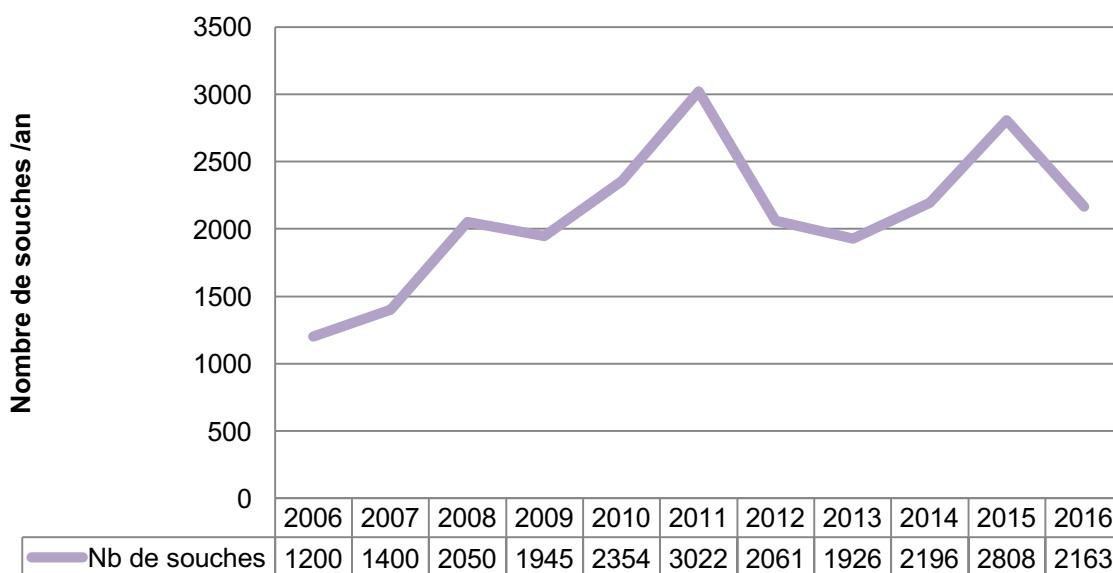


Figure 2- Evolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2016.

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines déclarées en France reste stable avec 138 cas en 2016 (Tableau 3).

Tableau 3- Nombre de cas de **toxémies staphylococciques** humaines par syndrome recensées par le CNR des Staphylocoques entre 2011 et 2016 en France.

Année	Choc toxique staphylococcique	Scarlatine staphylococcique	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Total Syndromes/an
2011	61	7	23	26	117
2012	92	11	14	11	128
2013	91	9	17	27	144
2014	82	5	26	28	141
2015	88	6	23	38	155
2016	85	5	15	33	138

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. Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé **503** souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et **43** souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

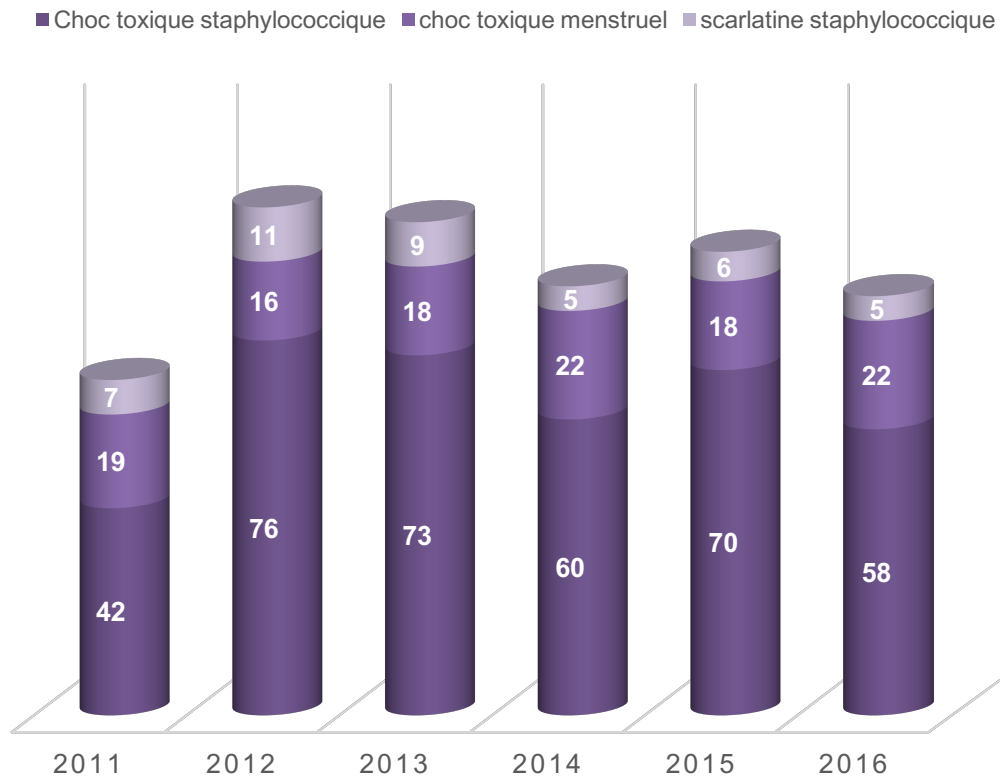


Figure 3- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour **choc toxique staphylococcique et formes mineures** entre 2011 et 2016.

En 2016, **85 cas** de CTS ont été rapportés, dont **22 cas de CTS menstruels** ; ces chiffres, restent stables par rapport aux années précédentes.

Concernant les cas de chocs menstruels, l'âge des patientes s'étend de 12 à 34 ans avec une médiane de **19.7 ans**. Le pronostic a toujours été favorable. Toutes les souches possèdent le gène codant la toxine du choc toxique staphylococcique. Dix-sept souches isolées appartiennent au complexe clonal **CC30-MSSA** correspondant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté, deux au complexe clonal CC8-MSSA, une au complexe clonal CC22-MSSA et une au complexe clonal CC5-MSSA. Seule une souche analysée était un SARM appartenant au complexe clonal CC22-MRSA-IV qui est clone très prévalent en Angleterre et la jeune patiente était une touriste britannique en vacances en France.

A noter qu'au cours des derniers mois, la presse généraliste et les médias se sont inquiétés d'une recrudescence des CTS d'origine menstruelle, maladie attribuée à l'utilisation de tampons périodiques à fort pouvoir absorbant chez des femmes préalablement colonisées au niveau vaginal par une souche de *S. aureus* productrice de toxine superantigénique.

Cet intérêt des journalistes s'explique par la nouveauté du sujet et par un terrain médiatique favorable créé par la pétition sur la composition des tampons suscitant un doute sur leur innocuité. Le sujet a bénéficié d'une forte visibilité médiatique à l'occasion de prises de parole indépendantes mais complémentaires, laissant parfois place à une communication alarmiste. Il est donc important d'effectuer aujourd'hui une mise au point concernant l'épidémiologie des CTS et leur prévention.

En France, la surveillance des CTS repose sur les données recueillies par le CNR des staphylocoques. Tous les cas de CTS recensés au CNR sont le fait de déclarations spontanées des cliniciens ou des microbiologistes à des fins diagnostiques ou

épidémiologiques. Ainsi, depuis que le CNR des staphylocoques recense ces cas, une augmentation continue des déclarations spontanées a été enregistrée entre les années 2000 et 2010 (figure 4). Il n'est cependant pas possible de déterminer si cette augmentation est la conséquence d'une notoriété croissante du CNR, d'une meilleure sensibilisation des médecins à cette maladie ou d'une réelle augmentation de l'incidence de cette pathologie.

En faveur de la première hypothèse, on notera que l'évolution du nombre de cas recensés au CNR est significativement corrélée au nombre total de souches qui lui sont adressées pendant la même période (figure 5). Par ailleurs, au cours des 6 dernières années (2011 à 2016), les données du CNR ne mettent pas en évidence d'augmentation significative du nombre de cas rapportés de CTS d'origine menstruelle, avec une moyenne de 20 cas recensés chaque année (figure 4). Une sous-déclaration au CNR ne pouvant être écartée, le CNR et Santé Publique France travaillent actuellement sur les données du PMSI pour évaluer la complétude des données du CNR vis à vis du diagnostic de CTS en milieu hospitalier ; les premiers résultats sont en faveur d'une diminution de 2010 à 2015 du nombre de CTS codés en diagnostic principal, relié ou associé dans le PMSI, mais doivent être confirmés.

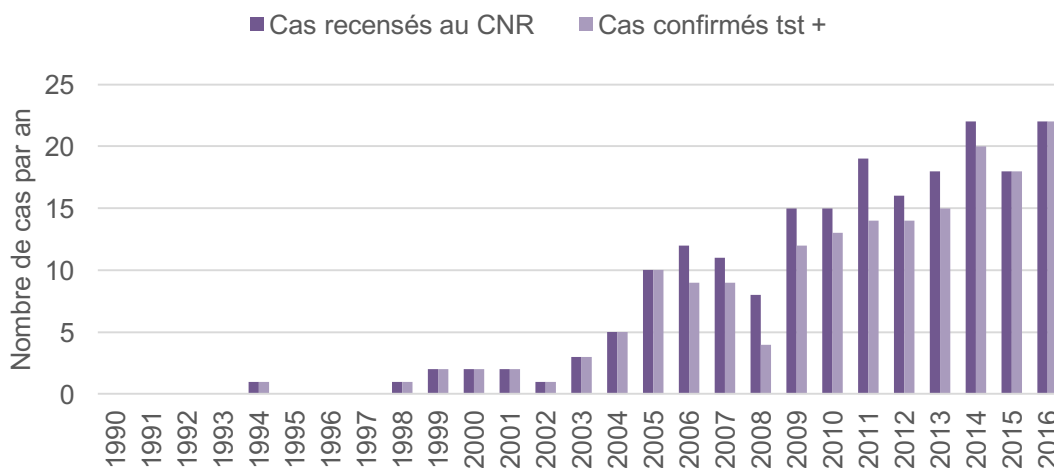


Figure 4- Evolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle entre 1990 et 2016. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tst*.

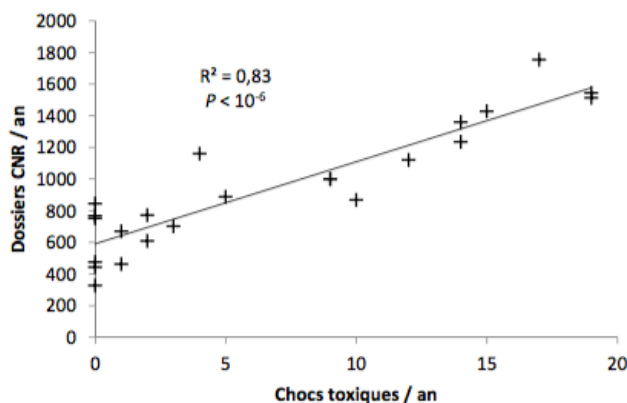


Figure 5- Relation entre l'activité globale du CNR et les cas de choc recensés

Il faut noter qu'une étude a été initiée sur le choc menstruel et le microbiote vaginal avec de nombreuses communications du CNR (Cf paragraphe 3.4.).

Concernant les chocs non menstruels (58 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 80 ans avec une médiane d'âge de 45.2 ans tandis que le *sexe ratio* ♂/♀ de ces patients est de 1.3. Il n'y a que 7 souches de SARM qui correspondent aux principaux clones de SARM nosocomiaux diffusant en France avec une majorité de clone Lyon. Dix-sept souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 34 autres souches négatives pour le gène codant la TSST-1 possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC), 6 souches possédaient uniquement le gène codant l'entérotoxine P.

En 2016, **cinq cas de scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 0 à 48 ans avec une médiane d'âge de 2.5 ans tandis que le *sexe ratio* ♂/♀ est de 1.5. Ces manifestations sont survenues principalement au décours d'infections cutanées communautaires. Chacune des souches possède au moins un gène codant un superantigène (TSST-1, SEA, SEB, SEC). Toutes les souches étaient sensibles à la méticilline.

3.1.3.2. Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé au total 281 souches isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **115 cas de maladie exfoliante généralisée** (*staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS*) ou de **mild SSSS** et **166 cas d'impétigo bulleux** (Figure 6)

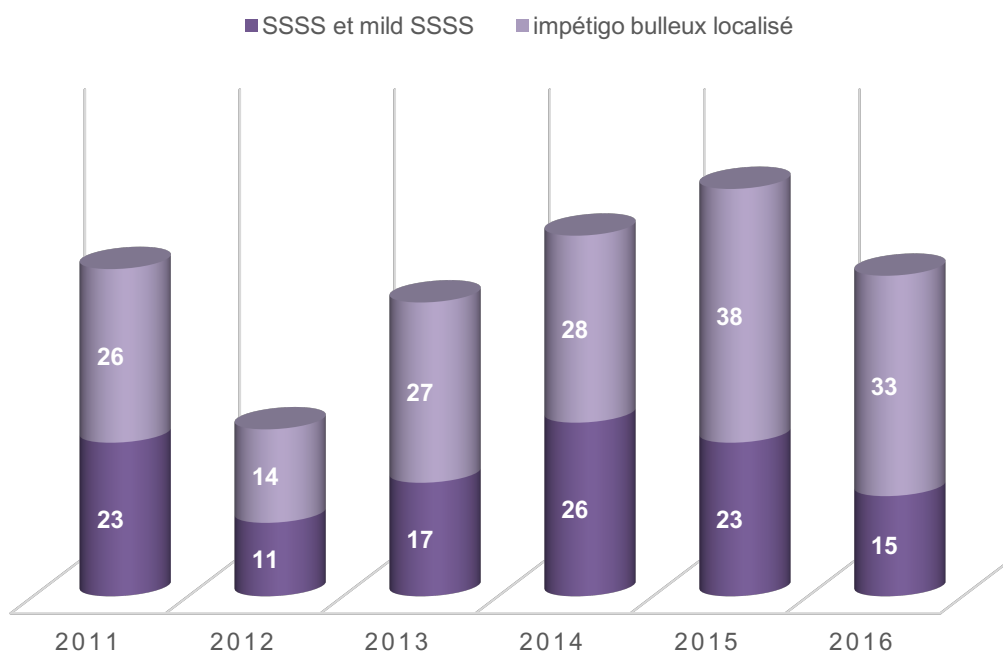


Figure 6- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour **syndrome d'exfoliation staphylococcique** entre 2011 et 2016.

En 2016, le CNR a analysé **48 souches** de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont **15 cas de maladie exfoliante généralisée** et **33 cas d'impétigo bulleux**. On constate une

diminution des souches envoyées au CNR dans le cadre des syndromes d'exfoliation généralisée par rapport à l'année précédente.

Une petite épidémie de syndrome d'exfoliation généralisée survenue dans une maternité avec une souche productrice de l'exfoliatine B appartenant au complexe clonal CC121-MSSA.

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. Ces formes sont associées aux exfoliatines et non aux superantigènes. En 2016, nous avons observé 4 cas de cette forme mineure 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 forme d'infection staphylococcique 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 présentant toujours un risque potentiel d'évolution vers le choc toxique staphylococcique ce qui n'est pas le cas de la première. Les premières observations de cette forme particulière ont fait l'objet d'une publication².

En 2016, pour les 15 cas de patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique classique**, l'âge s'étend de zéro à 22 ans avec une médiane à 0.3 jours tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de **1,1**. Quatre souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), sept souches l'ETA seule et quatre souches l'ETB seule. Un seul cas d'exfoliation généralisée a été rapporté chez un adulte jeune souffrant d'insuffisance rénale majeure. Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

Par comparaison, en 2016, l'âge des 33 patients ayant présenté un **impétigo bulleux** s'étend de zéro à 16 ans avec une médiane de 3.3 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de **1.75**. Quatorze souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, dix-sept souches l'ETA seule et deux souches l'ETB seule. Là encore, aucune souche n'était résistante à la méticilline.

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

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

- (i) Isolement de souches de *S. aureus* dans un contexte d'infections récidivantes, d'infections nécessitant un drainage chirurgical ou dans un contexte de diffusion intra-familiale d'infections staphylococciques. Ces souches sont **majoritairement sensibles** à la méticilline.
- (ii) Isolement de souches de *S. aureus* présentant un profil de résistance évocateur de SARM communautaire (SARM-C) qui alerte le bactériologiste et l'incite à adresser la souche au CNR.

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. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Feb 26

Nous recevons depuis 2011 un nombre croissant de souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 7).

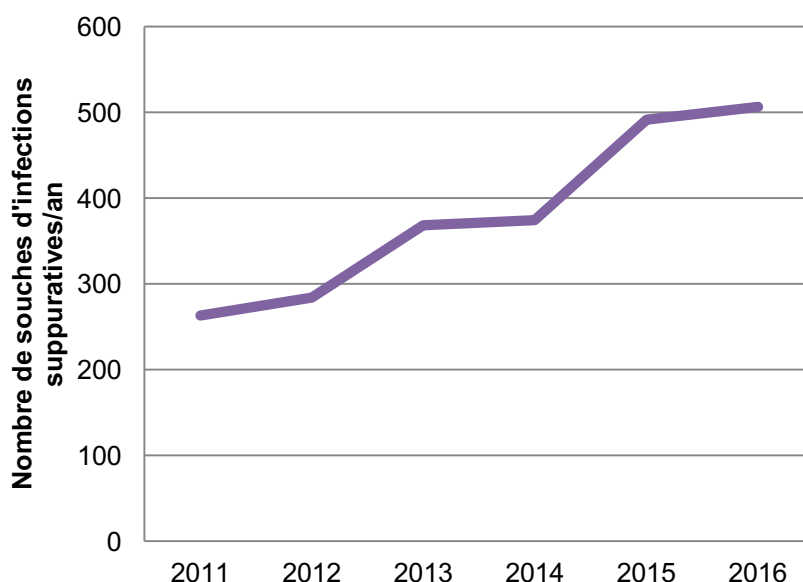


Figure 7. Evolution du nombre de souches reçues dans le cadre **d'infections suppuratives** (hors épidémies).

Ainsi pour la seule année 2016, nous avons expertisé **506 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections) **hors épidémies**. La proportion de souches PVL+ est de 55% au total mais de **90.1%** lorsque l'on ne considère que **les infections primitives** (Figure 8).

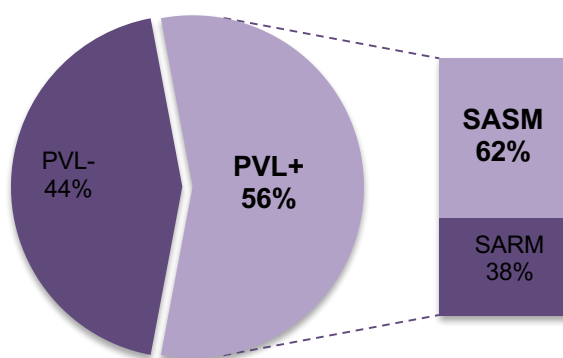


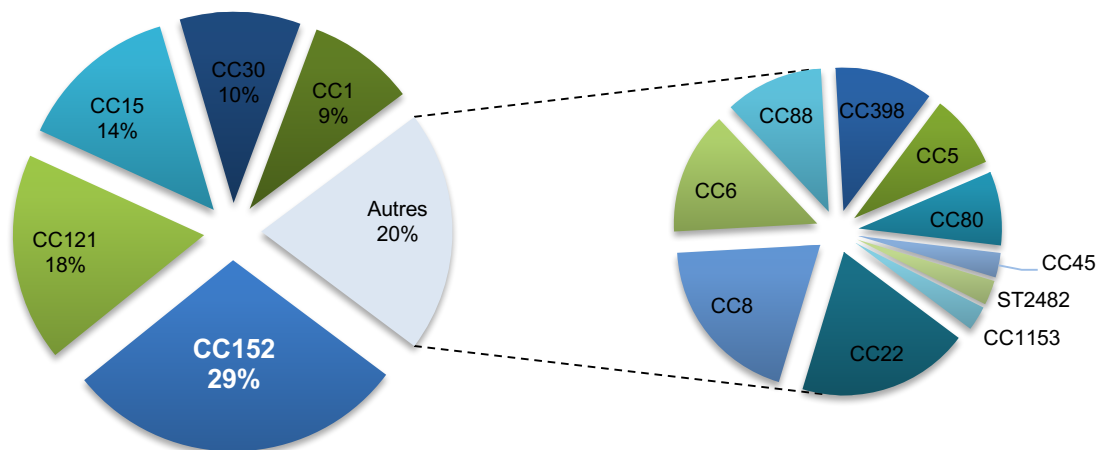
Figure 8- Caractéristiques des souches responsables d'**infections suppuratives** en 2016 (n=506).

Parmi les souches PVL+ :

- (i) **62 %** sont des **SASM** (Figure 9). Comme classiquement décrit, on note une plus grande diversité de clones de SASM PVL. Le clone majoritaire est le clone **CC152-MSSA** (Figure 9a). Nous observons depuis 2013 une augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal. Il n'était qu'en quatrième position en 2013 et représentait moins de 11% des souches de SASM PVL+ alors qu'en 2016, il est en première position et représente 29% des souches de SASM PVL+ responsables d'infections suppuratives toujours en augmentation par rapport à 2015 où il représentait 27% de ces souches.

- (ii) **38 %** sont des **SARM** (Figure 9). 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*+) qui reste le principal clone identifié. Nous observons des cas d'infections avec le clone d'origine Nord-américaine et à diffusion mondiale : le clone **USA300** (*agr1*, PVL+, *mecA*+) mais sa prévalence est restée stable au cours des 5 dernières années (Figure 9b).

a. Caractéristiques des clones de SASM PVL responsables d'infections suppuratives en 2016



b. Caractéristiques des clones de SARM PVL responsables d'infections suppuratives en 2016

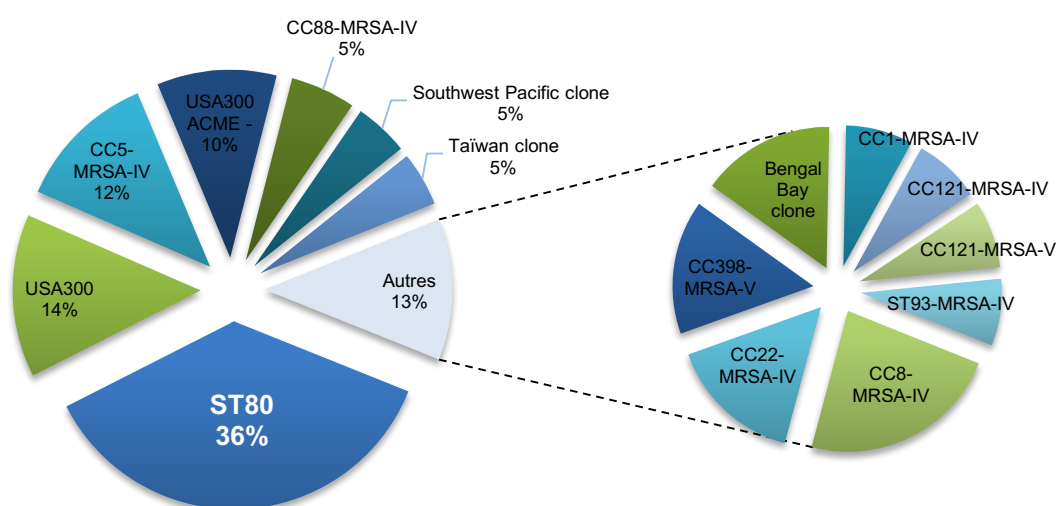


Figure 9- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ responsables d'infections suppuratives en 2016

Cette proportion relativement faible (14%) du clone USA 300 au sein des souches de SARM isolées d'infections cutanées suppuratives est en accord avec les observations de l'étude

Européenne initiée par le CNR français visant à établir la prévalence des SARM et notamment celle des clones communautaires dans les infections cutanées sévères des patients admis dans les services d'urgence³.

Il conviendra dans les années à venir de surveiller l'augmentation de la prévalence du clone **CC152-MSSA PVL+**. En effet, on note une nette augmentation des souches reçues appartenant à ce complexe clonal qu'il s'agisse d'infections cutanées mais également dans le contexte des pneumonies (cf. 3.1.3.5) (communication RICAI 2016).

3.1.3.4. Furonculoses familiales

Depuis 2011, **95 recherches directes sur prélèvement** des gènes codant la PVL dans un contexte de furonculose familiale ont été effectuées à partir d'écouvillonnage de différents **sites de portage** (nez, gorge, périnée, anus) à l'hôpital femme/mère/enfant pour la détection des **porteurs** sains ou symptomatiques et vérifier l'efficacité de la **décontamination**. Le CNR suit notamment les souches isolées à partir des prélèvements positifs afin de surveiller l'acquisition de résistance à la mupirocine et la chlorhexidine lors de protocoles de décontamination répétés. En collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Yves Gillet, Dr Laure Hees), le CNR a suivi 3 familles non reliées au plan épidémiologique et présentant des furonculoses récidivantes avec des souches sensibles à la méticilline, *agr3*, possédant les gènes codant la PVL, les entérotoxines A, H, K, Q et résistantes à la pénicilline G, à l'acide fusidique mais surtout **résistantes à la chlorhexidine et à la mupirocine** rendant difficile la décontamination. Depuis 2012, ces familles sont considérées comme décontaminées.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu **55 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 mais en 2012, il y a eu un cas de pneumonie nécrosante au sein d'une famille dans laquelle les enfants avaient présenté des infections cutanées avec le clone de SARM communautaire ST80 c'est pour cela que nous suivons ces cas de diffusion intra-familiale avec attention.

3.1.3.5. 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 probable 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 de prendre en charge cette pathologie, un PHRC a été initié afin de répondre à plusieurs questions (Annexe 3) : (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

³ Bouchiat C *et al.* I. (2017). MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), 372–375.

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 2016, 197 patients** (âgés de 1 mois à 84 ans, sexe ratio ♂/♀ 1,26) ayant présenté une pneumonie communautaire grave ont été inclus. Au total, 106 souches de *S. aureus* des patients inclus possèdent les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine.

Nous avons observé un parallélisme entre les pics de l'épidémie grippale et une augmentation de l'incidence des pneumonies communautaires à *S. aureus*, suggérant l'existence d'une relation entre l'infection virale et cette pneumonie. Cette tendance s'est confirmée sur la période grippale 2015-2016. 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 10).

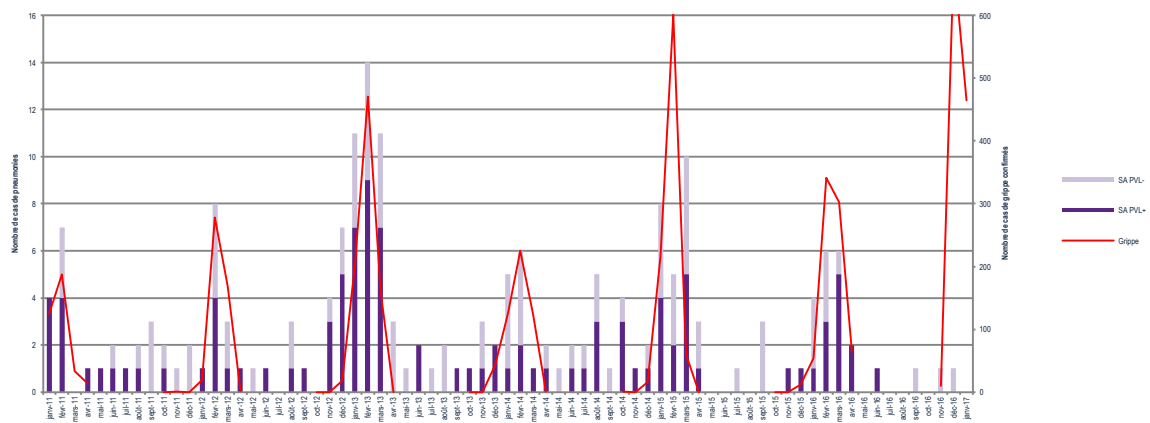


Figure 10- Nombre de cas de **pneumonies communautaires sévères à *S. aureus*** inclus dans le PHRC au cours des épidémies grippales 2011-2016 (PHRC)

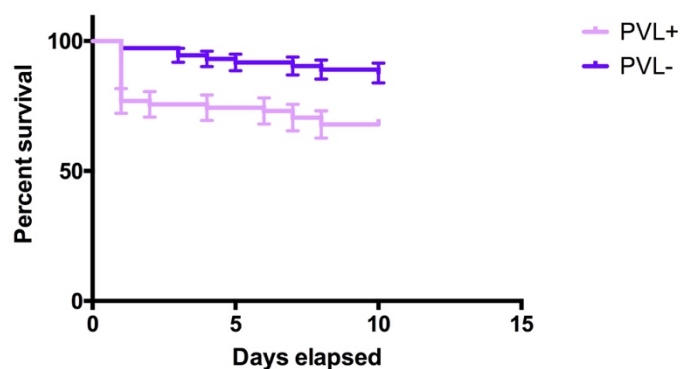
Les analyses préliminaires des données cliniques disponibles pour 152 patients (Tableau 4) ont montré que malgré une augmentation de l'âge médian des patients atteints d'une pneumopathie à *S. aureus* producteur de PVL (36 ans) par rapport à nos résultats publiés 2002 (14,8 ans)⁴, ces patients restent significativement plus jeunes que les patients PVL- (âge médian 58 ans). Les patients PVL- sont plus souvent des hommes. Les patients PVL+ bénéficient plus fréquemment d'une pose d'ECMO et présentent plus souvent une érythrodermie à l'admission.

⁴ Gillet et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet (2002) vol. 359 (9308) pp. 753-9

Tableau 4- Données cliniques préliminaires pour 152 patients

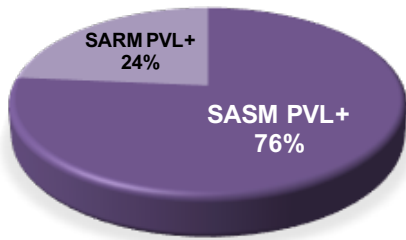
	PVL Positive (n=78)	PVL Négative (n=74)	p
Age (an) Médiane (25-75 percentile)	36 (14-55.25)	58 (47.5-67.65)	<0.0001*
Nombre Hommes	37	50	0,0122*
Délais entre symptômes et hospitalisation (jours) Médiane (25-75 percentile)	2.5 (1-4)	3 (2-5)	0,1013
ECMO admission	11	3	0,0468*
Décès attribuable	27	17	0,1704
Signes cliniques avant l'admission			
Syndrome pseudo-grippal	38	34	1
Diarrhée	13	20	0,1
Eruption cutanée	9	4	0,25
Signes cliniques à l'admission			
Diarrhée	12	4	0.06
Hémoptysie	28	19	0,172
Expectoration purulente	40	50	0,07
Erythrodermie	15	5	0,03*
Pneumothorax	5	0	0,0587
Signes cliniques durant le séjour			
Diarrhée	17	17	0,8867
Hémoptysie	35	29	0,1880
Erythrodermie	13	8	0,1622
Pneumothorax	10	5	0,1726
Signes radiologiques à l'admission			
Condensation unilatérale	32	19	0,0667
Condensation bilatérale	43	46	0,3640
Signes radiologiques durant le séjour			
Condensation unilatérale	29	22	0,0982
Condensation bilatérale	46	59	0,0640

L'analyse de survie sur les 44 patients pour lesquels la durée de survie était connue a montré que le taux de mortalité à 7 jours était significativement plus élevé parmi les patients PVL+ versus les PVL-, p=0,0031).

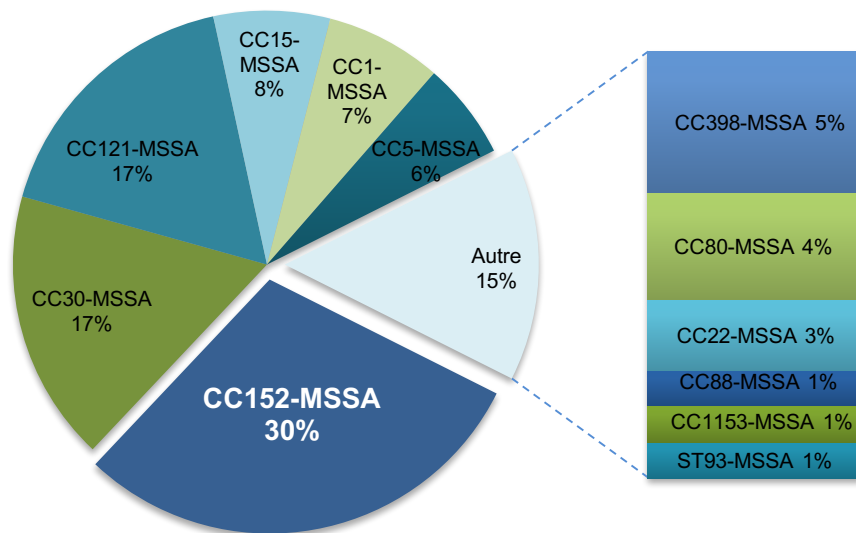


a- Analyse des souches de pneumonies communautaires sévères PVL+ novembre 2010 à décembre 2016

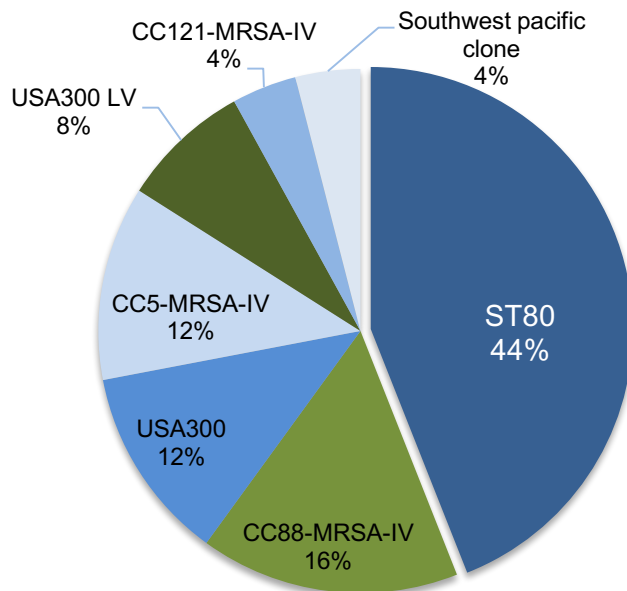
Proportion SARM/SASM



Clones de SASM PVL+



Clones de SARM PVL+



b- Analyse des souches de pneumonies communautaires sévères PVL- (novembre 2010 à décembre 2016)

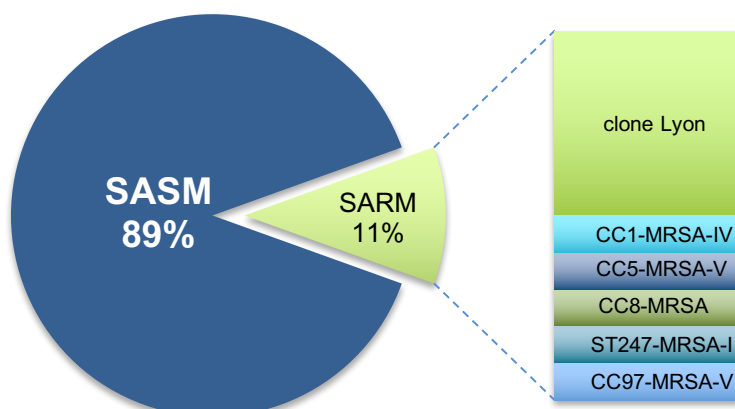


Figure 11- Caractéristiques des souches de *S. aureus* responsables de **pneumonies communautaires sévères** entre novembre 2010 et décembre 2016 (PHRC).

Les résultats préliminaires des souches colligées (Figure 11) montrent la prévalence de la résistance à la méticilline des souches PVL+ (24%) dans la pneumonie nécrosante communautaire. On notera par ailleurs le chiffre de 11% de SARM dans les pneumonies communautaires PVL-. Bien évidemment ces chiffres sont à considérer avec réserve compte tenu de l'effectif et seront affinés à la fin des inclusions du PHRC début 2017.

3.1.3.6. Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Dans le cadre de ses missions, le CNR participe à l'investigation de toxi-infections alimentaires collectives. En 2016, le CNR a été contacté dans le cadre de 5 TIAC mais n'a reçu d'échantillon de vomissure que dans un cas sur cinq. La recherche des entérotoxines A à E s'est avérée négative.

3.1.3.7. Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2011, nous avons expertisé **321 souches d'infections ostéo-articulaires** (59 en 2015 et 85 en 2016 exclus les pieds diabétiques) (Figure 12).

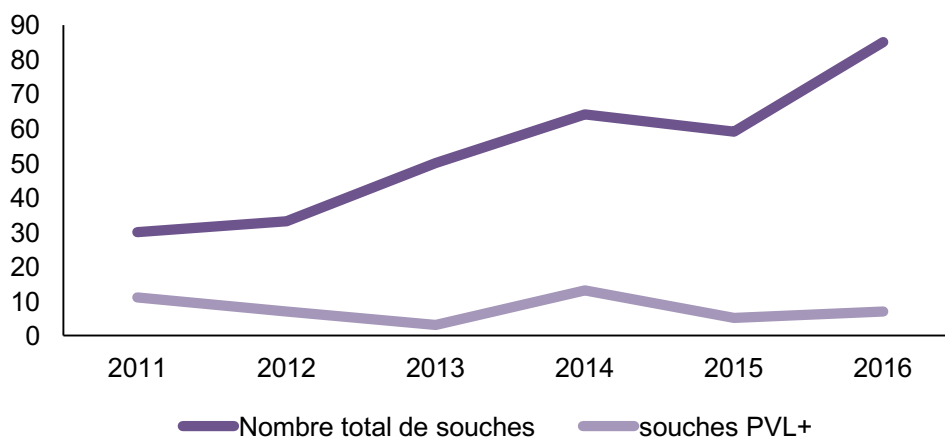


Figure 12- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour **infections ostéo-articulaires** entre 2011 et 2016.

En 2016, nous avons reçu pour expertise **85 souches** de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire, les patients étant âgés de 1 mois à 96 ans (médiane d'âge 51 ans) avec un sexe *ratio* ♂/♀ de 1.9. Treize souches sont des SARM (Figure 13).

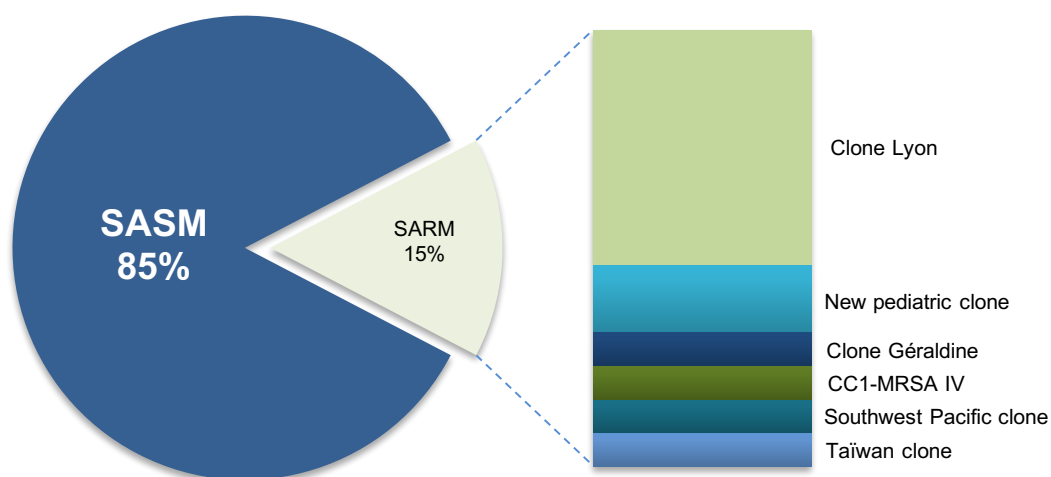


Figure 13- Caractéristiques des souches responsables d'**infections ostéoarticulaires** en 2016 (n=85).

Les tableaux cliniques sont très divers : ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèse,... Sept infections étaient dues à des souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine (5 SASM dont 2 **CC152-MSSA** et 2 SARM avec un Taiwan clone et un Southwest Pacific Clone).

3.1.3.8. Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année 2016, 77 demandes de sérologies anti-PVL (leucocidine de Panton-Valentine) et anti-TSST-1 (toxine du choc staphylococcique) ont été adressées au CNR.

Vingt demandes, en provenance de 11 hôpitaux différents, concernaient **une sérologie**

PVL, dont 16 étaient en lien avec le PHRC Pneumonies Nécrosantes. Le taux de positivité (>4900 UA/mL) était de 25% (n=5/20).

Cinquante-sept sérologies TSST-1 ont été effectuées pour 26 prescripteurs différents. Elles concernaient 39 patients et étaient négatives dans 75% des cas (n=43). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) dans 36 cas (63%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) dans 21 cas (37%).

Les sérums en contexte de **MTSS** étaient séronégatifs pour TSST-1 dans 30 cas sur 36 et très faiblement positifs dans 3 cas (très inférieurs à la valeur de la population générale, ce qui ne permet pas d'écarter une réaction croisée et donc une sérologie faussement positive), soit 92% des cas au total. Les 3 sérums positifs concernaient un suivi à distance de patientes ayant développé un choc menstruel plus d'un an auparavant : cela démontre que certaines patientes peuvent développer des anticorps à long terme même si nous ne savons pas si ces anticorps sont protecteurs. Dix patientes ayant développé un choc toxique menstruel en 2016 ont bénéficié de prélèvements itératifs dans l'année pour recherche de séroconversion ; aucune augmentation d'anticorps n'a été observée chez 9 d'entre elles (90%), en accord avec l'hypothèse selon laquelle les patientes séronégatives ayant développé un MTSS sont séronégatives majoritairement en raison d'une incapacité à développer tout anticorps neutralisant contre la TSST-1. Le seul cas de séroconversion correspondait à une patiente séronégative au moment du choc puis ayant une sérologie faiblement positive trois semaines plus tard.

Les sérums en contexte de **NMTSS** étaient séronégatifs dans 13 cas sur 21 (62%), ce qui est en accord avec les observations précédentes montrant que la séronégativité n'est pas nécessaire au développement d'un NMTSS contrairement au MTSS. Trois patients seulement ont bénéficié de prélèvements itératifs : 2 patients sont restés séronégatifs, tandis que le troisième a présenté une augmentation du titre d'anticorps à la suite de l'épisode de choc toxique.

L'ensemble des demandes émanait de 35 prescripteurs différents situés sur tout le territoire national, principalement des CHU. Ce nombre de prescripteurs est stable par rapport aux années précédentes et montre la diversité des sources et la bonne diffusion de l'information autour de ces sérologies au niveau national.

3.1.3.9. Application du NGS

Nous avons utilisé le NGS dans le cadre de l'investigation d'une micro-épidémie (période juin – septembre 2015) dues à des souches de CC30-MRSA-IV isolées des prélèvements de portage dans le service de néonatalogie du groupement hospitalier Est de Lyon (n=7). Ces souches ont été comparées à : (i) une souche de SARM du même complexe clonal isolée dans la même fenêtre temporelle à partir des hémocultures prélevées chez une fillette hospitalisée dans le service de réanimation pédiatrique mais née quelques mois auparavant dans le même service de néonatalogie, et (ii) une souche de portage du même complexe clonal isolée à Lens dans le service de néonatalogie en juillet 2015 (Communication affichée à la RICAI 2016 de la prise en charge de l'épidémie lyonnaise de CC30-MRSA-IV).

L'analyse par puces d'ADN a identifié les 9 souches comme appartenant à un même fond génétique (pas de différences) autre que la variabilité de 2 toxines (*tst* et *sea*) (Tableau 5).

Tableau 5. Souches MRSA CC30-IV.

ID	Date	city	Unit	Isolation site	ST	MRSA	SCCmec type	tst	sea	peni R	oxa R	sex
ST20151070	02/06/15	Lyon	Paediatric ICU	bacteremia	30	yes	IV	1	1	1	1	F
ST20151101	08/06/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	M
ST20151120	11/06/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	F
ST20151318	01/07/15	Lens	Neoantal ICU	carriage	30	yes	IV	1	0	1	1	F
ST20151396	10/07/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	M
ST20151397	10/07/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	F
ST20151696	20/08/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	F
ST20151850	11/09/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	0	1	1	1	F
ST20151891	21/09/15	Lyon	Neonatal ICU	carriage	30	yes	IV	1	1	1	1	M

Pour déterminer plus précisément les potentiels liens de clonalité, entre les souches des différents services de Lyon et confirmer la possible dissémination à Lens, nous avons utilisé le pipeline Nullarbor et comme génome de référence celui de la souche NM8 (ST30, *tst+* et MSSA ; NCBI Reference Sequence: NZ_CM000952.1). Cette souche MSSA *tst+* est le clone ancestral des souches CC30 *tst+* qui ont ensuite acquis une cassette SCCmec du type IV⁵.

Plus de 95 % de bases ont été alignées sur le génome de référence (pour toutes les souches) et un total de 1895 SNP ont été trouvés dans le *core*-génome. La phylogénie basée sur ces SNPs a montré qu'une population clonale (maximum de 11 SNPs entre les souches) de CC30-MRSA-IV *sea+* et *tst+/-* était présente dans le service de réanimation néonatale mais qu'elle n'avait pas disséminée dans d'autres services ni ailleurs en France (Figure 14). La distance, en SNPs, entre les souches de Réanimation néonatale de Lyon et la souche du service de Pédiatrie de Lyon est de 840 SNP et 1132 SNP avec la souche de Lens.

L'absence du gène *tst* dans une des souches isolées dans le service réanimation néonatale, détectée par les puces d'ADN, est confirmée par NGS. Après un alignement des génomes, on a pu détecter une délétion de 8 gènes, au sein de l'îlot de pathogénicité SaPI1 qui porte le gène codant la TSST-1, dans la souche de réanimation néonatale de Lyon *tst-*. Dans ces 8 gènes délétés, on trouve aussi le gène d'une intégrase/transposase d'un transposon Tn916. On peut déduire que, pour cette souche, il a eu un événement de recombinaison dans l'îlot SaPI1 pendant la période d'épidémie (juin-septembre 2015).

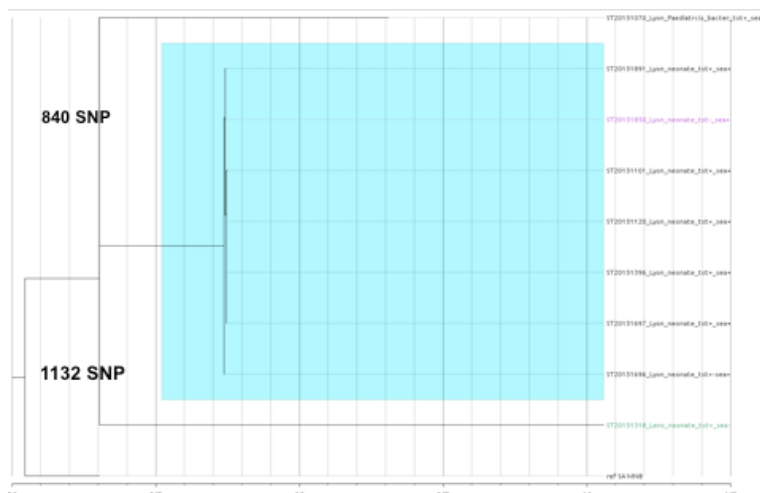


Figure 14. Phylogénie basée sur 1895 SNPs du *core*-génome des souches CC30-MRSA-IV. La souche de Lens est en vert, la souche de réanimation néonatale de Lyon *tst-* est indiqué en violet. La population clonale identifiée (distance maximale entre souches = 11 SNPs) dans le service de réanimation néonatale est indiquée par le carré grand bleu.

⁵ McAdam PR et al. Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 5;109(23):9107-12.

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

3.2.1. Définition de l'échantillon de souches testées

Au total, **347 souches** ont été adressées au CNR en 2016 pour expertise sur la résistance aux anti-infectieux, en provenance de 158 laboratoires et/ou prescripteurs différents. Ceci représente une **augmentation de 28,5% par rapport à l'année 2015** (270 souches) (Figure 15). Cette augmentation des demandes de détermination de la sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques s'explique par plusieurs phénomènes :

- l'émergence de souches de staphylocoques multirésistantes offrant des options thérapeutiques réduites,

- la mise sur le marché récente de nouvelles molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole ou le tédizolide pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des moyens pour tester la sensibilité des souches de staphylocoques,

- mais surtout les modifications importantes depuis 2015 des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie qui ont été harmonisées avec celles de l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (CA-SFM/EUCAST), entraînant une hausse des demandes d'expertise et de conseils sur la réalisation et l'interprétation des différents tests décrits par le CA-SFM/EUCAST notamment pour la détermination de la sensibilité aux glycopeptides.

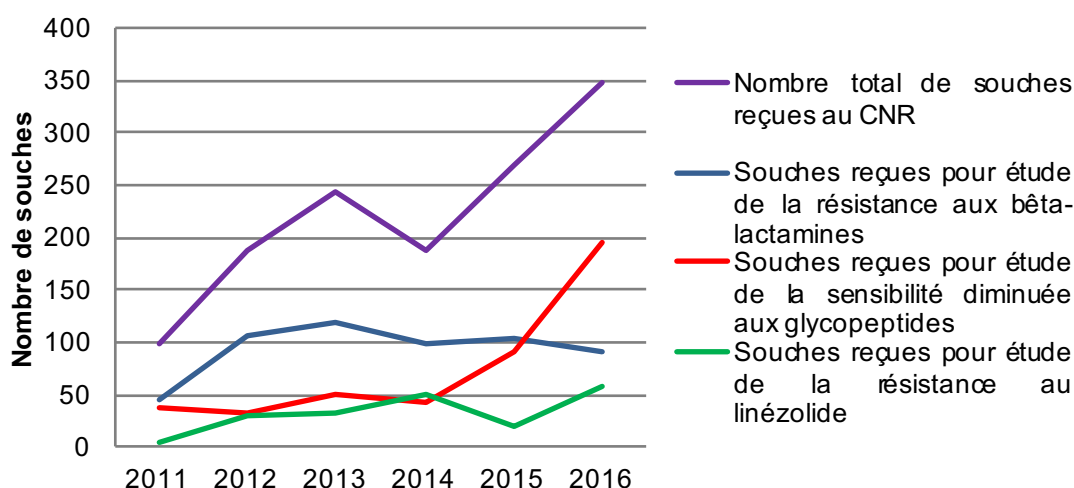


Figure 15 – Souches reçues au CNR pour expertise de la **résistance aux antibiotiques** entre 2011 et 2016.

En 2016, les souches expertisées au CNR pour la résistance comprenaient 340 demandes extérieures et 7 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon. Sur ces 347 demandes, 196 concernaient la seule résistance aux glycopeptides. La répartition de ces souches par espèce est décrite dans le tableau 6.

Tableau 6– Répartition selon l'espèce des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques en 2016.

Espèce	Nombre de souches reçues (%)
<i>S. aureus</i>	204 (58,8)
<i>S. capitis</i>	8 (2,3)
<i>S. cohnii</i>	1 (0,3)
<i>S. epidermidis</i>	94 (27,1)
<i>S. haemolyticus</i>	17 (4,9)
<i>S. hominis</i>	6 (1,7)
<i>S. lugdunensis</i>	7 (2,0)
<i>S. pettenkoferi</i>	3 (0,9)
<i>S. saprophyticus</i>	7 (2,0)
Total	347

En plus des demandes extérieures, toutes les souches de *S. aureus* isolées chez des patients mucoviscidosiques aux Hospices Civils de Lyon sont conservées au CNR pour vérification de la sensibilité aux glycopeptides ou réalisation de l'antibiogramme lorsque les souches montrent une croissance difficile (78 souches pour l'année 2016).

3.2.2. Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Les souches sont catégorisées phénotypiquement sensibles, intermédiaires ou résistantes aux divers anti-infectieux testés en appliquant les concentrations critiques établies dans le communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2016 (CA-SFM/EUCAST).

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

Les techniques utilisées au CNR sont détaillées en Annexe2

3.2.3. Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances

3.2.3.1. Résistance aux bêta-lactamines

Les PCR *mecA* et *mecC* sont réalisées systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR. Le CNR est également spécifiquement sollicité sur la base de problèmes concernant la détection/confirmation de la résistance aux bêta-lactamines, principalement la résistance à la méticilline. En 2016, **91 souches** ont été étudiées dans ce contexte : 66 *S. aureus* et 25 staphylocoques à coagulase négative. Pour 89 souches, il s'agissait d'une demande de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline et pour 2 souches, une demande de confirmation de la sensibilité/résistance à la pénicilline.

Les **2 souches** reçues pour recherche de pénicillinase étaient une souche de *S. aureus* et une souche de *S. epidermidis*. Les 2 souches étaient négatives pour les gènes *mecA/C* mais positives pour la production de pénicillinase et donc rendues résistantes à la pénicilline G (une était positive par le test chromogénique de la Céfinase® après induction par une bêta-

lactamine et l'autre présentait une zone d'inhibition autour du disque de pénicilline G avec une bordure nette signant la production d'une pénicillinase).

Les 89 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient **65 souches de *S. aureus*** et **24 souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN)**.

Au final, 29 souches de *S. aureus* étaient porteuses du gène *mecA*, 6 souches porteuses du gène *mecC* et 30 souches ne possédaient pas de gène *mec*. Il s'agissait de :

- **36 souches** de *S. aureus* pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence ou absence de gène de type *mec*. Il s'agissait en général de i) confirmation de la méticillino-résistance pour des souches exprimant la résistance à l'oxacilline de manière hétérogène ou, ii) de confirmation de la sensibilité à la méticilline pour des souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la CMI oxacilline ou le diamètre de la céfoxitine était intermédiaire ou proche des valeurs critiques, ou pour des souches avec des profils de résistance moins habituels (souches phénotypiquement sensibles à la méticilline mais multirésistantes aux autres antibiotiques, ou résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones et/ou macrolides). Sur ces 36 souches, 10 possédaient le gène *mecA* et les 26 autres ne possédaient aucun gène *mec*. Cependant, trois souches de *S. aureus* *mec*-négatives avaient une CMI oxacilline > 2 mg/L (catégorisée résistant) et ont donc été rendues résistantes à la méticilline (possible mécanisme de résistance par hyperproduction de la pénicillinase ou par modification des PLP naturelles de *S. aureus*) ;

- **24 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) : six de ces souches se sont révélées porteuses du gène *mecC*. Sur les 18 autres souches, 17 étaient porteuses du gène *mecA*, confirmant qu'il s'agit bien du gène le plus fréquemment associé à un phénotype de résistance à la méticilline et une souche ne possédait aucun gène *mec*. Les six souches *mecC*-positives avaient été isolées à Niort, Villejuif, Metz, Colmar et Montpellier (n=2). Les six patients étaient tous des hommes, âgés de plus de 50 ans pour cinq d'entre eux. Les six souches appartenaient au complexe clonal CC130 et aux *spa*-types t843 (n=2), t3256 (n=2), t1048 et t5771 ;

- **une souche** de *S. aureus* isolée chez un patient présentant un échec de traitement par la céfazoline : cette souche ne possédait aucun gène *mec* ;

- **une souche** isolée chez un patient ayant des antécédents de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) : elle ne possédait aucun gène *mec* et a donc été confirmée sensible à la méticilline ;

- **une souche** phénotypiquement sensible à la méticilline par la méthode de diffusion mais trouvée PLP2a-positif par technique immunochromatographique par le laboratoire expéditeur : elle ne possédait aucun gène *mec* et a donc été confirmée sensible à la méticilline ;

- **deux souches** de *S. aureus* donnant des résultats incohérents avec le système de biologie moléculaire GenXpert® (Cepheid) :

- une souche négative pour le gène *mec* mais positive pour la jonction SCC*mec* en GenXpert®, phénotypiquement sensible à la méticilline. Cette souche a été confirmée sensible à la méticilline au CNR (absence de gène *mec*) et aucun fragment de cassette SCC*mec* n'a été détecté dans cette souche par analyse par puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping ® (Alere technologies). La détection faussement positive de la jonction SCC pourrait s'expliquer par une micro-contamination de la

souche par un staphylocoque à coagulase négative porteur d'une cassette SCC au moment de la réalisation du GenXpert ;

- une souche positive pour le gène *mec* mais négative pour la jonction SCC*mec* en GenXpert, phénotypiquement résistante à la méticilline. Les PCR *mecA* et *mecC* réalisées au CNR se sont avérées positives pour *mecA* et l'étude de la souche par la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere technologies) a détecté les différents éléments d'une cassette SCC*mec* de type V classique.

Parmi les 24 souches de staphylocoques à coagulase négative expertisées, 11 étaient porteuses du gène *mecA*. Les souches reçues comprenaient :

- **10 souches** de *S. saprophyticus* et *S. lugdunensis*. Les souches de *S. saprophyticus* et *S. lugdunensis* ont fréquemment des CMI catégorisées intermédiaires pour l'oxacilline et la céfoxitine car ces espèces ont naturellement des CMI pour les bêta-lactamines plus élevées que les autres espèces de staphylocoques mais les souches véritablement résistantes à la méticilline avec présence du gène *mecA* sont rares. Comme recommandé dans le CA-SFM, lorsque les diamètres ou les CMI céfoxitine ou oxacilline rendent un résultat intermédiaire pour ces espèces, il est nécessaire de confirmer la présence d'une PLP additionnelle ou d'un gène *mec*. C'est dans ce contexte que nous avons reçu ces souches : six souches sur 10 étaient positives en PCR *mecA* et les 4 autres étaient négatives pour *mecA* et *mecC* et donc sensibles à la méticilline.

- **14 souches** de staphylocoques à coagulase négative appartenant à d'autres espèces (*S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pettenkoferi*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : cinq étaient *mecA*-positives et donc résistantes à la méticilline.

A noter, trois souches (deux *S. pettenkoferi* et un *S. cohnii*) ne possédaient ni le gène *mecA* ni le gène *mecC* mais présentaient une CMI > 0,25 mg/L pour l'oxacilline (catégorisée intermédiaire pour les staphylocoques à coagulase négative) et ont donc été rendues résistantes à la méticilline.

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

En 2016, l'étude de la sensibilité aux glycopeptides a été effectuée pour **196 souches de staphylocoques** de laboratoires extérieurs (126 *S. aureus* et 70 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié par des CMI élevées aux glycopeptides (> 1mg/L) ou un test de dépistage des hGISA (heterogeneous glycopeptide intermediate *S. aureus*) positif (le plus souvent le test Teico5). Les nouvelles recommandations du CA-SFM / EUCAST ont abaissé depuis 2015 les CMI à partir desquelles cette recherche doit être effectuée, ce qui est probablement à l'origine de l'augmentation du nombre de demandes reçues.

Sur les **126 souches de *S. aureus*** reçues dans ce contexte, vingt-six souches ont été confirmées comme présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides, la confirmation n'étant possible que par une analyse de population (APOP) qui constitue la méthode de référence recommandée par le CA-SFM / EUCAST. Sur les 26 souches confirmées hGISA, sept étaient également résistantes à la daptomycine. Quatre-vingt-douze souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage. En raison de l'afflux important de demandes, la recherche de GISA n'a pas été réalisée sur certaines souches de

S. aureus sensibles à la méticilline (n=8) puisque dans ce cas, les infections ne sont pas traitées par glycopeptides et donc la recherche de hGISA ne présente pas d'intérêt clinique. Parmi les 92 souches non GISA, 29 présentaient une CMI vancomycine $\geq 1,5$ mg/L, seuil au-dessus duquel le risque d'échec thérapeutique a été décrit comme plus élevé dans la littérature. Dans ce contexte, il convient de déconseiller l'utilisation de glycopeptides sur ces souches même si elles ne répondent pas aux critères retenus pour définir les GISA ou hGISA. Une souche de *S. aureus* présentait une CMI teicoplanine > 2 mg/L (3 mg/L, catégorisée résistante) sans présenter les critères retenus par le CA-SFM pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type GISA par les tests de screening et de confirmation.

Par ailleurs, **au sein des Hospices Civils de Lyon**, la détection de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides est effectuée systématiquement par le CNR sur les souches de SARM de patients atteints de mucoviscidose car il s'agit de patients à risque de sélectionner une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Pour les treize enfants atteints de mucoviscidose qui ont été détectés porteurs de SARM en 2016, aucune souche n'a été retrouvée de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Concernant les **staphylocoques à coagulase négative**, **70 souches** ont été adressées au CNR en 2016 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides. Ceci représente une augmentation importante du nombre de demandes (seulement 44 en 2015) alors que le CA-SFM recommandait en 2016 uniquement de réaliser la mesure de la CMI par bandelette en gradient avec un inoculum de 0,5 McF, les analyses complémentaires (type APOP) n'étant pas validées pour les SCN. Il faut noter que sur ces 70 souches, trois avaient été identifiées comme *S. aureus* par les laboratoires expéditeurs alors qu'il s'agissait en réalité de *S. haemolyticus* : de ce fait, la recherche de sensibilité diminuée n'a pas été réalisée car elle ne présentait pas d'intérêt clinique. Sur les 67 autres souches, 32 étaient résistantes à la teicoplanine par E-test (CMI > 4 mg/L). Sur ces 32 souches, 11 étaient également résistantes à la vancomycine (CMI > 2 mg/L), trois à la daptomycine et cinq au linézolide.

3.2.3.3. Détection de la résistance au linézolide

Le linézolide appartient à la famille des oxazolidinones et constitue une alternative thérapeutique à l'utilisation des glycopeptides pour le traitement des infections à SARM. Il est aussi de plus en plus souvent utilisé en première intention en réanimation chez certains patients fragiles en cas de suspicion d'infection à SASM/SARM. La résistance aux oxazolidinones est liée soit :

- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *cfrA* ou *B*** (chloramphenicol-florfenicol resistance) qui codent des méthyltransferases de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S, méthylations qui masquent la cible de cette famille de molécules,
- à l'acquisition du **gène plasmidique *optrA*** qui code un ABC transporteur conférant des hauts niveaux de résistance au linézolide et dont le mécanisme précis d'action reste encore inconnu,
- à des **mutations du gène codant l'ARNr 23S** entraînant un changement de conformation et une perte d'affinité du linézolide,
- à des **mutations des gènes codant les protéines ribosomales L3 et L4** modifiant l'accessibilité au site de fixation du linézolide sur l'ARNr 23S.

En 2016, le CNR a expertisé **58 souches de staphylocoques** pour lequel le laboratoire expéditeur avait déterminé une CMI augmentée pour le linézolide. Quarante-neuf souches

ont été confirmées résistantes au linézolide (CMI > 4 mg/L) : il s'agissait de 6 *S. aureus*, 42 *S. epidermidis* et 1 *S. hominis*.

S. aureus

Les six souches de *S. aureus* résistantes au linézolide étaient résistantes à la méticilline pour quatre d'entre elles et avaient été isolées dans quatre villes différentes : Nantes (n=2), Saint-Mandé (n=2 mais provenant de la même patiente), Fréjus (n=1) et Clermont-Ferrand (n=1). Trois provenaient de prélèvements cutanés, deux d'hémocultures et une d'un prélèvement ostéo-articulaire. Les deux souches isolées à Nantes portaient le gène transférable *cfr* alors que les 4 autres souches étaient négatives pour ce gène. Il est à signaler que la première souche de *S. aureus cfr*-positive a été décrite au CNR en 2015, elle avait également été isolée au CHU de Nantes. Cette résistance par production de méthyltransférase n'était pas associée à une mutation de l'ARNr 23S et conférait à ces deux souches une résistance de bas niveau (CMI 6 et 8 mg/L). Cependant, l'apparition de telles souches est inquiétante car la position plasmidique du gène entraîne un risque accru de transmission horizontale et de dissémination. Parmi les quatre souches *cfr*-négatives, seule une présentait une mutation de l'ARNr 23S (G/2576/T, la mutation la plus fréquente) ; les trois autres souches ne présentaient pas de mutations et avaient une CMI modérément élevée au linézolide (6 à 8 mg/L).

Staphylocoques à coagulase négative

Les 43 souches de SCN résistantes au linézolide appartenait à deux espèces : *S. epidermidis* (n=42) et *S. hominis* (n=1).

La souche de *S. hominis* provenait de l'hôpital de Bayonne. Elle présentait une mutation de l'ARNr 23S (G/2576/T) et ne possédait pas le gène *cfr*.

Les 42 souches de *S. epidermidis* étaient toutes résistantes à la méticilline et avaient été isolées dans 11 hôpitaux différents (dont 16 souches à l'hôpital Tenon à Paris, 9 souches à Toulon, 7 souches à Nantes, 2 souches à Amiens et 2 souches à Neuilly-sur-Seine). Les souches isolées à l'hôpital Tenon présentaient toutes la mutation G/2576/T au niveau de l'ARNr 23S et ne possédaient pas le gène *cfr* ; leur analyse par électrophorèse en champ pulsé a montré que ces souches possédaient un profil similaire indiquant un lien de clonalité. Les souches isolées à Toulon présentaient pour sept d'entre elles la mutation G/2576/T et ne possédaient pas le gène *cfr* ; leur analyse en électrophorèse en champ pulsé a montré que ces souches possédaient un profil similaire indiquant un lien de clonalité. Les sept souches de Nantes présentaient toutes également la mutation G/2576/T mais quatre d'entre elles possédaient également le gène transférable *cfr*. Les 10 autres souches isolées dans huit autres hôpitaux portaient également toutes la mutation G/2576/T et quatre d'entre elles possédaient en plus le gène *cfr*.

Ces données nous confirment que la mutation majeure retrouvée en France est la mutation G/2576/T et nous indiquent une augmentation des souches *cfr* positives (seulement 3 détectées en 2015). L'analyse par séquençage du génome complet de chacune de ces souches est en cours afin de déterminer si le support plasmidique portant le gène *cfr* dans ces souches est le même ou non.

La prévalence de la résistance a longtemps été faible en France mais l'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes (Figure 16). Elles sont de moins en moins rares (et probablement sous diagnostiquées car le linézolide n'est pas systématiquement testé et les résistances de bas niveau mal détectées) ; elles sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations sur l'ARNr 23S mais ces souches ont été responsables de plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières (Toulouse, Bayonne). De façon plus inquiétante, nous observons une augmentation du nombre de souches porteuses du gène *cfrA*. Cette résistance plasmidique à fort potentiel de transmission et de dissémination incite

donc à renforcer la surveillance du niveau de sensibilité au linézolide et plus généralement aux molécules de la famille des oxazolidinones. La prévalence réelle des souches de *S. aureus* et de SCN résistantes au linézolide en France reste à ce jour inconnue. Une étude de prévalence de la résistance aux oxazolidinones au niveau national apparaît nécessaire et fait partie des projets du CNR pour la période 2017-2020, ce d'autant plus que vient d'être commercialisée une nouvelle molécule au sein de la famille des oxazolidinones (tédizolide) et que la forme IV du linézolide a été génériquée avec une baisse très forte du prix, ce qui va sans aucun doute conduire à une augmentation de la prescription. Concernant le gène *cfr*, 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.

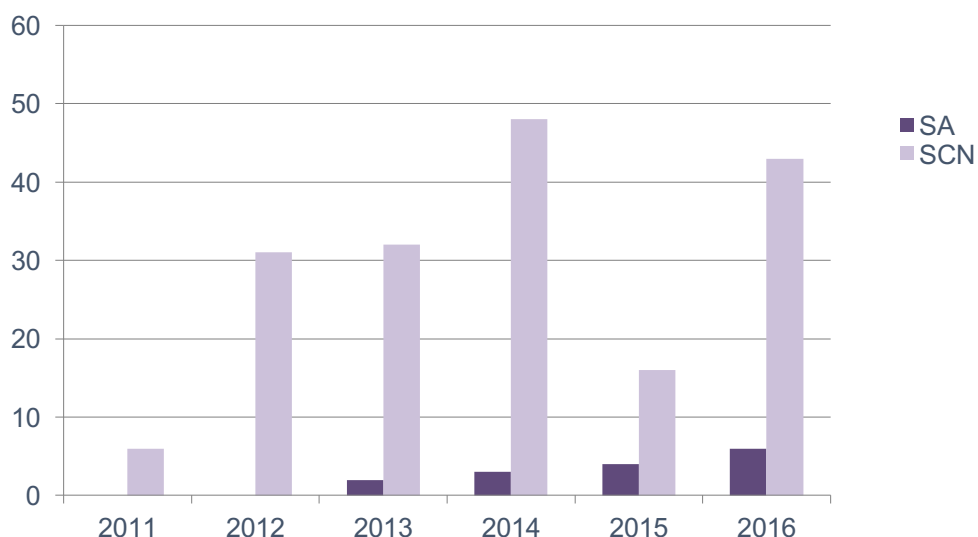


Figure 16. Nombre de souches de staphylocoques **résistants au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2016.

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

3.2.3.4. Détection de la résistance à la daptomycine

La daptomycine est un lipoglycopeptide, dont la concentration critique a été fixée à 1 mg/L par le CA-SFM / EUCAST. La daptomycine constitue une alternative pour le traitement des infections à SARM, notamment lorsque l'infection est associée à une prothèse ou cathéter, du fait de son efficacité à l'intérieur du biofilm. Depuis 2013, le CNR reçoit des souches de staphylocoques pour confirmation de la résistance à la daptomycine ou détermination de sa CMI.

En 2016, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **39 souches de staphylocoques** (21 *S. aureus* et 18 staphylocoques à coagulase négative), le plus souvent car ces souches avaient été trouvées résistantes à la daptomycine ou parce que le laboratoire ne disposait pas de moyens pour tester la sensibilité de la souche à cet antibiotique.

Sur les 21 *S. aureus*, 12 souches étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 3 mg/L. Sept de ces 12 souches provenaient d'hémocultures dont deux dans un contexte d'endocardite infectieuse, trois de prélèvements cutanés, une d'un prélèvement ostéo-articulaire et une d'un prélèvement vaginal. Dix de ces souches étaient des SARM et cinq présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides concomitante. Le séquençage du gène *mprf* a été réalisé pour 10 de ces souches : pour neuf souches, des mutations non-

synonymes ont été retrouvées mais leur rôle exact dans la résistance est encore mal connu. Sur les 18 souches de SCN testées, six étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 4 mg/L. Quatre de ces souches étaient également résistantes aux glycopeptides (teicoplanine et vancomycine).

3.2.3.5. Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole

La ceftaroline est une céphalosporine récemment mise sur le marché (mars 2013) qui présente un spectre d'activité original incluant les souches de staphylocoques résistantes à la méticilline. La concentration critique a été fixée à 1 mg/L. En 2016, le CA-SFM a proposé des diamètres critiques (19 et 21 mm) avec un inoculum de 0,5 McF et un disque chargé à 5 µg. Néanmoins les données sont limitées concernant à la fois ce diamètre critique et le niveau de sensibilité des souches de SARM résistants à la ceftaroline en France.

En 2016, la détermination de la CMI ceftaroline a été demandée pour **trois souches de *S. aureus*** résistantes à la méticilline (toutes étaient sensibles, avec des CMI entre 0,38 et 1 mg/L) et **3 souches de *S. epidermidis*** résistantes à la méticilline (toutes étaient sensibles, avec des CMI entre 0,25 et 0,38 mg/L). Pour une des souches de SARM, était également demandée la détermination de la CMI du ceftobiprole, une autre céphalosporine active sur les SARM : la souche était également sensible au ceftobiprole (CMI 0,75 mg/L).

3.2.3.6. Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux

Le CNR est également amené à recevoir occasionnellement des souches pour vérifier la sensibilité ou détecter des mécanismes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques comme les macrolides pour lesquels le phénotype observé peut être mis en relation avec plusieurs gènes de résistance aux macrolides détectés par la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping ® (Alere technologies) utilisée au CNR. Le CNR dispose pour ces demandes de l'ensemble du panel de bandelettes E-tests permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococques utilisés en thérapeutique.

Une souche de *S. aureus* a été reçue car elle présentait une résistance isolée à la **pristinamycine** sans résistance associée aux autres macrolides. Au CNR, la souche était phénotypiquement intermédiaire à la lincomycine (CMI 8 mg/L), résistante à la pristinamycine (CMI 4 mg/L) et intermédiaire à la quinupristine-dalfopristine (CMI 1,5 mg/L). La souche a été génotypée au moyen de la puce à ADN *S. aureus* genotyping kit 2.0 (Alere technologies) : elle possédait le gène *vgaA* associé à un mécanisme d'efflux expliquant ce profil de résistance.

Une souche de *S. aureus* a été reçue car elle présentait un phénotype de résistance aux **aminosides** inhabituel (résistante à la tobramycine, sensible à la kanamycine et la gentamicine). Au CNR, la souche était phénotypiquement sensible à tous les aminosides.

Deux souches de *S. aureus* ont été envoyées pour recherche d'une résistance à la **chlorhexidine**. Leur génotypage par puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping ® (Alere technologies) a montré qu'elles ne possédaient pas les gènes d'efflux *qacABC* et étaient donc a priori sensibles à la chlorhexidine.

Deux souches de *S. aureus* ont été reçues pour détermination de la CMI **fosfomycine**. La première souche était sensible. La deuxième souche présentait une discordance entre le résultat Vitek2® (résistant) et la CMI E-test (sensible), la même discordance a été retrouvée au CNR.

Une souche de *S. epidermidis* a été reçue car elle présentait une croissance difficile et

l'antibiogramme n'était pas réalisable dans les conditions usuelles. Il a été réalisé au CNR sur gélose contenant du sang afin de faciliter la croissance des souches déficientes.

3.2.4. Analyse des tendances

Globalement on observe une très nette augmentation du nombre de souches reçues pour la vérification de la sensibilité aux glycopeptides probablement dues aux changements des recommandations faites par le CA-SFM depuis 2015 et une augmentation du nombre de souches reçues pour la résistance à certains antibiotiques de recours comme le linézolide ou la daptomycine. Pour le Linezolid, cette augmentation est d'autant plus inquiétante qu'elle implique de plus en plus souvent un mécanisme à support plasmidique dont on peut redouter, à l'avenir, le caractère épidémique.

3.3. Participation aux réseaux de surveillance

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune). **Se reporter au chapitre 3.4 « la contribution à l'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 (ColBHV, Probioqual, EARSS-Staph, etc.). Les objectifs sont, dans le cadre d'échanges réciproques : (i) de fournir une aide technique et un accès aux outils développés ou disponibles au CNR pour les études initiées par les différents réseaux, (ii) d'avoir accès à des panels de souches représentatives des clones circulants et/ou de formes cliniques spécifiques étudiées, (iii) de disposer et de fournir des données de prévalence, de virulence, de résistance aux membres des réseaux et plus largement aux autorités de santé, (iv) de pouvoir comparer les données issues des différents réseaux entre eux et avec ceux d'autres pays européens.

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

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

3.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- SURVEILLANCE EN SANTE HUMAINE

PHRC « Pneumopathie nécrosante »

Collaboration : CNR des staphylocoques – CHU et CHG Français dans le cadre d'un PHRC coordonné par le Pr François Vandenesch - laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, faculté Necker, Paris.

Voir chapitre 3.1.3.5. (Annexe 3)

Impact du microbiote vaginal sur le développement du choc toxique staphylococcique menstruel

Collaboration : CNR des staphylocoques, UMR CNRS 5557 et UMR CNRS 5558 - LBBE "Biométrie et Biologie Évolutive" / Equipe Bioinformatique et Génomique Evolutive, Soixante-dix pour cent des femmes utilisent des tampons et 1 à 4% présentent une colonisation vaginale par une souche de *S. aureus* productrice de la toxine TSST-1. Cependant, seule une faible proportion des patientes colonisées développe un choc toxique staphylococcique menstruel (CTSm) suggérant l'implication d'autres facteurs. L'hypothèse est que la composition du microbiote vaginal durant les règles a une influence sur l'écologie et la virulence de *S. aureus* TSST-1+ en contrôlant sa croissance et/ou la production de TSST-1. Le but de cette étude est de comparer la composition du microbiote vaginal au cours des règles entre différents groupes de femmes (femmes saines et femmes avec antécédents de CTSm). Une collecte de tampons en conditions habituelles d'utilisation de femmes saines et des auto-écouvillonnages de patientes présentant des antécédents de CTSm ont été réalisés. Ces prélèvements ont été soumis à un dépistage de *S. aureus* et le microbiote vaginal associé a été étudié par une approche de culturomique. Les résultats montrent que 26% des femmes saines (138 prélèvements) contre 38% des femmes avec antécédents de CTSm (44 prélèvements) présentent une colonisation vaginale par *S. aureus*, correspondant à 4% et 24% de colonisation par une souche productrice de TSST-1. La composition du microbiote vaginal diffère entre les femmes qui portent ou non du *S. aureus* ($p = 0.028$). Les surnageants de culture des microorganismes les plus discriminants ont été utilisés afin d'en étudier l'impact sur la croissance de 3 souches de *S. aureus* issues de 3 complexes clonaux différents, ainsi que sur la production de TSST-1(ELISA). La croissance de *S. aureus* est inhibée dans les surnageants de culture de *Lactobacillus casei/paracasei*, *Propionibacterium acnes* et *Streptococcus mitis/oralis*. La production de toxine varie en fonction du surnageant et de la souche de *S. aureus* testée. Cependant, le surnageant de culture de *Streptococcus mitis/oralis* augmente jusqu'à 25 fois la production de TSST-1 par les 3 souches de *S. aureus*. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle du microbiote dans le portage vaginal de *S. aureus*, la première étape dans le développement du CTSm et dans la production de la TSST-1.

Etude «Moran-like» : Prévalence des SARM communautaires dans les infections de la peau et des tissus mous (SSTI) parmi les patients se présentant aux services des urgences : une étude pilote prospective multicentrique européenne.

Collaboration : CNR des staphylocoques - *Staphylococcus* Reference Service, Public Health England, London, UK - National Reference Laboratory for Staphylococci, University of Patras, Patras, Greece - Laboratory of Clinical Microbiology and Virology, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy - Cantacuzino National Institute of Research, Bucharest, Romania - Servei de Microbiologia Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain - University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany - ESCMID Study Group on

Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS).

Les SSTIs représentent l'une des causes les plus fréquentes de consultation des services des urgences des établissements de santé. Des études réalisées aux Etats Unis ont montré que la forte prévalence d'infection à SARM des SSTIs est plutôt liée au clone USA300. En Europe, différents taux de SARM ont été rapportés allant de 0,9 % aux Pays-Bas, à 14,5 % en France et 30,7 % en Grèce. 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 notamment pour les lésions folliculaires (primitives) comme les folliculites et les furoncles. 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. Afin d'évaluer la faisabilité d'une telle étude, une étude pilote basée sur 7 centres dans 7 pays européens (Angleterre, Allemagne, Espagne, France, Grèce, Italie, Roumanie) a été réalisée en 2015 et finalisée en 2016 avec publication début 2017⁶. L'analyse des souches isolées de 205 patients sur une période de 3 mois a révélé un gradient croissant de résistance à la méticilline selon un axe Nord-Sud avec une prévalence de 7% pour le CHU français. Les clones de SARM présentaient une large diversité avec une quasi absence du clone USA300 à l'exception d'un patient recruté dans le centre Espagnol, ayant présenté une infection avec une souche du variant sud-américain (CC8-MRSA [PVL+] USA300-LV).

- SURVEILLANCE EN SANTE ANIMALE

voir paragraphe 7

4. Alerte

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

Des liens étroits ont été tissés depuis de nombreuses années entre les membres du CNR des Staphylocoques et Santé Publique France. L'émergence de tout phénomène anormal dans les domaines cliniques (formes cliniques atypiques), épidémiologiques (cas groupés : épidémie d'infections avec le clone de SARM-C USA300, épidémie d'infections à SASM PVL+ dans un foyer d'hébergement, épidémies dans des collectivités (services de néonatalogie, prisons, services cliniques...)) ou microbiologiques (détection de nouveaux clones, augmentation de prévalence de certains clones) a fait l'objet d'une information auprès de nos correspondants de Santé Publique France par contacts téléphoniques directs ou par mail. Dès la détection de tout phénomène anormal, un contact par mail ou téléphonique est immédiatement établi avec nos correspondants de Santé Publique France avec une mise en place d'une cellule d'aide à la décision à laquelle peuvent participer selon les situations, l'ARS, la Cire, Santé Publique France – DMI (Direction des maladies infectieuses), le CNR, l'ArIn/Cclin et les EOH, des praticiens locaux (infectiologues,

⁶ Bouchiat C *et al.* I. (2017). MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), 372–375.

biologistes, hygiénistes, pédiatres, dermatologues, gériatres, médecins généralistes,...).

L'implication de Santé Publique France dans l'organisation du colloque biennial SympoStaph constitue aussi une illustration des interactions étroites qui existent entre les deux partenaires autour de la thématique des infections staphylococciques.

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

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

(i) de surveiller et de suivre les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches de SASM et de SARM circulants en France,

(ii) d'alerter Santé Publique France sur l'apparition de possibles cas groupés à partir des informations transmises au CNR et/ou des souches qui lui sont adressées,

(iii) de détecter l'apparition de nouveaux clones présentant des facteurs de virulence ou des résistances aux antibiotiques particuliers,

(iv) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones de SARM communautaires,

(v) d'aider à la mise en place de mesures de contrôle des phénomènes épidémiques

(vi) d'apporter son expertise dans les prises de décisions dans la gestion au niveau national des infections staphylococciques (dépistage, recommandations prophylaxie/traitements...)

(vii) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones animaux de SARM et leur diffusion chez l'homme.

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

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

Depuis 2011, le CNR en lien avec Santé Publique France a participé à l'investigation d'infections à SASM ou SARM dans différents services de néonatalogie en France (Bordeaux, Limoges, Epinal, Lens, Arras, Mulhouse, Le Mans, Centre Hospitalier Sud Francilien, Lyon, Chambéry). Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2017. L'origine de ces souches n'a pas été identifiée. Il est surprenant de voir que dans le cadre d'infections liées aux soins, ce n'est pas un clone nosocomial comme le clone Lyon qui est responsable de ces infections mais comme dans le cas du clone Géraldine retrouvé à Bordeaux, Lens, Limoges, Arras et Epinal, un clone à la fois communautaire et nosocomial. Au cours de ces épisodes épidémiques, si des infections ont été identifiées, c'est surtout une augmentation du portage à *S. aureus* dans ces services qui ont nécessité les bio nettoyages des services avec décontamination des personnels après ou sans dépistage préalable.

Clone Géraldine. Depuis 2011, le CNR a participé à la détection et l'investigation d'épidémies à SARM (clone Géraldine) dans les services de Néonatalogie de Bordeaux⁷, de

⁷ Leroyer C et al. (2016). Outbreak in newborns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the sequence type 5 Geraldine clone. Am J Infect Control. Feb;44(2):e9-11.

Limoges⁸, et d'Epinal et a poursuivi en 2016 avec l'investigation des services de néonatalogie de Lens et d'Arras.

CC1-MRSA-IV. En 2016, le CNR a également participé à l'investigation des épidémies des services de néonatalogie du Mans (20 souches) et de Mulhouse (10 souches). Concernant l'épidémie du Mans, des dépistages de soignants ont été effectués. Cette épidémie se poursuivait début 2017. Le clone responsable des épidémies dans ces deux services n'est que très faiblement représenté dans la biothèque du CNR avec quelques cas sporadiques d'infections communautaires. Il faudra surveiller ce clone dans les années à venir.

CC5-MRSA-IV, Paediatric clone. En 2016, le CNR a également expertisé 28 souches dans un contexte d'épidémie dans le service de néonatalogie de Corbeil Essonnes. Les souches appartenaient cette fois-ci à un clone nosocomial classiquement retrouvé en France qui est le *Paediatric clone* producteur de la toxine du choc toxique staphylococcique.

SASM. Une augmentation de la prévalence du portage et du nombre de cas d'infections à SASM a été signalée dans le service de néonatalogie de Cayenne en 2016. Nous avons reçu 35 souches de SASM (7 d'infections et 28 de portage) et deux souches de portage de SARM de fonds génétiques différents. Il s'agissait de souches de SASM appartenant à des fonds génétiques distincts (9 fonds génétiques différents) et donc pas d'une source d'infection commune mais nécessitant un renforcement des mesures d'hygiène.

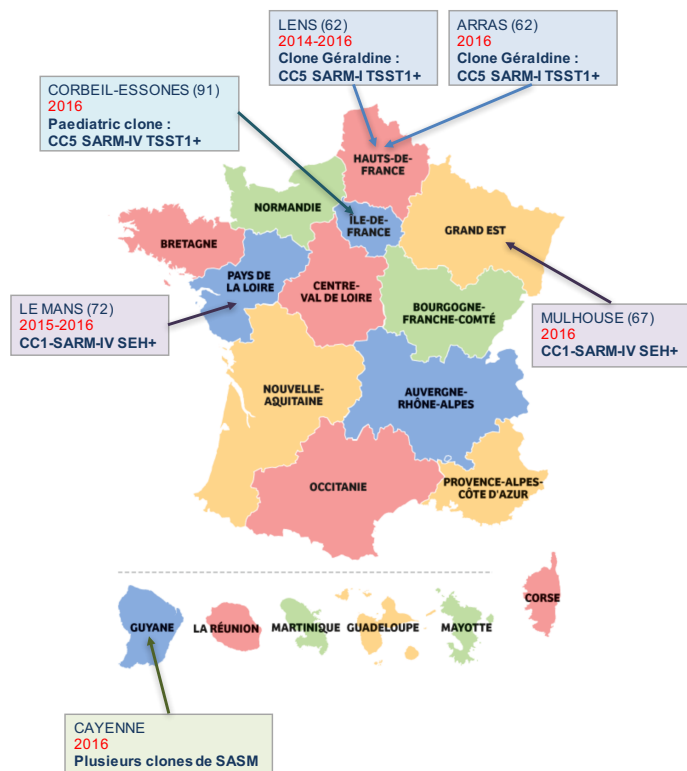


Figure 17- Epidémies d'infections à *S. aureus* dans les services de néonatalogie en France en 2016.

⁸ Couvé-Deacon E et al. (2017). Neonatal Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Geraldine: A Bundle of Measures to Halt Transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Mar 23:1-3.

4.2.2. Cas groupés d'infections à SARM communautaire CC88 dans une maternité

Contexte. Avril-mai 2016 : détection de cas groupés d'abcès du sein chez 3 femmes ayant séjourné dans la même unité de maternité en mars 2016. La souche isolée est un clone de SARM communautaire de type *spa* t690, résistant à la tétracycline et producteur de leucocidine de Panton-Valentine.

Investigations réalisées. Revue de l'ensemble des SARM isolés des prélèvements cliniques et des laits maternels de septembre 2015 à mai 2016. Recherche de portage nasal chez les soignants. Identification fine des isolats par le CNR. Enquête communautaire de l'ARS (courrier aux 87 accouchées ayant séjourné pendant la période supposée de transmission)

Résultats. 6 cas certains (documentés microbiologiquement) et 1 cas possible d'infections à SARM CC88 PVL +. Le dépistage des 90 professionnels n'a mis en évidence aucun porteur de SARM. Application des recommandations du HCSP et sensibilisation des professionnels des unités de maternité.

4.2.3. Recherche de lien de clonalité

En 2016, De nombreuses demandes de recherche de lien de clonalité concernant des souches de *S. aureus* (SARM ou SASM) mais également des souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN) ont été adressées au CNR en 2016. Il pouvait s'agir de plusieurs souches isolées chez un même patient, de souches isolées lors de cas groupés ou d'une augmentation non négligeable du nombre d'infections au sein d'un même service ou hôpital. Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour évaluer le lien de clonalité existant entre ces souches de staphylocoques : (i) caractérisation du fond génétique par détermination de l'allèle *agr*, (ii) détermination de l'appartenance à un complexe clonal (CC) au moyen de puces à ADN mettant en évidence le profil des gènes d'espèces, de virulence, de résistance, (iii) détermination du pulsotype ou profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé pour les SCN.

Nous ne présenterons pas ici les résultats individuels pour chaque épisode investigué. Les résultats commentés ont été adressés aux référents locaux pour chacune des demandes, résultats complétés par des échanges téléphoniques lorsque cela était nécessaire ou que le CNR éta sollicité par les intervenants locaux (Figure 18).

Il est important de rappeler que notamment pour l'espèce *S. aureus*, la circulation de grands clones de SARM mais également de SASM à l'hôpital ou dans la communauté peut rendre cette analyse des résultats obtenus délicate. S'il est souvent aisé de conclure quand les données (surtout des techniques moléculaires) permettent d'établir que les fonds génétiques des souches adressées sont différents, en revanche l'identité des fonds ou profils génétiques ne permet bien souvent pas d'établir avec certitude qu'il s'agit de la diffusion/transmission d'une même souche dans un contexte épidémique, le caractère endémique au niveau national de certains clones créant un bruit de fond rendant impossible des conclusions définitives.

Le développement du NGS devrait nous permettre d'affiner l'interprétation de nos résultats. Pour les souches responsables des épidémies dans les services de néonatalogie décrits au chapitre 4.2.1, une approche par séquençage génomique complet est actuellement en cours afin d'affiner les résultats obtenus par les techniques classiques utilisées par le CNR.

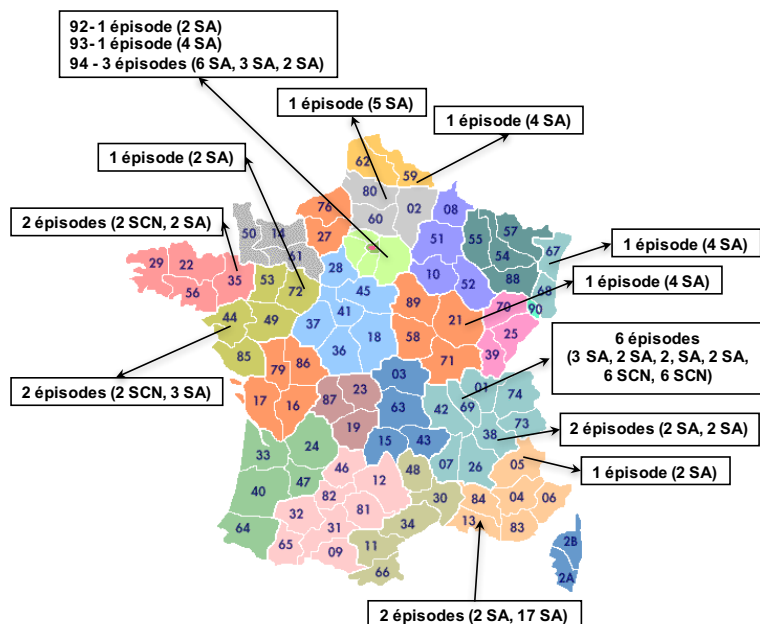


Figure 18- Recherches de lien de clonalité effectuées au CNR en 2016

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

Le système d'alerte décrit au paragraphe 4.1. est fonctionnel depuis de nombreuses années et permet une grande réactivité du CNR et des différents partenaires en cas d'alerte. Cette année, nous avons plus eu à investiguer des épidémies hospitalières que communautaires avec toujours beaucoup d'épidémies dans les services de néonatalogie. Compte tenu de l'absence d'un clone dominant à l'origine de ces épidémies au niveau national, il est légitime de proposer que le phénomène observé en néonatalogie est, au moins en partie, une conséquence des difficultés rencontrées dans les hôpitaux à pourvoir les services spécialisés et à haut risque infectieux comme la néonatalogie par des agents formés et expérimentés en nombre suffisant.

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

5.1. Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

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

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

Organisation de FMC spécifiques

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

- . Bioformation « Résistance aux antibiotiques » – module de base (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- . Bioformation « Résistance aux antibiotiques » – module de perfectionnement (dont une journée consacrée aux Staphylocoques)
- . Atelier FMC bioMérieux « Infections ostéo-articulaires »
- . Cours Pasteur « Résistance bactérienne aux antibiotiques » - Résistance chez les staphylococques

Organisation de colloques et congrès

Le CNR a poursuivi son engagement d'organisation d'un congrès biennuel (2012, 2014, 2016, en alternance avec celui organisé par le CNR des légionelles) dont l'objectif est de favoriser et catalyser les échanges entre les équipes françaises travaillant dans le champ de connaissance des Staphylocoques, en s'efforçant d'inclure dans les thèmes débattus l'ensemble du champ thématique du cahier des charges du CNR défini par Santé Publique France. L'innovation de **SympoStaph 2016** a été l'ouverture au grand public de ce congrès par l'organisation de deux sessions en fin de journée tout particulièrement ciblées vers un public non professionnel.

(Programme du congrès sur le site <http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/>).

Le CNR en tant que membre fondateur de l'European Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections de l'ESCMID (ESGS) a poursuivi sa politique de formation à l'échelle européenne par l'organisation du **Postgraduate Education Course - Virulence and resistance in *Staphylococcus aureus* : 2016 state of the art** (Lyon, 28-06 au 1-07-2016) (Programme en Annexe 5).

5.2. Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Le CNR n'a pas en 2016 élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

5.3. Décrire 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 figurent l'ensemble des éléments concernant le fonctionnement du CNR (missions générales et spécifiques, coordonnées des membres du CNR, fiches de renseignements), les modalités d'envoi des souches et les fiches devant accompagner tout envoi au CNR, les analyses réalisées par le CNR, les documents concernant les enquêtes en cours (PHRC...), une synthèse concernant les différentes formes d'infection staphylococcique et leurs caractéristiques, les recommandations concernant la prise en charge des infections staphylococciques, les collaborations passées et en cours, les bilans annuels ou quadriennaux, ainsi que les congrès ou formations organisés par le CNR. Les informations pratiques et actualités sont mises à jour régulièrement sur le site et notamment cette année avec le déménagement du 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 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) et paragraphe 5.1.

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. Décrire 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 colloque hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce colloque permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel et de faire une revue des demandes parvenues au CNR et des réponses adressées aux correspondants. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais en interne et /ou en lien avec les demandeurs et/ou leur(s) tutelle(s) (ARS, CLIN, CCLIN, Santé Publique France). Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique par courrier (environ 1500 courriers par an). En fonction du contexte et de la nature des résultats obtenus, des contacts téléphoniques sont établis avec les cliniciens et/ou microbiologistes ayant adressé la demande. L'analyse des cas groupés fait l'objet d'un rapport présentant les résultats obtenus et les conseils du CNR afin d'assurer au mieux la gestion de ces épisodes.

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

5.5. Lister les activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de SPF, des autres agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structures européennes (ECDC, ...) ou internationale (OMS, ...)

Santé Publique France

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

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 diffusées en 2014.

Instances Judiciaires

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

ECDC

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

ECDC – EARSS *Staphylococcus*

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

IMMI

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

ESCMID - ESGS

Le CNR Français est à l'origine de la création en 2013 au sein de l'ESCMID de l'European Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS). Ce groupe comporte actuellement 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 (Allemagne, Treasurer), A. Larsen (Hollande, Vice-Secretary), F. Laurent (France, Vice-Secretary). Parmi les multiples missions de ce groupe, deux ont une importance majeure dans le cadre des missions du CNR :

- Organiser un contrôle de qualité externe pour les laboratoires de référence européens. Ce CQE a été organisé en 2016 pour 11 laboratoires participants de 9 pays d'Europe
- 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 Moran. Six pays ont participé au recrutement de patients dans le cadre d'une étude pilote coordonnée par le CNR Français⁹.

⁹ Bouchiat C *et al.* I. (2017). MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(2), 372–375.

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.

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM « Pathogénie des Staphylocoques » dirigée par F. Vandenesch. Cette équipe qui a été évaluée très favorablement par l'HCERES et l'INSERM lors de la vague A et a été recrée au 1^{er} janvier 2016, est intégrée au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, Dir F.L. Cosset, Dir Adjoint F. Vandenesch), un centre de recherche labellisé par l'INSERM, le CNRS, l'Université de Lyon et l'Ecole Normale Supérieure de Lyon qui réunit 22 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (<http://ciri.inserm.fr/en/>). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un axe d'épidémiologie-clinique, un axe physiopathologique et un axe fondamental centré sur les ARN régulateurs. L'axe clinique porte sur l'épidémiologie (y compris dans ses approches génomiques), la résistance et la clinique des infections staphylococciques ; il constitue l'axe le plus directement en lien avec l'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques.

En 2016, 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.

Journal. MBio. 2016 Feb 16;7(1):e02183-15. doi: 10.1128/mBio.02183-15.

Title. Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage.

Authors. Glaser P, **Martins-Simões P**, Villain A, Barbier M, **Tristan A**, Bouchier C, Ma L, **Bes M**, **Laurent F**, Guillemot D, Wirth T, **Vandenesch F**.

Abstract. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) was recognized worldwide during the 1990s; in less than a decade, several genetically distinct CA-MRSA lineages carrying Panton-Valentine leukocidin genes have emerged on every continent. Most notably, in the United States, the sequence type 18-IV (ST8-IV) clone known as USA300 has become highly prevalent, outcompeting methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and other MRSA strains in both community and hospital settings. CA-MRSA bacteria are much less prevalent in Europe, where the European ST80-IV European CA-MRSA clone, USA300 CA-MRSA strains, and other lineages, such as ST22-IV, coexist. The question that arises is whether the USA300 CA-MRSA present in Europe (i) was imported once or on very few occasions, followed by a broad geographic spread, anticipating an increased prevalence in the future, or (ii) derived from multiple importations with limited spreading success. In the present study, we applied whole-genome sequencing to a collection of French USA300 CA-MRSA strains responsible for sporadic cases and micro-outbreaks over the past decade and United States ST8 MSSA and MRSA isolates. Genome-wide phylogenetic analysis demonstrated that the population structure of the French isolates is the product of multiple introductions dating back to the onset of the USA300 CA-MRSA clone in North America. Coalescent-based demography of the USA300 lineage shows that a strong expansion occurred during the 1990s concomitant with the acquisition of the arginine catabolic mobile element and antibiotic resistance, followed by a sharp decline initiated around 2008, reminiscent of the rise-and-fall pattern previously observed in the ST80 lineage. A future expansion of the USA300 lineage in Europe is therefore very unlikely.

Journal. J Antimicrob Chemother. 2016 Dec 20. pii: dkw516. doi: 10.1093/jac/dkw516.

Title. Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe

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

Abstract. OBJECTIVES: We investigated the epidemiological, clinical, microbiological and genetic characteristics of linezolid-resistant (LZR) *Staphylococcus capitis* isolates from French ICUs, and compared them with LZR *S. capitis* isolates from other European countries.

METHODS: All LZR isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing (AST) and the presence of *cfp* and *optrA* genes as well as mutations in the 23S rRNA and ribosomal proteins were investigated using specific PCR with sequencing. The genetic relationship between isolates was investigated using PFGE and WGS. Epidemiological data concerning LZR *S. capitis* were collected retrospectively in French microbiology laboratories.

RESULTS: Twenty-one LZR isolates were studied: 9 from France, 11 from Greece and 1 from Finland. All were resistant to methicillin and aminoglycosides. In addition, this unusual AST profile was identified in *S. capitis* isolates from seven French hospitals, and represented up to 12% of the *S. capitis* isolates in one centre. A G2576T mutation in 23S rRNA was identified in all isolates; *cfp* and *optrA* genes were absent. All isolates belonged to the same clone on the basis of their PFGE profiles, whatever their geographical origin. WGS found at most 212 SNPs between core genomes of the LZR isolates.

CONCLUSIONS: We identified and characterized an LZR *S. capitis* clone disseminated in three European countries, harbouring the same multiple resistance and a G2576T mutation in the 23S rRNA. The possible unrecognized wider distribution of this clone, belonging to a species classically regarded as a low-virulence skin colonizer, is of major concern not least because of the increasing use of oxazolidinones.

Journal. Med Mal Infect. 2017 Mar;47(2):152-157. doi: 10.1016/j.medmal.2016.10.004.

Title. In vitro activity of ceftobiprole on 440 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bronchopulmonary infections.

Authors. Hodille E, Delouere L, Bouveyron C, Meugnier H, Bes M, Tristan A, Laurent F, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O.

Abstract. OBJECTIVE: We assessed the in vitro activity of ceftobiprole on 440 *Staphylococcus aureus* clinical strains isolated from bronchopulmonary infections (2010-2014).

METHODS: *S. aureus* isolates were characterized for methicillin resistance, PVL status, and clonal complex. All isolates were tested for minimal inhibitory concentrations (MIC) determination by broth microdilution method for ceftobiprole, ceftaroline fosamil, and comparator antibiotics (linezolid, tigecycline, vancomycin, and daptomycin).

RESULTS: A total of 325 (74%) strains were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and 115 (26%) were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); 105 (24%) *S. aureus* strains were PVL-positive, including 35.2% (37/105) MRSA and 64.8% (68/105) MSSA. Ceftobiprole was highly active against *S. aureus* with MIC₉₀ of 1 mg/L, MICs ranging between 0.12 and 4mg/L (only one resistant strain, MIC of 4 mg/L). MIC₅₀ and MIC₉₀ were twice lower in MSSA than MRSA. Moreover, PVL+ MRSA were slightly more susceptible to ceftobiprole (MIC₅₀ of 0.5 mg/L and MIC₉₀ of 1 mg/L) than PVL- MRSA (MIC₅₀ and MIC₉₀ of 1 mg/L). The ceftobiprole-resistant strain was also resistant to ceftaroline fosamil and presented the

D239L mutation in PBP2A. The comparator antibiotics were equally active on the strains tested, with MIC₉₀ of 0.5 mg/L for ceftaroline fosamil, tigecycline, and daptomycin; 1 mg/L for vancomycin; and 2 mg/L for linezolid.

CONCLUSIONS: Our results suggest that ceftobiprole is highly active against *S. aureus* and is an effective alternative to vancomycin or linezolid in the management of staphylococcal pneumonia. However, close monitoring of isolates should be maintained to prevent resistant strain diffusion.

Journal. J Clin Microbiol. 2016 Dec ;54(12):2905-2909.

Title. Disk Diffusion Testing for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococci*: Does Moxalactam Improve upon Cefoxitin?

Authors. Bonjean M, Hodille E, Dumitrescu O, Dupieux C, Nkoud Mongo C, Allam C, Beghin M, Paris M, Borrel O, Chardon H, **Laurent F**, Rasigade JP, **Lina G**.

Abstract. Disk diffusion testing is widely used to detect methicillin resistance in *staphylococci*, and cefoxitin is currently considered the best marker for *mecA*-mediated methicillin resistance. In low-inoculum diffusion testing (colony suspension at 10⁶ CFU/ml), the addition of moxalactam in combination with cefoxitin has been reported to improve on cefoxitin alone for the detection of methicillin-heteroresistant *staphylococci*. However, moxalactam is absent from EUCAST and CLSI guidelines, which use high-inoculum diffusion testing (colony suspension at 10⁸ CFU/ml), calling into question the potential interest of including moxalactam in their recommendations. The inhibition zone diameters of cefoxitin and moxalactam, alone and in combination, were evaluated for concordance with *mecA* and *mecC* positivity in a large collection of clinical *Staphylococcus* isolates (611 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Staphylococcus saprophyticus* isolates and 307 coagulase-negative staphylococci other than *S. lugdunensis* and *S. saprophyticus* isolates, of which 22% and 53% were *mecA*-positive, respectively) and in 25 *mecC*-positive *S. aureus* isolates using high-inoculum diffusion testing. Receiver operating characteristic, sensitivity, and specificity analyses indicated that the detection of *mecA*- and *mecC*-positive and negative isolates did not improve with moxalactam, either alone or in combination with cefoxitin, compared to cefoxitin alone. These findings were similar in both the *S. aureus/S. lugdunensis/S. saprophyticus* group and in the coagulase-negative staphylococci group. Our results do not support the use of moxalactam as an additional marker of methicillin resistance when testing with high-inoculum disk diffusion.

Journal. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 Nov;86(3):262-264. doi: 10.1016/

Title. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for rapid routine identification of PBP2a-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci*.

Authors. Dupieux C, Trouillet-Assant S, Tasse J, Freydière AM, Raulin O, Roure-Sobas C, Salord H, Tigaud S, **Laurent F**.

Abstract. We evaluated the performance of an immunochromatographic assay (PBP2a Culture Colony Test - Alere™), detecting protein-binding penicillin 2a on staphylococci primary isolates in only 6minutes. The assay is highly sensitive for the direct detection of MRSA on various culture media whereas it requires cefoxitin induction for methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci.

Journal. Int J Antimicrob Agents. 2016 Oct;48(4):459-62. doi: 10.1016/

Title. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the environment of public transport: data from the metropolitan network in Lyon, France.

Authors. Gaymard A, Pichon M, Degaud M, Tasse J, **Dupieux C**, **Laurent F**.

Abstract. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is involved in community-acquired and nosocomial diseases. The means of MRSA transmission and dissemination in the community remain uncertain. Studies have shown that public transport systems could be a source of MRSA and may serve as a potential source for community-acquired MRSA infections. This study aimed to investigate MRSA contamination on Lyon's metropolitan network (Métro) in France. Hand-touched surfaces were sampled with sterile swabs (Transystem®) during a 1-day transversal study by collecting 50 samples in seven hub stations and two trains for each of the four Métro lines. Then, during a longitudinal study, one sample was collected twice daily for 30 consecutive days in the busiest and most congested hub station. All swabs were incubated in enrichment medium for 24 h and then each suspension was plated onto a chromogenic selective medium for MRSA. After 24 h at 36 °C, all presumptive MRSA colonies were tested using VITEK® MS to confirm identification as *S. aureus* as well as by Alere™ PBP2a Culture Colony Test and *mecA/mecC* PCR to check methicillin resistance. Of the 110 swabs tested, 24 presumptive MRSA colonies were isolated, of which 2 were confirmed as *S. aureus* by VITEK® MS. These two isolates were tested negative using the PBP2a Culture Colony Test and PCR. Unlike other foreign cities such as Lisbon, the current data suggest a low level of MRSA contamination of hand-touched surfaces on Lyon's Métro. This should be put in perspective with the low level of MRSA colonisation in the French community.

Journal. Sci Transl Med. 2016 Sep 21;8(357):357ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1153.

Title. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA.

Authors. Diep BA, Le VT, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, Wang X, Dip EC, Aguiar-Alves F, Basuino L, Marbach H, Mai TT, Sarda MN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Rasigade JP, Sellman BR, Chambers HF, **Lina G**

Abstract. New therapeutic approaches are urgently needed to improve survival outcomes for patients with necrotizing pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*. One such approach is adjunctive treatment with intravenous immunoglobulin (IVIG), but clinical practice guidelines offer conflicting recommendations. In a preclinical rabbit model, prophylaxis with IVIG conferred protection against necrotizing pneumonia caused by five different epidemic strains of community-associated methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) as well as a widespread strain of hospital-associated MRSA. Treatment with IVIG, either alone or in combination with vancomycin or linezolid, improved survival outcomes in this rabbit model. Two specific IVIG antibodies that neutralized the toxic effects of α -hemolysin (Hla) and Panton-Valentine leukocidin (PVL) conferred protection against necrotizing pneumonia in the rabbit model. This mechanism of action of IVIG was uncovered by analyzing loss-of-function mutant bacterial strains containing deletions in 17 genes encoding staphylococcal exotoxins, which revealed only Hla and PVL as having an impact on necrotizing pneumonia. These results demonstrate the potential clinical utility of IVIG in the treatment of severe pneumonia induced by *S. aureus*.

Journal. Emerg Infect Dis. 2016 Jan;22(1):96-9. doi: 10.3201/eid2201.150597.

Title. Outbreak of Panton-Valentine Leukocidin-Associated Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infection in a Rugby Team, France, 2010-2011

Authors. Couvé-Deacon E, **Tristan A**, Pestourie N, Faure C, Doffoel-Hantz V, Garnier F, **Laurent F**, **Lina G**, Ploy MC

Abstract. *Staphylococcus aureus* strains that produce Panton-Valentine leukocidin are known to cause community infections. We describe an outbreak of skin abscesses caused by Panton-Valentine leukocidin-producing methicillin-susceptible *S. aureus* (clonal complex 121) in a professional rugby team in France during July 2010-February 2011. Eight team

members were carriers; 7 had skin abscesses.

Journal. Am J Infect Control. 2016 Feb;44(2):e9-11. doi: 10.1016/j.ajic.2015.09.020. Epub 2015 Nov 14.

Title. Outbreak in newborns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the sequence type 5 Geraldine clone.

Authors. Leroyer C, Lehours P, **Tristan A**, Boyer F, Marie V, Elleau C, Nolent P, Venier AG, Brissaud O, de Barbeyrac B, Megraud F, Rogues AM

Abstract. We describe the first nosocomial outbreak of a toxic shock syndrome-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 5 Geraldine clone. Infection control interventions that are usually successful were implemented to control the outbreak. Spread of this virulent MRSA strain highlights the need to be vigilant to MRSA antibiotic susceptibilities.

Journal. Clin Microbiol Infect. 2016 Jan;22(1):46-52. doi: 10.1016/j.cmi.2015.09.008. Epub 2015 Sep 25.

Title. Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units

Authors. **Butin M**, **Rasigade JP**, **Martins-Simões P**, **Meugnier H**, Lemriss H5, Goering RV, Kearns A, Deighton MA, Denis O9, Ibrahim A, Claris O, **Vandenesch F**, Picaud JC, **Laurent F**.

Abstract. Nosocomial late-onset sepsis represents a frequent cause of morbidity and mortality in preterm neonates. The *Staphylococcus capitis* clone NRCS-A has been previously described as an emerging cause of nosocomial bacteraemia in French neonatal intensive-care units (NICUs). In this study, we aimed to explore the possible unrecognized dissemination of this clone on a larger geographical scale. One hundred methicillin-resistant *S. capitis* strains isolated from neonates (n = 86) and adult patients (n = 14) between 2000 and 2013 in four different countries (France, Belgium, the UK, and Australia) were analysed with Smal pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and *dru*-typing. The vast majority of NICU strains showed the NRCS-A pulsotype and the dt11c type (96%). We then randomly selected 14 isolates (from neonates, n = 12, three per country; from adult patients, n = 2), considered to be a subset of representative isolates, and performed further molecular typing (SacII PFGE, SCC*mec* typing, and multilocus sequence typing-like analysis), confirming the clonality of the *S. capitis* strains isolated from neonates, despite their distant geographical origin. Whole genome single-nucleotide polymorphism-based phylogenetic analysis of five NICU isolates (from the different countries) attested to high genetic relatedness within the NRCS-A clone. Finally, all of the NRCS-A strains showed multidrug resistance (e.g. methicillin and aminoglycoside resistance, and decreased vancomycin susceptibility), with potential therapeutic implications for infected neonates. In conclusion, this study represents the first report of clonal dissemination of methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* clone on a large geographical scale. Questions remain regarding the origin and means of international spread, and the reasons for this clone's apparent predilection for neonates.

Journal. J Antimicrob Chemother. 2017 Feb;72(2):372-375.

Title. MRSA infections among patients in the emergency department: a European multicentre study.

Authors. **Bouchiat C**, Curtis S, Spiliopoulou I, **Bes M**, Cocuzza C, Codita I, **Dupieux C**, Giormezis N, Kearns A, **Laurent F**, Molinos S, Musumeci R, Prat C, Saadatian-Elahi M,

Tacconelli E, **Tristan A**, Schulte B, **Vandenesch F**; ESCMID Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS)

Abstract. BACKGROUND: MRSA is a therapeutic concern worldwide, and a major agent of community-acquired skin and soft tissue infections (CA-SSTIs). While the US epidemiology of MRSA in CA-SSTIs is well described and reports the high prevalence of the USA300 clone, data on the European situation are lacking.

OBJECTIVES: To determine the prevalence and clonal characteristics of MRSA in CA-SSTIs in seven European emergency departments.

PATIENTS AND METHODS: From April to June 2015, patients presenting to the tertiary hospital emergency department with a *Staphylococcus aureus* CA-SSTI were prospectively enrolled. *S. aureus* isolates were characterized by antimicrobial susceptibility testing, detection of Panton-Valentine leucocidin encoding genes and *spa*-typing, MLST and/or DNA microarray.

RESULTS: Two-hundred and five cases of *S. aureus*-associated CA-SSTIs were included, comprising folliculitis, furuncles, abscesses, paronychia, impetigo, carbuncles and cellulitis. Of the 205 cases, we report an MRSA prevalence rate of 15.1%, with a north (0%) to south (29%) increasing gradient. Fifty-one isolates were Panton-Valentine leucocidin-positive (24.9%), whether MSSA or MRSA, with a heterogeneous distribution between countries. Clonal distribution of MSSA and MRSA showed high diversity, with no predominant circulating clone and no archetypical USA300 CA-MRSA clone.

CONCLUSIONS: This original prospective multicentre study highlights stark differences in European MRSA epidemiology compared with the USA, and that the USA300 CA-MRSA clone is not predominant among community-infected patients in Europe.

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

(i) Publications nationales

Hodille E, Delouere L, Bouveyron C, Meugnier H, Bes M, Tristan A, Laurent F, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O. *In vitro* activity of ceftobiprole on 440 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bronchopulmonary infections. *Med Mal Infect.* 2016 Nov 14.

(ii) Publications internationales

Dupieux C, Bouchiat C, Larsen AR, Pichon B, Holmes M, Teale C, Edwards G, Hill R, Decousser JW, Trouillet-Assant S, Petersen A, Skov R, Kearns A, Laurent F. Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus*: what to expect from immunological tests targeting PBP2a? *J Clin Microbiol.* 2017 Mar 15.

Israel L, Wang Y, Bulek K, Della Mina E, Zhang Z, Pedergrana V, Chrabieh M, Lemmens NA, Sancho-Shimizu V, Descatoire M, Lasseau T, Israelsson E, Lorenzo L, Yun L, Belkadi A, Moran A, Weisman LE, Vandenesch F, Batteux F, Weller S, Levin M, Herberg J, Abhyankar A, Prando C, Itan Y, van Wamel WJ, Picard C, Abel L, Chaussabel D, Li X, Beutler B, Arkwright PD, Casanova JL, Puel A. Human Adaptive Immunity Rescues an Inborn Error of Innate Immunity. *Cell.* 2017 Feb 23;168(5):789-800.

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

Belmessieri D, Gozlan C, Duclos MC, Molinier V, Aubry JM, Dumitrescu O, Lina G, Redl A, Duguet N, Lemaire M. Synthesis, surfactant properties and antimicrobial activities of methyl glycopyranoside ethers. *Eur J Med Chem.* 2017 Mar 10;128:98-106.

Le VT, Le HN, Pinheiro MG, Hahn KJ, Dinh ML, Larson KB, Flanagan SD, Badiou C, Lina G, Tkaczyk C, Sellman BR, Diep BA. Effects of tedizolid phosphate on survival outcomes and suppression of production of staphylococcal toxins in a rabbit model of MRSA necrotizing pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan 30.

Patot S, Rc Imbert P, Baude J, Martins Simões P, Campergue JB, Louche A, Nijland R, Bes M, Tristan A, Laurent F, Fischer A, Schrenzel J, Vandenesch F, P Salcedo S, François P, Lina G. The TIR Homologue Lies near Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*, Coupling Modulation of Virulence and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS Pathog*. 2017 Jan 6;13(1):e1006092.

Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Bienvenu F, Steghens JP, Cartier R, Bes M, Tristan A, Plesa A, Le VT, Diep BA, Lina G, Dumitrescu O. Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Dec 12;6:180.

Simões PM, Lemriss H, Dumont Y, Lemriss S, Rasigade JP, Assant-Trouillet S, Ibrahimi A, El Kabbaj S, Butin M, Laurent F. Single-Molecule Sequencing (PacBio) of the *Staphylococcus capitis* NRCS-A Clone Reveals the Basis of Multidrug Resistance and Adaptation to the Neonatal Intensive Care Unit Environment. *Front Microbiol*. 2016 Dec 15;7:1991.

Butin M, Martins-Simões P, Pichon B, Leyssene D, Bordes-Couecou S, Meugnier H, Rouard C, Lemaitre N, Schramm F, Kearns A, Spiliopoulou I, Hyryläinen HL, Dumitrescu O, Vandenesch F, Dupieux C, Laurent F. Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Dec 20.

Peeters O, Ferry T, Ader F, Boibieux A, Braun E, Bouaziz A, Karsenty J, Forestier E, Laurent F, Lustig S, Chidiac C, Valour F; Lyon BJI study group. Teicoplanin-based antimicrobial therapy in *Staphylococcus aureus* bone and joint infection: tolerance, efficacy and experience with subcutaneous administration. *BMC Infect Dis*. 2016 Nov 3;16(1):622.

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

Larsen J, Stegger M, Andersen PS, Petersen A, Larsen AR, Westh H, Agersø Y, Fetsch A, Kraushaar B, Käsbohrer A, Feßler AT, Schwarz S, Cuny C, Witte W, Butaye P, Denis O, Haenni M, Madec JY, Jouy E, Laurent F, Battisti A, Franco A, Alba P, Mammaia C, Pantosti A, Monaco M, Wagenaar JA, de Boer E, van Duijkeren E, Heck M, Domínguez L, Torres C, Zarazaga M, Price LB, Skov RL. Evidence for Human Adaptation and Foodborne Transmission of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2016 Nov 15;63(10):1349-1352.

Rasigade JP, Dunyach-Rémy C, Sapin A, Messad N, Trouillet-Assant S, Dupieux C, Lavigne JP, Laurent F. A Prophage in Diabetic Foot Ulcer-Colonizing *Staphylococcus aureus* Impairs Invasiveness by Limiting Intracellular Growth. *J Infect Dis*. 2016 Nov 15;214(10):1605-1608.

Nowrouzian FL, Lina G, Hodille E, Lindberg E, Hesselmar B, Saalman R, Adlerberth I, Wold AE. Superantigens and adhesins of infant gut commensal *Staphylococcus aureus* strains and association with subsequent development of atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2017 Feb;176(2):439-445. doi: 10.1111/bjd.15138.

Diep BA, Le VT, Badiou C, Le HN, Pinheiro MG, Duong AH, Wang X, Dip EC, Aguiar-Alves F, Basuino L, Marbach H, Mai TT, Sarda MN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Rasigade JP, Sellman BR, Chambers HF, Lina G. IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med*. 2016 Sep 21;8(357):357ra124.

Bonjean M, Hodille E, Dumitrescu O, Dupieux C, Nkoud Mongo C, Allam C, Beghin M, Paris M, Borrel O, Chardon H, Laurent F, Rasigade JP, Lina G. Disk Diffusion Testing for

- Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci: Does Moxalactam Improve upon Cefoxitin? *J Clin Microbiol.* 2016 Dec;54(12):2905-2909.
- Dupieux C, Trouillet-Assant S, Tasse J, Freydière AM, Raulin O, Roure-Sobas C, Salord H, Tigaud S, Laurent F. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for rapid routine identification of PBP2a-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Nov;86(3):262-264.
- Faïs T, Cougnoux A, Dalmaso G, Laurent F, Delmas J, Bonnet R. Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Oct 21;60(11):6986-6988.
- Valour F, Laurent F, Ferry T; Lyon Bone and Joint Infection Study Group. Pristinamycin in the treatment of MSSA bone and joint infection-authors' response. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Nov;71(11):3318.
- Gaymard A, Pichon M, Degaud M, Tasse J, Dupieux C, Laurent F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the environment of public transport: data from the metropolitan network in Lyon, France. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Oct;48(4):459-62.
- Delahaye F, Bouchiat C, Guerpillon B, Vandenesch F. Reply: Performing a Systematic Colonoscopy After Staphylococcal Infective Endocarditis: How Good Is the Evidence? *J Am Coll Cardiol.* 2016 Aug 16;68(7):774.
- Mairpady Shambat S, Siemens N, Monk IR, Mohan DB, Mukundan S, Krishnan KC, Prabhakara S, Snäll J, Kearns A, Vandenesch F, Svensson M, Kotb M, Gopal B, Arakere G, Norrby-Teglund A. A point mutation in *AgrC* determines cytotoxic or colonizing properties associated with phenotypic variants of ST22 MRSA strains. *Sci Rep.* 2016 Aug 11;6:31360.
- Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, Vandenesch F, Caldelari I, Romby P. *Staphylococcus aureus* RNAIII and Its Regulon Link Quorum Sensing, Stress Responses, Metabolic Adaptation, and Regulation of Virulence Gene Expression. *Annu Rev Microbiol.* 2016 Sep 8;70:299-316.
- Maali Y, Martins-Simões P, Valour F, Bouvard D, Rasigade JP, Bes M, Haenni M, Ferry T, Laurent F, Trouillet-Assant S. Pathophysiological Mechanisms of *Staphylococcus Non-aureus* Bone and Joint Infection: Interspecies Homogeneity and Specific Behavior of *S. pseudintermedius*. *Front Microbiol.* 2016 Jul 12;7:1063.
- Ben Said M, Hays S, Bonfils M, Jourdes E, Rasigade JP, Laurent F, Picaud JC. Late-onset sepsis due to *Staphylococcus capitis* 'neonatalis' in low-birthweight infants: a new entity? *J Hosp Infect.* 2016 Sep;94(1):95-8. doi: 10.1016/j.jhin.2016.06.008.
- Tasse J, Croisier D, Badel-Berchoux S, Chavanet P, Bernardi T, Provot C, Laurent F. Preliminary results of a new antibiotic susceptibility test against biofilm installation in device-associated infections: the Antibiofilmogram®. *Pathog Dis.* 2016 Aug;74(6).
- Lemriss H, Dumont Y, Lemriss S, Martins-Simoes P, Butin M, Lahlou L, Rasigade JP, El Kabbaj S, Laurent F, Ibrahim A. Genome Sequences of Multiresistant *Staphylococcus capitis* Pulsotype NRCS-A and Methicillin-Susceptible *S. capitis* Pulsotype NRCS-C. *Genome Announc.* 2016 Jun 9;4(3).
- Davido B, Saleh-Mghir A, Laurent F, Danel C, Couzon F, Gatin L, Vandenesch F, Rasigade JP, Crémieux AC. Phenol-Soluble Modulins Contribute to Early Sepsis Dissemination Not Late Local USA300-Osteomyelitis Severity in Rabbits. *PLoS One.* 2016 Jun 8;11(6):e0157133.
- Tasse J, Dupieux C, Caillon J, Lanotte P, Lamy B, Aissa N, Bemer P, Mereghetti L, Michon AL, Lozniewski A, Bes M, Trouillet-Assant S, Laurent F. Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Aug;85(4):419-21.

Hodille E, Alekseeva L, Berkova N, Serrier A, Badiou C, Gilquin B, Brun V, Vandenesch F, Terman DS, Lina G. Staphylococcal Enterotoxin O Exhibits Cell Cycle Modulating Activity. *Front Microbiol.* 2016 Apr 15;7:441.

Marquès C, Franceschi C, Collin V, Laurent F, Chatellier S, Forestier C. Genome Sequence of a Clinical *Staphylococcus aureus* Strain from a Prosthetic Joint Infection. *Genome Announc.* 2016 Apr 7;4(2). pii: e00198-16.

Flammier S, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F, Trouillet-Assant S. Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and Superantigens. *PLoS One.* 2016 Mar 2;11(3):e0150693.

Trouillet-Assant S, Lelièvre L, Martins-Simões P, Gonzaga L, Tasse J, Valour F, Rasigade JP, Vandenesch F, Muniz Guedes RL, Ribeiro de Vasconcelos AT, Caillon J, Lustig S, Ferry T, Jacqueline C, Loss de Morais G, Laurent F. Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients. *Cell Microbiol.* 2016 Oct;18(10):1405-14.

Tubiana S, Duval X, Alla F, Selton-Suty C, Tattevin P, Delahaye F, Piroth L, Chirouze C, Lavigne JP, Erpelding ML, Hoën B, Vandenesch F, Iung B, Le Moing V; VIRSTA/AEPEI Study Group. The VIRSTA score, a prediction score to estimate risk of infective endocarditis and determine priority for echocardiography in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect.* 2016 May;72(5):544-53.

Lioliou E, Fechter P, Caldelari I, Jester BC, Dubrac S, Helfer AC, Boisset S, Vandenesch F, Romby P, Geissmann T. Various checkpoints prevent the synthesis of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan hydrolase LytM in the stationary growth phase. *RNA Biol.* 2016;13(4):427-40.

Roux S, Valour F, Karsenty J, Gagnieu MC, Perpoint T, Lustig S, Ader F, Martha B, Laurent F, Chidiac C, Ferry T; Lyon BJI Study group. Daptomycin > 6 mg/kg/day as salvage therapy in patients with complex bone and joint infection: cohort study in a regional reference center. *BMC Infect Dis.* 2016 Feb 17;16:83. doi: 10.1186/s12879-016-1420-7.

Glaser P, Martins-Simões P, Villain A, Barbier M, Tristan A, Bouchier C, Ma L, Bes M, Laurent F, Guillemot D, Wirth T, Vandenesch F. Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage. *MBio.* 2016 Feb 16;7(1):e02183-15.

Valour F, Boibieux A, Karsenty J, Vallat MP, Braun E, Perpoint T, Biron F, Laurent F, Lustig S, Chidiac C, Ferry T; Lyon Bone and Joint Infection Study Group. Pristinamycin in the treatment of MSSA bone and joint infection. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Apr;71(4):1063-70.

Delahaye F, M'Hammedi A, Guerpillon B, de Gevigney G, Boibieux A, Dauwalder O, Bouchiat C, Vandenesch F. Systematic Search for Present and Potential Portals of Entry for Infective Endocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Jan 19;67(2):151-8.

Trouillet-Assant S, Valour F, Mouton W, Martins-Simões P, Lustig S, Laurent F, Ferry T; Lyon BJI study group. Methicillin-susceptible strains responsible for postoperative orthopedic infection are not selected by the use of cefazolin in prophylaxis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Mar;84(3):266-7.

Couvé-Deacon E, Tristan A, Pestourie N, Faure C, Doffoel-Hantz V, Garnier F, Laurent F, Lina G, Ploy MC. Outbreak of Pantone-Valentine Leukocidin-Associated Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infection in a Rugby Team, France, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2016 Jan;22(1):96-9.

Leroyer C, Lehours P, Tristan A, Boyer F, Marie V, Elleau C, Nolent P, Venier AG, Brissaud O, de Barbeyrac B, Megraud F, Rogues AM. Outbreak in newborns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to the sequence type 5 Geraldine clone. *Am J Infect Control.* 2016 Feb;44(2):e9-11.

Butin M, Rasigade JP, Martins-Simões P, Meugnier H, Lemriss H, Goering RV, Kearns A, Deighton MA, Denis O, Ibrahimi A, Claris O, Vandenesch F, Picaud JC, Laurent F. Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. Clin Microbiol Infect. 2016 Jan;22(1):46-52.

(iii) *Communications nationales*

Orales

Maali Y, D'Anthouard L, Martins-Simões P, Jammot A, Monteix A, Valour F, Vandenesch F, Ferry T, Laurent F, Trouillet-Assant S. Physiopathologies des infections ostéo-articulaires liées aux staphylocoques à coagulase-négative : spécificité de l'espèce *S. lugdunensis*. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Trouillet-Assant S, Tafari V, Valour F, Cameron D, Peleg A, Ferry T, Laurent F. Souches VISA (Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) : adaptées pour devenir chroniques? 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Ruppé E, Lazarevic V, Girard M, Mouton W, Ferry T, Laurent F, Schrenzel J. Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Garnier F, Martins-simões P, Bes M, Michaud A, Guindre L, Sevin O, Sanchez R, Barraud O, Laurent F. Emergence d'un nouveau clone de SARM ST5 hébergeant une cassette composite SCCcad/ars-SCCmec dans le centre de la France. RICAI, 2016 (Paris, France)

Bonnichon L, Bouchiat C, Bes M, Laurent F, Vandenesch F, Tristan A. Infections invasives : qui gagne le combat en France en 2015 : CC152-MSSA-PVL+, USA300-MRSA-PVL+ ou ST80-MRSA-PVL+ ? 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Dupieux C, Delouere L, Bouveyron C, Martra A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, Laurent F, Dumitrescu O. Dépistage de la sensibilité diminuée aux glycopeptides chez *S. aureus*. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Bouchiat C, Spiliopoulou I, Prat C, Schulte B, Codita I, Tristan A, Bes M, Laurent F, Kearns A, Vandenesch F. Infections communautaires à SARM : une étude multicentrique européenne. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Trouillet-Assant S, Tafari V, Cameron D, Valour F, Peleg A, Laurent F. Le compartiment intracellulaire : un réservoir bactérien pour les souches VISA (Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*). JNI, 2016 (Lille, France)

Affichées

Morin A, Menard G, Auger G, Isly H, Lorin De La Grandmaison O, Guillaumot P, Senechal H, Subiros M, King LA, Bouchiat C, Tristan A, Donnio PY. Cas groupés d'infections à SARM communautaire CC88 dans une maternité. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Mouton W, Tafari V, Bouveyron C, Schnel R, Bes M, Tristan A, Dumitrescu O, Vandenesch F, Dupieux C, Laurent F. Alere™ PLP2aSACultureColonyTest : Evaluation de la nouvelle génération du test. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Valdeyron ML, Tristan A, Bruchon C, Plaisant F, Coffinieres A, Pillet F, Got S, Denis MA, Bréant V, Dode X, Grando J, Claris O, Vanhems P. Gestion d'une épidémie de SARM CC30 en néonatalogie. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Tasse J, Badel-Berchoux S, Marques C, Saglio M, Clément A, Forestier C, Bernardi T, Laurent F. Biofilm : Adaptation in vivo des souches de *S. aureus* responsables d'IOA. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Tafari V, Safrani-lahyani J, Trouillet-assant S, Chiganne M, Vincent F, Perouse de montclos M, Doleans-Jordheim A, Laurent F. Nouveau milieu chromogène pour *Staphylococcus aureus* chez le patient mucoviscidosique. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Dumont Y, Butin M, Martins-Simões P, Raphard A, Picaud J-C, Laurent F. Persistence et diffusion de *S. capitis* NRCS-A en réanimation néonatale. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Trouillet-Assant S, Valour F, Mouton W, Martins-Simões P, Lustig S, Laurent F, Ferry T. Antibio prophylaxie en chirurgie orthopédique par cefazoline et infections ostéo-articulaires à *S. aureus* : les souches impliquées produisent-elle des variants de pénicillinase capables d'hydrolyser la céfazoline. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 12-13 décembre 2016.

Mouton W, Tasse J, Bietrix J, Jammot A, Haenni M, Bes M, Meugnier H, Madec J, Sale G, Dupieux C, Laurent F. Etude épidémiologique des souches de colonisation nasale de *S. aureus* chez les équidés dans 41 centres équestres et élevages français. JRE, 2016 (Paris, France)

Mouton W, Tasse J, Bietrix J, Jammot A, Haenni M, Bes M, Meugnier H, Madec J, Sale G, Dupieux C, Laurent F. The Antibiofilmogram®: First Results of A New Antibiotic Susceptibility Test Against Biofilm Installation in Bone and Joint Infections. SFM, 2016 (Paris France)

(iv) Communications internationales

Orales

Bouchiat C, Spiliopoulou I, Prat C, Schulte B, Codita I, Curtis S, Tristan A, Bes M, Kearns A, Vandenesch F. Is CA-MRSA a threat in the emergency department? A European multicenter study. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Trouillet-Assant S, Tafari V, Cameron D, Peleg A.Y, Laurent F. Adaptation of Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* to intracellular compartment leading to bacterial reservoir responsible for chronic infection. EBJIS, 2016 (Oxford, United Kingdom).

Affichées

Martins-Simões P, Butin M, Hoden L, Dumont Y, Lemriss H, Ibrahimi A, Picaud JC, Kearns A, Deighton MA, Denis O, Rasigade JP, Laurent F. Report of the first worldwide diffusion of a multi-resistant coagulase negative staphylococci and comparative genomics with other *S. capitis*. International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, 2016 (Estoril, Portugal).

Martins-Simões P, Butin M, Dupieux C, d'Anthouard L, Leyssene D, Bordes-Couecou S, Pichon B, Meugnier H, Lemaitre N, Schramm F, Vandenesch F, Spiliopoulou I, Hyyryläinen H, Kearns A, Dumitrescu O, Laurent F. Emergence and dissemination of a linezolid-resistant *Staphylococcus capitis* clone in Europe. International Meeting on Microbial Epidemiological Markers, 2016 (Estoril, Portugal).

Deplano A, Laurent F, Tristan A, Vandenesch F, Olivier D. First European external quality assessment (EQA) for *Staphylococcus aureus* by a network of 11 European referring laboratories. e-poster. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Hodille E, Canizares M, Bouveyron C, Bes M, Dupieux C, Tristan A, Vandenesch F, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O. Performance of antibiotic disks for detecting *Staphylococcus aureus* resistance to macrolides and related antibiotics. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Dupieux C, Butin M, Dumitrescu O, Naceur O, Martra A, Bouveyron C, Bes M, Tristan A, Lina G, Vandenesch F, Laurent F, Rasigade JP. Adaptation to vancomycin pressure of

heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Maali Y, Martins-Simões P, Valour F, Bouvard D, Ferry T, Laurent F, Trouillet-Assant S. *Staphylococcus non-aureus* and pathophysiological mechanisms of bone and joint infections: interspecies heterogeneity and specific behaviour of the species *S. pseudintermedius*. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Mouton W, Tasse J, Bietrix J, Jammot A, Haenni M, Bes M, Meugnier H, Madec J, Sale G, Dupieux C, Laurent F. Epidemiological evidence of nasal colonization of *S. aureus* strains in horses and equestrian centers in 41 French farms. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Tasse J, Jammot A, Laetitia D, Mouton W, Emond J, Martins Simões P, Rasigade J, Raulin O, Trouillet-Assant S, Laurent F. Reliability of the Xpert MRSA NxG assay and the BD MAX MRSA XT assay to detect genetically diverse mecA/mecC MRSA and mecA drop-out MSSA isolates from Europe. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Trouillet-Assant S, Tafari V, Cameron D, Peleg A.Y, Laurent F. Intracytoplasmic compartment of host cells: a bacterial reservoir for Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. 26th ECCMID, Amsterdam, 2016

Tafari V, Safrani-Lahyani J, Trouillet-Assant S, Chiganne M, Vincent F, Doleans-Jordheim A, Laurent F. Clinical Evaluation of a New Chromogenic Medium for the Isolation of *Staphylococcus aureus* in Various Samples Including Cystic Fibrosis Patients. ASM microbe, 2016 (Boston, Massachusetts)

Tafari V, Safrani-Lahyani J, Assant-Trouillet S, Chiganne M, Vincent F, Doleans-Jordheim A, Laurent F Clinical Evaluation of a New Chromogenic Medium for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Cystic Fibrosis Patients: Earlier and more Sensitive! NACFC, 2016 (Orlando, Floride)

Maali Y, Martins-Simões P, Valour F, Bouvard D, Bes M, Ferry T, Laurent L, Trouillet-Assant S. Investigation of the ability to be internalized in osteoblasts as a pathophysiological mechanism involved in *Staphylococcus non-aureus* bone and joint infection. EBJIS, 2016 (Oxford, United Kingdom).

(v) *Conférences sur invitations*

Nationales

Bouchiat C. Prévalence des SARM dans les infections cutanées chez les patients admis aux urgences : a Moran-like study in Europe. SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Buttin M. SARM et autres Staphylocoques multi-résistants en néonatalogie. SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Dumitrescu O. Détection de la résistance aux glycopeptides : pertinence clinique et microbiologique. SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Laurent F. Intérêt réel du séquençage génomique en 2016. RICAI, 2016 (Paris, France).

Lina G. Protections périodiques et choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle. Sympostaph 2016, Octobre 2016, Lyon.

Lina G. BMR-BHRe : ne pas les rater. Bactéries à Gram positif : SARM. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse. Décembre 2016, Paris.

Maali Y. *Staphylococcus intermedius* Group : Hétérogénéité du comportement physiopathologique. SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Martins-Simões P. USA300 multiples imports et déclins. SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Tristan A. (F. Javerliat et G. Durand, bioMérieux). Investigation et contrôle d'épidémies à SARM en milieux communautaire et nosocomial : Que faire et ne Pas faire ? SYMPOSTAPH, 2016 (Lyon, France).

Internationales

Laurent F. Interactions between staphylococci, osteoblasts and osteoclasts what do we know in 2016? EBJIS, 2016 (Oxford, United Kingdom).

Lina G. Agr, ACME, PSMs and PVL: What's new? Sixth ISC MRSA Consensus Conference, November 2016, Majorca, Spain

Vandenesch F. Community-acquired MRSA: a phylogeographic study. International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Seoul, Korea, Aug 30-Sept 2, 2016

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

ANSES /Resapath

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

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

Etude BIORequi

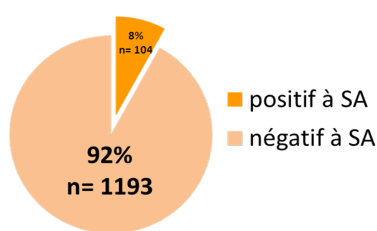
Porteur : CNR Staphylocoques

Partenaires : IFCE - Institut Français Cheval et de l'équitation, ANSES, Ecoles Vétériaires

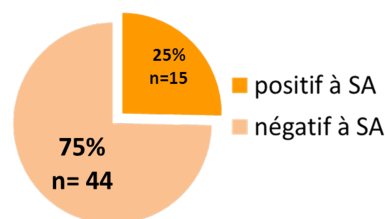
La réalisation de cette étude de portage nasal de *S. aureus* chez les équidés a été mise en place à la suite de l'étude EquiSARM (CNR Staph/ANSES-Lyon) qui a mis en évidence l'isolement en France de SARM *mecA* ou *mecC* responsables d'infections chez des chevaux avec une prévalence inquiétante. L'objectif de ce travail était d'étudier la prévalence de la colonisation nasale de *S. aureus* chez les équidés et les professionnels de la filière en contact avec ces animaux, de connaître le niveau de portage animal et humain des SARM et SARM au sein de différentes structures. Plus généralement, nous souhaitons pouvoir évaluer le risque d'acquisition de SA et de SARM pour la population générale dans le cadre des activités de loisir en centre équestre. Le recueil a été menée entre Juillet et Septembre 2015 en Aquitaine, Auvergne-Bourgogne, Pays de la Loire et Normandie dans quarante haras nationaux, centres équestres ou élevages et l'analyse moléculaires des souches en 2016. Des écouvillons nasaux ont été collectés dans chaque centre, sur au minimum de 30 chevaux aléatoirement sélectionnés. Après un accord préalable, le personnel et/ou directeur de chaque centre ont pu également être écouvillonnés (n=31). Les prélèvements ont été déchargés dans un bouillon cœur cerveau contenant 2.5% de NaCl et incubés une nuit à 37°C. Le lendemain, une gélose chromID SAID (bioMérieux) a étéensemencée avec 100µL de l'enrichissement. Les colonies présentant une coloration spécifique ainsi qu'une agglutination au test SLIDEX (bioMérieux) ont été ré-isolées sur gélose au sang (bioMérieux) et identifiées en Maldi-TOF (Vitek MS, bioMérieux). Une PCR triplex ciblant le gène *nuc* (marqueur spécifique de *S. aureus*), le gène *mecA* et le gène *mecC* a été réalisé sur les souches isolées. Les isollements ont également été caractérisés par *spa*-Type.

Niveau de portage nasal

Au total, 1356 prélèvements (Equidés, n=1297 ; Homme, n=59) ont été inclus. Une colonisation par SA a été retrouvée chez 104 équidés (8%) et 15 membres du personnel (25%). Alors que 19 centres étaient exempts de colonisation à SA, la prévalence était plus particulièrement élevée dans deux centres (n= 20/33 (61%) et n= 21/36 (58%)).



a. Prévalence de portage de *S. aureus* chez les chevaux

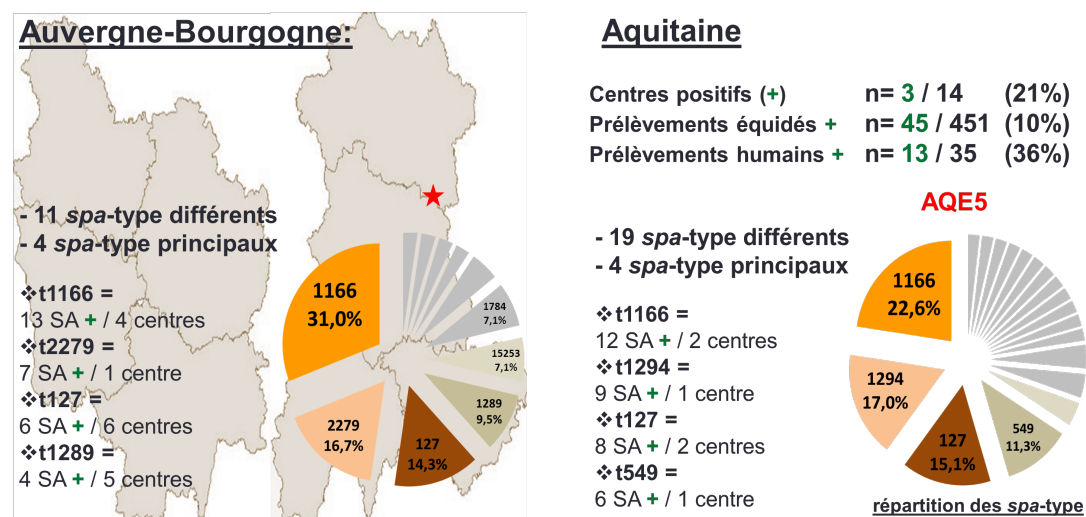


b. Prévalence de portage de *S. aureus* chez professionnels

Figure 19- Pourcentage de portage nasal à *S. aureus*

Caractérisation des souches

Des antibiogrammes (14 antibiotiques) ont été réalisés sur la totalité des 104 souches d'équidés, qui ont aussi été testées par PCR triplex *nucl/mecA/mecC* pour la recherche moléculaire de la résistance à la méticilline et enfin leur spa-type a été déterminé par séquençage. Les résultats ont été regroupés par régions et par centres.



Répartition des spa-type de la région Auvergne-Bourgogne et Aquitaine

Figure 20- Caractérisation des souches par régions

Après analyse, l'évaluation de la sensibilité à 14 antibiotiques d'intérêt humain et vétérinaire a révélé le caractère très majoritairement multisensible des souches étudiées, avec seulement une faible expression de résistance au niveau de la pénicilline G (n=14, 13%), et de l'érythromycine (n=13, 12%). Il faut surtout noter qu'aucune souche de SARM n'a été détectée lors de cette étude de colonisation nasale. Ces résultats apparaissent rassurants quant au niveau de la résistance des souches de *S. aureus* isolées dans les haras, centres équestres, et élevages en France même si l'on ne peut exclure des épidémies localisées à certaines structures spécifiques (non incluses dans incluses dans le panel criblé).

Les 104 souches SASM d'équidés présentaient une grande diversité et appartenaient à 19 spa-types différents, dont trois prédominants (t1166, t127, t1294 retrouvés pour 25, 15 et 9

souches réparties dans 6, 6 et 1 centre(s) respectivement). Les spa-types isolés chez le personnel étaient tous différents de ceux retrouvés chez les équidés et correspondaient à ceux classiquement décrits chez l'Homme. Aucun lien des souches humaines avec les clones équins n'a été observé, suggérant un risque de transmission extrêmement faible ce qui est rassurant en termes de risque sanitaire pour les professionnels de la filière de même que pour la population générale en contact avec les chevaux dans les activités de loisir.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR poursuivra en 2017 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal.

8.1. Activités d'expertise

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

Le CNR a développé au fil des ans une relation de confiance et d'échange avec un nombre important de correspondants (plus de 300 par exemple en 2015). Il s'agit principalement de laboratoires de microbiologie et de cliniciens des CHU et des CHR pour les 2/3 mais aussi des laboratoires privés qui desservent des établissements de soins ou des patients directement pour le 1/3 restant. La rétro-information systématique auprès des demandeurs par le biais de courriers personnalisés, les contacts téléphoniques directs auprès des biologistes et des cliniciens dans les situations d'urgence et/ou inhabituelles ont certainement contribué à entretenir une relation de confiance entre les partenaires. Pour les années qui viennent nous souhaitons fidéliser ces partenaires et renforcer ces collaborations en améliorant la rapidité, la sécurité et la traçabilité des avis rendus dans le cadre du projet de télémédecine exposé au paragraphe 8.2.

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

Utilisation du séquençage de haut-débit (NGS)

Le CNR souhaite continuer à développer et disposer des outils les plus performants pour la caractérisation des souches de *S. aureus*. Le CNR des Staphylocoques utilise actuellement un outil de typage et de caractérisation du résistome et du virulome basé sur une puce à ADN couvrant 336 gènes ou allèles. Mise en œuvre dans les 48h suivant l'arrivée d'une souche au laboratoire, elle permet d'obtenir un résultat en moins d'une semaine et permet ainsi de répondre pour chaque souche individuellement mais aussi sur un plan de l'épidémiologie globale (lorsque l'on considère l'ensemble de la collection constituée), à une diversité d'informations concernant la virulence, la résistance et le typage. La « révolution génomique » actuellement à l'œuvre en épidémiologie microbienne et plus généralement en microbiologie est actuellement en cours d'implémentation dans notre laboratoire. L'utilisation du séquençage de haut-débit (NGS) a pour objectif l'amélioration des missions du CNR en ce qui concerne : (i) l'identification de souches, (ii) la recherche de liens de clonalité, à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés et (iii) pour la surveillance avec une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones présents sur le territoire français. Notre objectif est de pouvoir utiliser cet outil en temps réel dans le cadre des épidémies investiguées par le CNR en collaboration avec Santé Publique France.

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

Le CNR poursuivra comme au cours des mandatures précédentes en adéquation avec les missions des CNR confiés par Santé Publique France, l'évaluation des nouvelles techniques et des nouveaux kits mise sur le marché. Il est ainsi envisagé en 2017, d'évaluer les performances et l'intérêt des réactifs suivants :

Antibiofilmogramme® (Biofilm Control). La société BioFilm Control a développé une solution technologique nouvelle, brevetée, le BioFilm Ring Test® (BFRT), permettant d'évaluer l'activité des antibiotiques sur l'installation des microorganismes en biofilm. Son principe est de visualiser le déplacement macroscopique de microbilles magnétisables le long d'une surface sous l'action d'un aimant. Ce test qui se présente sous forme de microplaque 96 puits dans lesquels des quantités croissantes de différents antibiotiques sont déposées sous forme lyophilisée au fond des puits permet de déterminer pour chaque antibiotique la concentration minimale prévenant la formation de biofilm ou CMIb (première concentration correspondant à un puits avec formation d'un spot après magnétisation). En effet le déplacement et la mobilisation des microbilles est modulé par la viscosité à proximité de la surface induite par les macromolécules incluses dans le biofilm, par des interactions moléculaires et la viscoélasticité de la surface (adsorption de macromolécules sécrétées par les bactéries) : en l'absence de formation de biofilm, les microbilles sont mobilisées par une série d'aimants positionnés sous le centre de chaque puits et vont forer un spot au centre du puits alors qu'en présence de biofilm aucun spot n'apparaît, les microbilles étant bloquées et non mobilisable par l'aimantation. En utilisant la collection de souches du CNR couplé aux données cliniques dont nous disposons, l'objectif sera de déterminer la distribution des CMIb pour les souches responsables d'infections sur bio-matériel et de chercher à réaliser une validation clinique de ce nouveau paramètre d'activité des antibiotiques. Les travaux ont d'ores et déjà débutés dans le cadre d'un fond unique inter-ministériel (FUI) "Biofilm" associant les sociétés Biofilm Control et Vivexia (Modèle animaux).

BJI Inoplex™ (Ingen Diaxonit) : ce kit est le premier test sérologique multiplex d'aide au diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires notamment à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*. Ce test non-invasif est un outil complémentaire aux méthodes actuelles pour orienter le diagnostic différentiel entre une douleur mécanique ou une infection potentielle. Il utilise une sélection d'antigènes recombinants spécifiques des micro-organismes les plus fréquemment retrouvés chez les patients infectés. Le test mesure notamment la réponse immune aux trois espèces de staphylocoques. Les antigènes sont greffés à la surface de microbilles en suspension qui sont mises en contact avec l'échantillon du patient dans un puits unique. L'analyse des microbilles est ensuite faite sur les plateformes Luminex®. L'interprétation combine l'intensité des réactions obtenues et le nombre d'antigènes positifs pour chaque famille. Compte tenu de notre expérience en terme de sérologie bactérienne et d'infections staphylococciques mais aussi d'un axe thématique (avec une large biobanque sérum/liquide articulaire) dédié aux infections ostéo-articulaires staphylococciques dans l'équipe de recherche associée au CNR, le CNR des staphylocoques se propose d'évaluer les performances de ce test dans le cadre des biobanques sériques déjà constituées (étude rétrospective) mais aussi de façon prospective sur la période 2017-2018.

Evaluation d'un système d'identification et d'antibiogramme rapide directement sur prélèvements - Accelerate. L'automate Accelerate est un instrument permettant l'identification bactérienne et la réalisation d'un antibiogramme par mesure de la CMI vraie, directement à partir du bouillon d'un flacon d'hémoculture détecté comme positif. L'originalité du système tient à l'utilisation de techniques de cytométrie d'image et d'hybridation in situ pour l'identification microbienne et d'une technique de cytométrie d'image dynamique pour l'antibiogramme-CMI. Cette approche permet un rendu de l'identification en quelques heures et celui de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques en moins de 6 heures. Outre le bénéfice médical direct pour le patient lié à un ajustement thérapeutique plus rapide, cette technologie devrait concourir à une meilleure rationalisation de l'utilisation des antibiotiques. Notre laboratoire évalue actuellement les performances de cet automate en situation réelle pour les bactéries à Gram négatif avec des résultats très encourageants. Le fournisseur a souhaité l'extension de l'étude aux bactéries à Gram Positif et notamment aux staphylocoques afin de bénéficier de l'expertise du CNR sur cette bactérie. Il s'agira notamment de tester les performances de l'automates dans les cas de staphylocoques présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides ou à la daptomycine ou encore des souches présentant une expression très hétérogène de la résistance à la méticilline ou porteuses du gène *mecC*. Nous prévoyons de réaliser cette étude dans un premier temps sur des hémocultures artificiellement ensemencées par des souches de *S. aureus* représentatives des mécanismes de résistance complexes évoqués ci-dessus, puis en situation réelle sur des hémocultures de patients détectées comme positives par les automates d'hémoculture.

Evaluation de nouveaux antibiotiques

Comme récemment avec la ceftaroline (AstraZeneca) ou le ceftobiprole (Basilea), le CNR en utilisant sa vaste collection de souches de staphylocoques se propose d'évaluer de l'activité du tédizolide (SIVEXTRO, MSD), nouvelle molécule de la famille des oxazolidinones récemment commercialisée en France afin de pouvoir fournir aux tutelles et à la communauté scientifique une photographie des niveaux de sensibilité à cette molécule, notamment pour les souches présentant des résistances au linézolide (mutations et gènes *cfr*) afin de guider leur positionnement dans l'arsenal thérapeutique en France.

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

Etude phylogénétique et phylogéographique à l'échelle mondiale des souches de *S. capitis* responsables de sepsis chez les grands prématurés

Le CNR a mis en évidence l'existence d'un clone de *S. capitis* (appelé NRCS-A) responsable de sepsis dans les services de réanimation néonatal. Nous avons démontré que ce clone est endémique au niveau mondial et touche spécifiquement les secteurs de réanimation néonatale accueillant les enfants de très petits poids partout dans le monde. Nous avons caractérisé ce clone au niveau épidémiologique (prévalence, facteurs de sélection, facteurs de risque d'acquisition, etc.) et phénotypique (profils de sensibilité aux antibiotiques, formation de biofilm en étudiant un grand nombre de souches cliniques de ce clone. Sur la base d'une approche NGS et d'études moléculaires, nous avons pu identifier les gènes de virulence, de résistance les éléments mobiles ainsi que les gènes spécifiques au clone NRCS-A. En 2016 a débuté l'analyse d'un très large panel de 250 souches cliniques de *S. capitis* NRCS-A isolées entre 1994 et 2015 et provenant de tous les continents. Pour ces travaux un financement de l'ESCMID de 30 000 euros a été obtenu. L'objectif est, après séquençage HiSeq-Illumina des 250 souches, d'utiliser les approches Bayésiennes sur le jeu

de données obtenu afin de reconstruire l'histoire évolutive du clone NRCS-A en intégrant les dimensions spatiales et temporelles pour comprendre les origines, les voies de dissémination, les évolutions en terme de virulence et de résistance aux antibiotiques impliqués dans la diffusion mondiale des souches de ce clone. Il s'agira aussi en comparant les données génétiques et phénotypiques des souches de *S. capitis* isolées chez les nouveaux-nés (clone NRCS-A) versus chez les adultes (n'appartenant pas au clone NRCS-A) d'identifier les traits et mécanismes moléculaires spécifiques du clone NRCS-A qui pourraient expliquer sa capacité de dissémination et sa virulence spécifique chez les grands prématurés. Ces données devraient nous permettre de mieux comprendre les composantes intervenant dans l'émergence, le maintien et l'évolution génétique des staphylocoques et de mettre en place les mesures préventives les plus pertinentes pour essayer de stopper l'expansion des souches NRCS-A dans les services de réanimation néonatale et pour améliorer la prise en charge des prématurés infectés.

Histoire évolutive du clone de SARM hospitalier ST8 clone Lyon.

Collaboration : CNR des staphylocoques, bioMérieux.

Nous avons caractérisé la diversité génomique du clone ST8-MRSA-IV-Lyon Clone/UK-EMRSA-2 sur le territoire Français, nous souhaitons maintenant étudier les liens phylogénétiques entre ce clone et le clone USA300 MRSA-IV-PVL+. En effet, dans un travail préliminaire dans lequel les génomes du clone Lyon ont été alignés avec les génomes disponibles du clone USA300 MRSA-IV-PVL+, nous avons été surpris de constater que les 52 génomes du clone Lyon étaient étroitement intriqués avec les souches USA300 MRSA-IV-PVL+ et semblaient représenter une branche dérivée de l'arbre des USA300. Pour investiguer cette question nous proposons de séquencer un échantillon plus important de souches du clone Lyon, couvrant notamment une large diversité temporelle (les premières souches disponibles de ce clone datent de 1992) et géographique (inclusion de souches européennes notamment britanniques), et d'inclure aussi une large diversité de génomes du complexe clonal CC8 incluant USA300. Les analyses phylogénétiques Baysiennes seront conduites avec les mêmes outils que ceux utilisés précédemment,

Facteurs bactériens associés à une localisation à l'endocarde au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus*

Collaboration : CNR des Staphylocoques – Centre de génomique de l'Institut Pasteur, Paris – Serum Staten Institut, Copenhague, Danemark – Duke University, Etats Unis.

L'objectif du projet est d'identifier les facteurs bactériens associés à une localisation à l'endocarde en cas de bactériémie à *Staphylococcus aureus*. Ce projet s'appuie sur une collection de souches cliniques unique, issue du PHRC national VIRSTA : « Facteurs associés à une localisation à l'endocarde au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus* : étude de cohorte prospective, nationale, multicentrique » qui s'est déroulé du 1er avril 2009 au 31 octobre 2011 en France métropolitaine et pour lequel le CNR des Staphylocoques était co-investigateur. L'objectif principal du PHRC était de mettre en évidence les facteurs démographiques, cliniques et liés à la prise en charge médicale associés à une localisation à l'endocarde en cas de bactériémie à *S. aureus*. Cette première partie a donné lieu à plusieurs publications dans lesquelles le CNR était associé. Les objectifs secondaires de ce protocole visaient à étudier (i) les facteurs de virulence de la souche de *S. aureus* responsable de l'infection et (ii) les facteurs génétiques liés à l'hôte associés à une localisation à l'endocarde en cas de bactériémie à *S. aureus*. Nos travaux de recherche utilisent des souches issues de l'étude ancillaire nichée dans la cohorte principale. Ont été retenus les cas incidents atteints d'EI certaine sur valve native, et les témoins atteints de bactériémie définie selon les critères de Duke sachant que l'EI était exclue par la

stricte négativité d'une échographie trans-oesophagienne systématique. Les cas et témoins ont été appariés sur le sexe, l'âge et le caractère lié aux soins ou non de l'infection. Nous avons donc à disposition une collection de 126 souches incluant des EI certaines (n=72) et des bactériémies (n=54). Une première analyse génotypique par puce à ADN a permis de démontrer que les souches d'endocardite étaient génétiquement différentes des souches de bactériémies. La suite du projet consiste à identifier les marqueurs génétiques codant ou non des facteurs de virulence spécifiques des souches issues d'endocardite par une approche de séquençage de génome complet. Une analyse stratifiée par complexe clonal (CC) a été choisie afin de réduire le bruit de fond généré par la grande diversité génétique des souches. Les résultats obtenus sur le CC5, CC45 et CC30 par des méthodes statistiques de *Discriminant Analysis of Principal Component* et de *Machine Learning Approach* ont permis de discriminer les souches issues d'endocardite des souches issues des bactériémies avec une spécificité et une sensibilité supérieures à 90% sans permettre cependant d'identifier les facteurs causaux qui déterminent l'occurrence de l'EI au cours des Bactériémies. Les travaux actuels visent précisément à déterminer les facteurs potentiellement causaux par des méthodes de *genome wide association study* (GWAS). Ces méthodes, très performantes en génétique humaine en raison de l'extrême faiblesse de diversité dans l'espèce humaine doivent être complètement repensés en microbiologie en raison de la très grande diversité génétique des bactéries et en particulier de l'espèce *S.aureus*. Ces travaux devraient nous permettre à terme de développer des outils diagnostiques rapides, peu coûteux et non invasifs permettant de prédire le risque d'endocardite lors d'une bactériémie à *S. aureus* pour une meilleure prise en charge des patients.

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

Les oxazolidinones, seule véritable nouvelle famille d'antibiotiques commercialisée au cours des 30 dernières années, constituent un traitement de recours pour le traitement des SARM. Cependant, cette famille n'échappe pas à la règle et a vu l'émergence de résistances liée à une utilisation prolongée et à un mésusage du linézolide (LNZ) ou du tédizolide (TDZ) qui sont pour l'instant les seuls antibiotiques commercialisés au sein de cette famille. Les bactéries résistantes présentent le plus souvent des mutations chromosomiques de l'ARNr 23S et/ou des gènes codant les protéines ribosomales, avec une transmission uniquement verticale (bactérie mère à bactéries filles). De façon plus inquiétante, d'autres mécanismes de résistance sont liés à l'acquisition de gènes plasmidiques qui sont eux transférables horizontalement : gènes *cfrA/B* et *optrA* codant respectivement une méthyltransférase et pour un ABC transporteur.

L'augmentation de la prévalence de ces résistances touche surtout les staphylocoques à coagulase négative (SCN). Cette émergence est préoccupante en raison :

- i) du niveau de résistance global aux antibiotiques déjà élevé des SCN et de leur pouvoir pathogène intrinsèque notamment dans le cadre d'infections chroniques en présence de matériel,
- ii) de l'omniprésence des SCN dans la flore commensale cutanéomuqueuse qui en font des réservoirs potentiels de gènes de résistance avec un risque élevé de transfert aux souches de SA virulents et déjà multirésistants.

Objectifs

Dans ce contexte, notre objectif sera de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la prévalence de la résistance aux oxazolidinones en France chez les SA et SCN ?
- Quelle est la prévalence des différents mécanismes de résistance et leurs impacts sur les niveaux de résistance au LNZ/TDZ ?

- Existe-t-il des clones de SCN plus à risque de transmettre et/ou des clones de SA plus aptes à acquérir ces résistances et quel est le coût biologique de cette acquisition ?
- Existe-t-il des mécanismes de résistances au LNZ et TDZ non encore identifiés ?

Méthodes

- **Etude nationale de prévalence de la résistance aux oxazolidinones** avec un recueil des souches de SA et SCN résistantes aux OXZ (voir étude infra) via le réseau des CHU en lien avec Santé Publique France et le CNR de Staphylocoques.

- **Caractérisation phénotypique des résistances aux oxazolidinones** avec détermination des CMI LNZ/TDZ (microdilution en milieu liquide) et réalisation d'un antibiogramme classique (Vitek2, bioMérieux)

- **Caractérisation moléculaire des souches de SCN résistantes au LNZ** à partir des données de séquençage complet des génomes (HiSeq) des souches incluses avec typage MLST in silico (identification des clones), recherche des mutations ARNr 23S/protéines ribosomales L3-L4 (recherche de SNPs) et recherche des gènes *cfr* et *optrA* (BLAST sur les génomes assemblés) afin d'étudier la prévalence des mécanismes et leurs distributions clonales.

Une analyse de corrélation entre CMI et nature des mécanismes de résistances sera aussi réalisée.

- **Analyse des capacités et fréquences de transfert (chez SCN) et de réception (chez SA) des mécanismes de résistance** par des techniques de dénombrements sur des milieux sélectifs chromogéniques SARM en utilisant :

- des souches représentatives des clones de SCN porteurs de mécanismes transférables de résistance (*cfr*, *optr*) obtenue au cours de l'étude nationale,
- les 20 clones de SARM/SASM les plus prévalents en Europe appartenant aux Sequence Type ST5 (n= 4), ST 8 (n=4), ST15, ST22, ST30, ST45, ST72, ST398.

Le coût biologique de la résistance sera déterminée in vitro par comparaison des cinétiques de croissance des couples de souches de SARM "avant" et "après" acquisition des mécanismes transférables de résistance.

La stabilité de ces mêmes mécanismes chez les bactéries réceptrices sera déterminée en suivant par numération sur milieu gélosé sélectif (LNZ 4 mg/L) vs. non sélectif la proportion de colonies résistantes/sensibles au LNZ en milieu liquide par subculture quotidienne sur plusieurs semaines en l'absence de pression de sélection.

- **Recherche de nouveaux gènes de résistance.** Pour les souches résistantes au LNZ sans génotypes de résistance connus (mutations, *cfrA/B*, *optrA*) une recherche d'association génétique (GWAS) sera réalisée par comparaison des génomes avec ceux de souches sensibles afin d'identifier de possibles nouveaux gènes impliqués dans le phénotype de résistance. Les potentiels gène-candidats feront l'objet d'une validation par des approches de transfert de résistance, construction de mutants et complémentation.

Les données obtenues permettront de disposer d'une vision globale (épidémiologique, phénotypique et génétique) de la résistance aux oxazolidinones en France et d'anticiper le niveau de risque de dissémination des mécanismes transférables en fonction des souches réservoirs. Ces données permettront de mieux appréhender l'épidémiologie des bactéries concernées par ces résistances, de mieux anticiper les évolutions possibles et d'adapter les mesures de prévention et contrôle de la diffusion des souches de SCN et SA résistantes aux oxazolidinones ainsi que la prise en charge des patients colonisés/infectés.

Ces travaux s'étaleront sur 2017 et 2018 dans le cadre d'un master 2 en Infectiologie

8.2. Activités de conseil, formation et information

8.2.1. les projets de formation envisagés

Concernant les formations, les membres du CNR continueront à répondre à toute demande d'interventions concernant les infections staphylococciques en lien avec l'activité du CNR dans le cadre de formations universitaires (Master, DES, DU, DESC, etc.), de formations post-universitaires, de formations médicales continues, de congrès régionaux, nationaux ou internationaux.

8.2.2. les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR (p.ex. création, développement d'un site internet dédié)

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la **rétro-information** des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque-là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations aux prescripteurs des analyses afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées dans les situations de cas groupés. L'amélioration portera sur le mode de transmission de ces résultats et conseils qui fera appel à un système de transmission sécurisée dans le cadre du projet de Télémédecine développé par la Direction des Systèmes d'Information pour la Direction Générale des HCL. Ce système permettra un rendu en temps réel aux prescripteurs des résultats, avis spécialisés du CNR et conseils sur un **serveur sécurisé « MyHclPro »** (via les identifiants RPPS) qui assure ainsi la sécurité et la traçabilité des avis rendus. Les requérants ou demandeurs pourront adresser leur demande directement sur le site et recevront une alerte par mail les invitant à se reconnecter de manière sécurisée pour consulter l'avis rendu. La mise en place de ce projet sera effective en 2017 au moment du démarrage réel de l'IAI. Ce serveur MyHclPro ne se substituera pas aux moyens de communication direct (téléphone) ni au **site internet du CNR** (<http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/>) qui permet la diffusion aux professionnels des modalités de fonctionnement du CNR, des diverses recommandations concernant le staphylocoque et les infections staphylococciques, des bilans d'activités et publications du CNR, des enquêtes et études cliniques conduites par le CNR ainsi que les informations sur les formations et congrès.

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

Synthèse des différentes recommandations en Europe sur la gestion du portage nasal et de la décontamination dans le cadre hospitalier et communautaire

Collaborations : CNR des staphylocoques, European Study Group on Staphylococci and Staphylococcal Infections de l'ESCMID.

Une réflexion globale sur la gestion du portage nasal et de la décontamination en présence ou non d'une infection avérée apparaît aujourd'hui une nécessité tant les approches envisagées par les différents pays sont hétérogènes. Le CNR représenté au comité exécutif de l'ESG de l'ESCMID par F. Vandenesch (chair) et F. Laurent (Secrétaire adjoint) a proposé la rédaction d'un état de l'art et de recommandation consensuelles concernant la gestion du portage nasal et de la décontamination des patients dans les cadres hospitaliers et

communautaires en présence de portage seul ou d'infection. Seront incluses dans le champ de la réflexion les SARM et les SASM, qu'ils soient ou non producteurs de la leucocidine de Panton Valentine. Un groupe de travail incluant des infectiologues et microbiologistes de différents pays européens est en cours de constitution. Les conclusions de ce travail seront proposées au bureau de l'ESCMID en charge des Guidelines Européennes.

Comme cela a été le cas entre 2011 et 2016, le CNR des staphylocoques s'engage à répondre à toutes les demandes de ses tutelles concernant les infections staphylococciques qu'il s'agisse de gestion des phénomènes épidémiques, de recommandations au niveau nationale concernant la gestion des patients, de leur traitement, de leur prise en charge plus globale ou de l'analyse de risque de transmission humaine ou animale. Par le passé le CNR a su apporter son expertise dans le cadre de la saisine de l'INVS par l'HAS sur la gestion des infections à SARM communautaires.

8.3. Contribution à la surveillance épidémiologique

8.3.1. les projets de constitution, développement animation de réseaux de partenaires

Les CNR "Résistance aux antibiotiques" et "Staphylocoques" font régulièrement appel à des laboratoires hospitaliers pour la collecte de souches résistantes, dans le cadre d'études multi-centriques ponctuelles (e.g., GERPA 2105, EARS 2011). Cette collaboration s'établit sur la base d'un partenariat dans lequel les CNR apportent leur expertise pour l'analyse de phénomènes épidémiques en lien avec la résistance aux antibiotiques. Les laboratoires participants sont tenus informés des résultats des enquêtes et associés aux publications. Les données concernant leurs établissements respectifs leurs sont communiquées à titre de rétro-information.

A l'occasion du récent appel d'offre de Santé Publique France pour le renouvellement des Centres nationaux de référence - Mandature 2017-2021, les deux CNR actuels ont souhaité formaliser la constitution d'un réseau commun incluant des laboratoires publics et privés, auxquels ils pourraient s'adresser régulièrement pour des activités de surveillance épidémiologique. Les laboratoires partenaires, une trentaine environ, seront choisis parmi ceux ayant déjà collaboré avec l'un ou l'autre des CNR, en fonction de leur localisation géographique en métropole et Outre-Mer et des spécificités de leur activité. L'objectif est de tendre vers une représentativité de ces laboratoires à l'échelon national, de façon à pouvoir disposer de données épidémiologiques solides.

Ce réseau est en cours de constitution. L'objectif est de finaliser la mise en place en 2017. Dès lors, à partir de 2018, ce réseau pourra être activé deux fois par an pour la transmission de données sur la sensibilité aux antibiotiques des espèces entrant dans le champ de compétence des CNR concernés (staphylocoques, entérobactéries, entérocoques, bacilles à Gram négatif non fermentaires). Cette activité de surveillance qui n'a pas vocation à concurrencer celle des réseaux nationaux existants (ONERBA, BMR-Raisin, EARS-Net, AZAY, REUSSIR...) a pour but d'identifier les évolutions de la résistance bactérienne vis-à-vis des molécules antibiotiques de dernier recours et d'évaluer la prévalence des souches classées MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively-drug resistant) and PDR (pandrug-resistant), selon les critères de l'EUCAST et du CLSI de façon globale et pour chaque type d'infections (IN, IAS non-nosocomiales, IC)

Au sein du réseau constitué et en dehors des recueils biannuels, il a été convenu que les souches résistantes à des molécules antibiotiques "sentinelles" et/ou de recours utilisées

pour détecter les phénomènes émergents (colistine ou association ceftolozane-tazobactam chez les Gram négatif; glycopeptides, oxazolidinones, daptomycine, oxacilline, ceftaroline pour les staphylocoques, oxazolidinones, daptomycine, tigécycline pour les entérocoques) seront systématiquement adressées aux CNR concernés pour y être analysées par des techniques de biologie moléculaire et/ou phénotypiques de référence. Celles présentant des mécanismes nouveaux ou à tendance épidémique seront comparées par des méthodes génotypiques pouvant inclure le séquençage génomique complet. Si nécessaire, des données patients anonymisées pourront être demandées aux microbiologistes afin de compléter et recouper les informations épidémiologiques dont disposent les CNR. Les techniques de diagnostic développées par les CNR pourront être transférées et évaluées par les laboratoires partenaires qui le souhaitent dans les conditions habituelles de fonctionnement d'un laboratoire de biologie médicale, afin de mieux cerner les applications et les limites de ces techniques en routine et de mesurer l'intérêt de leur utilisation locale. Dans le cadre de cette collaboration étroite des deux CNR et de mise en commun des outils/moyens/démarches, il a d'ores et déjà été décidé d'organiser fin 2017-début 2018, une étude épidémiologique conjointe portant sur la prévalence et la caractérisation moléculaires des souches présentant une résistance aux oxazolidinones et à la daptomycine au sein des genres *Staphylococcus* (cf Etude OXAZO-Staph).

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

La comparaison des profils génomiques obtenus par les différentes techniques génétiques et génomiques détaillées aux chapitres 2 et 3, permettra de confirmer ou infirmer la présence de cas groupés dans les structures sanitaires françaises et d'alerter rapidement en cas de nécessité Santé Publique France comme cela été le cas lors des différentes épidémies présentées dans le présent dossier. En cas d'épidémie, le CNR contribuera activement au recueil des souches isolées chez les malades et les contacts, aux enquêtes concernant les modes et les sources de contamination et apportera son expertise dans la gestion de tels épisodes au plus près des équipes locales (laboratoire, hygiène, services cliniques, ARS, CCLIN, CLIN).

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

8.3.3. la contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Pas d'étude actuellement programmée pour 2017.

8.3.4. les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance

Surveillance et caractérisation de la résistance à la méticilline dans les infections communautaires

L'étude pilote *Moran-like* conduite en 2015 sous l'égide de l'European Study Group on Staphylococci et pilotée par le CNR Français (cf chapitre 3.4), devrait être reconduite en 2018 avec une méthodologie identique incluant un nombre plus important de centres : l'objectif étant de tripler au minimum le nombre de centres participant afin d'inclure au moins 600 patients. Une demande de financement auprès de l'ESCMID et auprès de l'ECDC est actuellement en préparation pour ce projet qui devrait encore être portée par le CNR Français.

Analyse de sensibilité du PMSI pour la détection des chocs toxiques staphylococciques menstruels

Comme indiqué au chapitre, 3.1.3.1. la surveillance des chocs toxiques menstruels (CTS) repose sur les déclarations spontanées au CNR des cliniciens ou des microbiologistes à des fins diagnostiques ou épidémiologiques sans qu'une incidence réelle puisse être calculée. Le PMSI est une approche possible d'évaluation de cette incidence dès lors qu'un code PMSI inclue le CTS et que le codage est correctement effectué par les praticiens. Nous proposons d'étudier la pertinence, la sensibilité et la spécificité du code A483 (choc toxique) en diagnostic principal, relié ou associé dans le PMSI. Pour cela nous débuterons notre étude sur le CHU de Lyon en analysant le contenu de tous les dossiers médicaux des patients avec le code A483 au cours de trois dernières années. Nous devrions en déduire quelle fraction des patients référencés sous ce code correspond à de véritables CTS. Nous étendrons ensuite notre analyse sur quelques autres grand CHU afin de valider les chiffres obtenus avant d'extrapoler l'analyse à l'ensemble du territoire. Nous pourrions par ailleurs croiser les résultats obtenus par ce moyen aux données issues du CNR. Ce travail sera conçu et réalisé avec l'aide de Santé Publique France.

Surveillance et caractérisation de la résistance aux oxazolidinones

Voir ci-dessus Etude OXAZO-Staph

Surveillance et caractérisation de la résistance à la daptomycine

L'utilisation de la daptomycine est en forte augmentation depuis les trois dernières années, notamment pour le traitement des bactériémies, des endocardites et des infections ostéo-articulaires. Dans ce contexte le CNR a reçu plusieurs souches pour confirmation de la résistance à cette molécule notamment au cours de persistance ou de rechute de l'infection chez des patients sous traitement. Dans le cadre d'une étude concomitante à celle décrite pour la surveillance des oxazolidinones, le CNR réalisera un suivi de la prévalence de la résistance à la daptomycine et assurera la caractérisation moléculaire des souches.

Surveillance au niveau animal

Cette surveillance apparaît nécessaire compte tenu des transferts possibles entre Animal et Homme, comme ont pu l'illustrer au cours de la mandature précédente les travaux conduits sur les clones ST398, les clones portant les gènes *mecC* ou sur les animaux domestiques qui peuvent être porteur de souches multi-résistantes et virulentes. L'objectif est de suivre les souches de SARM mais aussi de *S. pseudintermedius* résistants à la méticilline isolés chez l'animal via le recueil de souches réalisé par l'ANSES Lyon via le réseau ResaPath et de comprendre les liens entre les différents clones de *S. pseudintermedius* sensibles et résistants à la méticilline mais aussi avec les souches de MSSA et de MRSA.

8.4. Contribution à l'alerte

Le CNR des Staphylocoques, sur la base des résultats obtenus avec les différentes techniques décrites dans ce document, est à même d'identifier l'émergence de nouveaux clones présentant des profils de virulence ou de résistance particulier comme cela a été le cas avec le clone de *S. epidermidis* résistant au linézolide devenu endémique en France au cours de la dernière mandature et du clone de *S. capitis* NRCS-A endémique dans les services de néonatalogie en France, en Europe et plus largement à travers le monde ou de caractériser des phénomènes endémiques, épidémiques ou pandémiques. Les fiches de recueil de données cliniques associées à l'envoi des souches complètent ce dispositif. L'ensemble permet au CNR des staphylocoques d'apporter sa contribution à l'alerte dans le domaine des infections staphylococciques. Le CNR communique avec ses correspondants de Santé Publique France par voie électronique et par téléphone en temps réel sur tous les cas et situations inhabituels. Nous surveillons actuellement la diffusion du clone de SASM PVL+ CC152-MSSA qui devient le clone majoritaire dans les infections graves comme les pneumonies nécrosantes et investiguons les facteurs permettant de caractériser simplement ce clone afin de pouvoir alerter nos partenaires.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

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

Le CNR Staphylocoques s'engage à assurer les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

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

1. Expertise

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

2. Conseil

Dans le cadre des missions Biotox :

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

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

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

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

François Vandenesch – directeur du CNR PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : francois.vandenesch@univ-lyon1.fr
Anne Tristan – directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@univ-lyon1.fr
Frédéric Laurent – directeur adjoint PH - IAI PU - Faculté de Pharmacie de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Jérôme Etienne PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : jerome.etienne@univ-lyon1.fr

1. Secteur virulence et épidémiologie

Anne Tristan – directrice adjointe PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : anne.tristan@univ-lyon1.fr
Coralie Bouchiat PA IAI	E-mail : coralie.bouchiat-sarabi@chu-lyon.fr
Claude-Alexandre Gustave AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : claude-alexandre.gustave@chu-lyon.fr
Michèle Bes Biologiste contractuel-Centre de Biologie Nord	E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Gérard Lina PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr

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

2. Secteur résistance

Frédéric Laurent – directeur adjoint PH - IAI PU - Faculté de Pharmacie de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr
Oana Dumitrescu PH – IAI MCU- Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : oana.dumitrescu@chu-lyon.fr

3. Secteur sérologie

Frédéric Laurent – directeur adjoint PH - IAI PU - Faculté de Pharmacie de Lyon	E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Céline Dupieux AHU - IAI - Faculté de Médecine Lyon Est	E-mail : celine.dupieux@chu-lyon.fr
Jean-Philippe Rasigade PH – IAI MCU- Faculté de Médecine Lyon Sud	E-mail : jean-philippe.rasigade@chu-lyon.fr

Patricia Martins-Simoës Ingénieur - IAI	E-mail : patricia.martins-simoës01@chu-lyon.fr
---	---

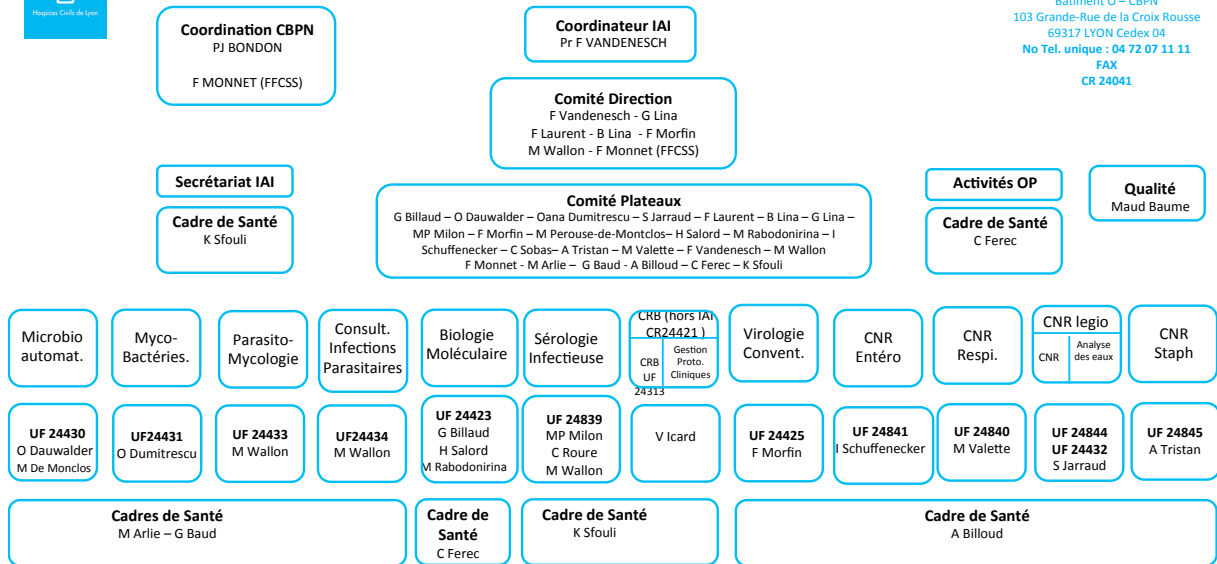
Cadre Aline Billoud	
Techniciennes Nadia Boulegroun Caroline Bouveyron Christine Gardon Roxane Schnel Charline Vuillot	
Secrétaire Yamina Lakehal	

Organigrammes



Institut des Agents Infectieux au 30 janvier 2017

Institut des Agents Infectieux
Groupement Hospitalier Nord
Bâtiment O – CBPN
103 Grande-Rue de la Croix Rousse
69317 LYON Cedex 04
No Tel. unique : 04 72 07 11 11
FAX
CR 24041



Hospices Civils de Lyon

IAI – Bactériologie

Plateau de Bactériologie Conventielle

UF 24430

Drs Michèle PEROUSE de MONTCLOS et Olivier DAUWALDER
Cadres de santé : Marine ARLIE, Ghislain BAUD

Biologistes :

- Laetitia BERAUD
- Coralie BOUCHIAT
- Olivier DAUWALDER
- Ghislaine DESCOURS
- Anne DOLEANS-JORDHEIM
- Mona DUMITRESCU
- Céline DUPIEUX-CHABERT
- Jean FRENEY
- Christine FUHRMANN
- Pascale GIRARDO
- Claude-Alexandre GUSTAVE
- Elisabeth HODILLE
- Sophie JARRAUD
- Frédéric LAURENT
- Gérard LINA
- Michèle PEROUSE de MONTCLOS
- Anne-Gaëlle RANC
- Jean-Philippe RASIGADE
- Chantal ROURE-SOBAS
- Wael SALKA
- Héliène SALORD
- Anne TRISTAN
- François VANDENESCH

Techniciens :

- Monique AMIOT
- Aurélie BARBIER
- Mawaheb BEN SAID
- Faiza BONNOT
- Antony BUATHIER
- Coralie BUJS
- Dylan CALABRESI
- Lilian CARASSAI
- Monique CHAMBEAUD
- Laura CHANEL
- Marina CHAROBERT
- Adeline CHEVROT
- Nadine CLARET
- Nathalie COTE
- Bernadette DAMIRON
- Katia DELAHOUGUE
- Vincent DELAPIERRE
- Alicia EHMKE
- Cécile EYMARD
- Sonia FARRAH
- Marie FILONI
- Émilie FRIGOULIER
- Valérie GRIMARD
- Laura HERTZOG
- Emelyne JEANNE
- Anne Lisé JODAR
- Isabelle JOLY
- Joëlle JULLIA
- Zaïneb KHAMMAR
- David KHAU
- Isabelle LATOUR
- Christelle LOISY
- Marion LONCHAMPT
- Laura MAILLOT
- Corine MANAS
- Agnès MARINE
- Lydie MEGDAD
- Agathe MICHEL
- Agnès MOURY
- Marion MULIER
- Christine PIOLE
- Chantal POLGE
- Marie POULAIN
- Martine QUESADA
- Fanny RAYMOND

- Monique REVEIL
- Laurence RODIER
- Claire ROJAS
- Kevin SANTOS
- Marine SIDIBE
- Suzanne SOLLIER
- Amy TETUE
- Christine VIANEY
- Sylvie VILLEGAS
- Florine VINCENT
- Isabelle VITURAT
- Pascaline WAREZ
- Zahia YAGOUB
- Leslie ZUBIRI

Internes participants à la validation biologique :

cf. liste des internes du semestre dans Kalilab (qualification « BACT Internes de jour N1/N2 »)



Secteur Mycobactéries

UF 24431

Dr Oana DUMITRESCU
Cadres de santé :
Marine ARLIE, Ghislain BAUD

Biologistes :

- Oana DUMITRESCU
- Isabelle FREDENUCCI
- Elisabeth HODILLE
- Gérard LINA
- Michèle de MONTCLOS
- Jean Philippe RASIGADE

Techniciens :

- Monique AMIOT
- Laura HERTZOG
- Laura MAILLOT
- Lydie MEGDAD
- Agnès MOURY
- Fanny RAYMOND
- Claire ROJAS
- Suzanne SOLLIER
- Amy TETUE
- Pascaline WAREZ
- Zahia YAGOUB

Secteur CNR Légio

UF 24844

Dr Sophie JARRAUD
Cadre de santé : Aline BILLOUD

Biologistes :

- Laëtitia BERAUD
- Ghislaine DESCOURS
- Sophie JARRAUD
- Anne-Gaëlle RANC

Techniciens :

- Joëlle CHASTANG
- Lucie CHAVEROT
- Karine DROITCOURT*
- Jeremy REBOULET
- Isabelle ROYET
- Marielle SIFFERT

*remplacée par Noémie FESSY

Ingénieur :

Christophe GINEVRA

Secteur CNR Staph

UF 24845

Dr Anne TRISTAN
Cadre de santé : Aline BILLOUD

Biologistes :

- Michèle BES
- Coralie BOUCHIAT
- Céline DUPIEUX-CHABERT
- Claude-Alexandre GUSTAVE
- Frédéric LAURENT
- Anne TRISTAN
- François VANDENESCH

Techniciens :

- Nadia BOULEGROUN
- Caroline BOUVEYRON
- Roxanne SCHNEL
- Christine GARDON
- Charline VUILLOT

Ingénieure :

- Patricia MARTINS-SIMOES

Internes participants à la validation biologique :

cf. liste des internes du semestre dans Kalilab (qualification « BACT Internes de jour N1/N2 »)

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.

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

- le R+5 est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie,
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique),
- le R+2 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24,
- le R+3 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie-Hématologie 24h24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée,
- le **R+1 héberge le CNR des staphylocoques**, le CNR des Légionelles, l'hygiène environnementale et la Parasitologie-Mycologie non automatisée.



L'étage des CNR de Bactériologie.

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (Figure 1). Les CNR bénéficient par ailleurs de toute l'infrastructure et des différents plateaux de l'IAI, notamment les outils d'identification MALDI-TOF et d'antibiogramme du plateau de microbiologie 24/24 (R+2), les outils de biologie moléculaire et d'analyse bioinformatique du plateau de Biologie Moléculaire (R+4) et toutes les facilités logistiques du bâtiment. Cela inclut notamment l'existence d'un secrétariat centralisé pour l'ensemble de l'IAI assurant une réponse téléphonique 6 jours sur 7 sur un n° unique. En dehors des heures ouvrables et le week-end, ce numéro est basculé sur les n° d'astreinte sur site. Ainsi, un interlocuteur pour le CNR est pratiquement toujours disponible au minimum pour orienter la réponse. Outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie, incluant celles du CNR, le laboratoire a acquis un outil de gestion de base de données spécifique pour les CNR sur une base du logiciel BioNumerics® hébergé sur un serveur sécurisé à la direction de l'informatique des hospices civils de Lyon.



Figure 21- Espaces du R+1 (en jaune) affectés aux CNR de Bactériologie (Staphylocoques et Légionelles)

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

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

1.4.2. Structure qualité du laboratoire

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 22).

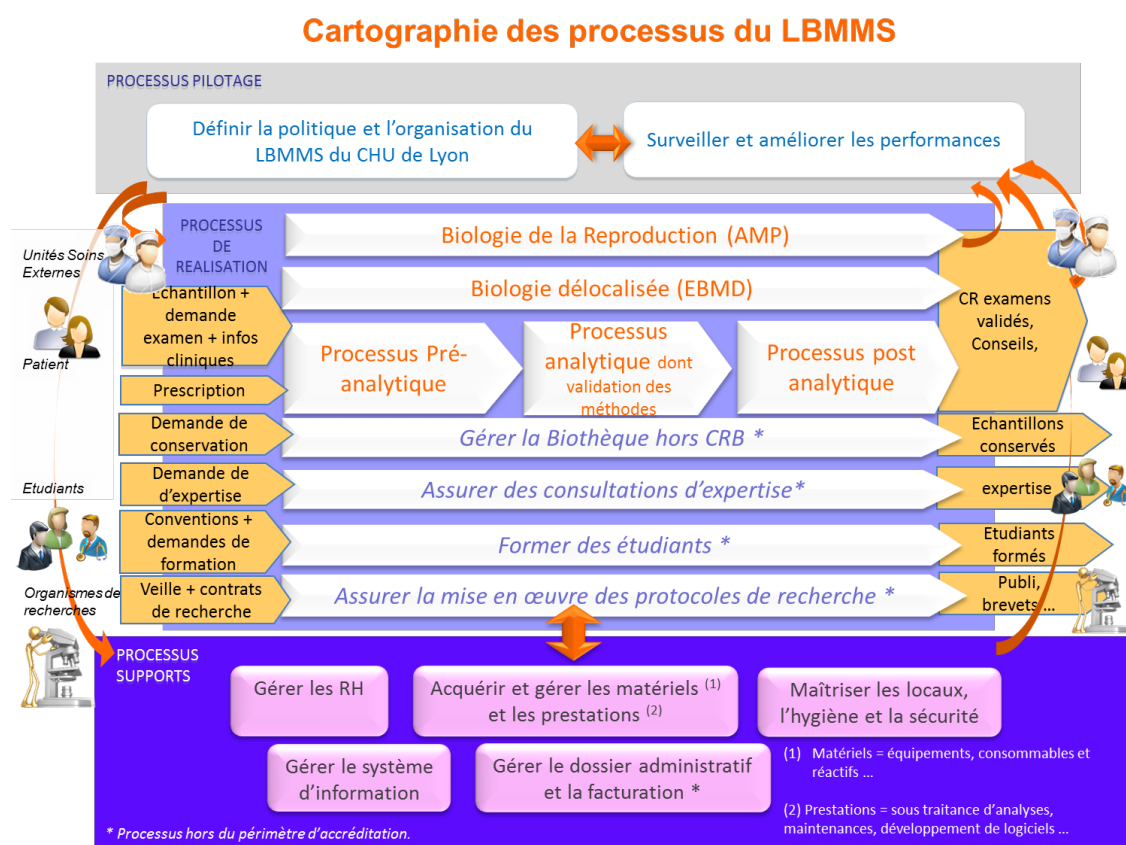


Figure 22- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-03)

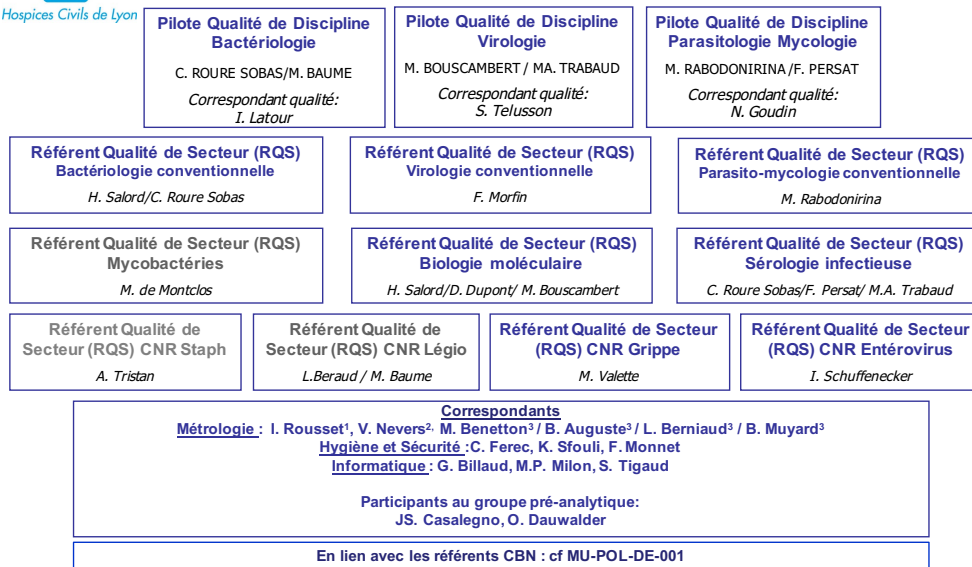
Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur.

Le CNR des staphylocoques s'appuie également sur l'ingénieure qualité affectée au CNR. La figure 23 représente l'organigramme qualité de l'IAI (valide en avril 2017).



Hospices Civils de Lyon

Organigramme Qualité I.A.I



*RQS correspond au Référent Qualité de Site dans Kalilab, ici appliqué aux secteurs de l'IAI

¹ Plateau de Biologie Moléculaire / Bactériologie

² Plateau de Biologie Moléculaire / Virologie

³ Plateau de Sérologies Infectieuses

Figure 23- Organigramme qualité 2017 de l'IAI

Un manuel qualité est disponible qui détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale. Il est complété par la documentation spécifique du CNR des staphylocoques (Annexe 6).

1.4.3. Audits

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

1.4.4. Logiciel de gestion de la qualité

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (200 documents qualité gérés pour le CNR des staphylocoques), (ii) de suivre les compétences du personnel (formations, évaluations et qualifications), (iii) de gérer le matériel et ses maintenances.

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

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

1.4.5. Avancement de la démarche qualité

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici 2020.

L'ensemble des activités font l'objet annuellement d'une revue au cours de laquelle l'atteinte des objectifs et le suivi des indicateurs qualité sont exposés et les axes d'amélioration pour

l'année suivante sont décidés.

L'avancement du plan d'action pour l'accréditation est suivi régulièrement lors de réunions qualité avec l'ensemble du personnel.

Le CNR des staphylocoques est en attente de la validation de son accréditation suite à son déménagement en janvier 2017 sachant que l'audit interne LBMMS effectué en mars 2017 n'a relevé aucun écart et souligné la bonne gestion des risques lors du déménagement.

1.4.6. Contrôles qualité

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

1.4.6.1. CQE Européen de l'ESGS

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

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

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

Le panel de base incluant l'identification, la détermination des CMI de l'oxacilline, de la céfoxitine et de la mupirocine, la détection des gènes de résistance (*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, WGS...)

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

Onze laboratoires incluant 9 pays européens ont participé au premier CQE organisé par le laboratoire de référence de Belgique (Bruxelles – Pr Olivier Denis) fin 2014 : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n =1), France (n=1), Allemagne (n= 2), Grèce (n=1), Pologne (n=1), Portugal (n= 1) et Pays-Bas (n=1).

Pour le 2e CQE organisé également par le CNR belge fin 2015, 6 souches de staphylocoques (*aureus* et non *aureus*) ont été adressées aux 11 participants représentant 10 pays européens : Belgique (n=1), Danemark (n=2), Angleterre (n =1), France (n=1), Allemagne (n= 1), Grèce (n=1), Irlande (1), Pologne (n=1), Pays-Bas (n=1) et Roumanie (n= 1).

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

1.4.6.2. Mise en place d'un contrôle de qualité français

Nous avons mis en place un contrôle externe avec le laboratoire de l'EHGP qui souhaitait évaluer ses techniques de détection de la résistance à la méticilline et des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine. Ce contrôle est renouvelé chaque début d'année. Il est prévu de l'ouvrir aux laboratoires français qui souhaitent adopter la même démarche.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1. Liste des techniques de référence :

2.1.1. Diagnostic/identification

2.1.1.1. Techniques d'identification

PCR agr : Le système agr (accessory gene regulator) est un régulateur global qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Sans être un gène de ménage, ce système n'en est pas moins universel au sein de l'espèce *S. aureus* et le polymorphisme observé, distinguant 4 allèles fortement enracinés dans la phylogénie de l'espèce, a permis de développer une PCR d'espèce qui constitue le test diagnostique de base (avec la détection des gènes de résistance à l'oxacilline) pour toute souche arrivant au CNR.

PCR-séquençage du gène *tuf* pour l'identification d'espèce sur souche : Le séquençage du gène *tuf* a été retenu, parmi plusieurs approches moléculaires de type PCR-séquençage de gènes tels que l'ADNr16S, *hsp60*, *sodA*, *rpoB*, *gap*, comme méthode d'identification des espèces de staphylocoques non *aureus* pour son bon pouvoir discriminant¹⁰. L'amplification-séquençage du gène *tuf* s'est substituée aux multiples techniques conventionnelles (tests biochimiques) et moléculaires longues, fastidieuses, et d'interprétation parfois délicate pour l'identification des staphylocoques. Cette technique est maintenant utilisée au CNR pour toutes les identifications non concluantes de souches par la technique du Maldi-Tof (insuffisance de la base de données) ou lors de résultats atypiques ou aberrants obtenus au cours de la caractérisation complète des souches.

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

Identification de lignées proches de l'espèce *S. aureus* : Les puces à ADN (*S. aureus* genotyping kit 2.0 – Alere technologies) bien qu'étant essentiellement utilisées dans le cadre d'une caractérisation des facteurs de virulence nous ont également permis d'identifier, depuis 2011, 11 souches appartenant à la lignée *Staphylococcus argenteus*. Cette nouvelle espèce ou lignée *S. argenteus*, isolée d'infections humaines et animales¹¹, est assimilée au groupe *S. aureus* dont elle représente la plus proche lignée phylogénétique connue (séquence de rRNA 16S similaire et similitude de nombreux caractères phénotypiques tels

¹⁰ Bergeron M *et al.* Species identification of *Staphylococci* by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-5

¹¹ Tong SY *et al.* Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65:15–22

que la production de certains facteurs de virulence comme la coagulase). Les souches appartenant à cette lignée sont habituellement identifiées *S. aureus* par la technique de Mauditof selon les bases de données actuellement commercialisées. Seules les techniques de séquençage (génom complet ou MLST) ou les puces à ADN permettent d'identifier correctement les souches appartenant à cette espèce. La base de données actuelle utilisée pour l'interprétation des séquences du gène *tuf* (BIBI) n'a pas encore été mise à jour pour la reconnaissance nominative de cette espèce ; cependant lors de l'alignement de la séquence du gène *tuf* de nos souches de *S. argenteus* dans Genbank, la plus forte homologie est observée avec la séquence correspondant au gène *tuf* de la souche MSHR1132, souche type de *S. argenteus* dont le génome entier a été séquencé. Les puces à ADN reconnaissent également l'espèce *S. schweitzeri*, récemment décrite qui est également proche phylogénétiquement de *S. aureus* et *S. argenteus* mais isolée principalement chez les primates non humains en Afrique². Aucune souche appartenant à cette espèce n'a été reçue au CNR depuis sa description.

2.1.1.2. Techniques de caractérisation de la virulence

Recherche globale des entérotoxines A-E directement dans les prélèvements cliniques : Le CNR dispose du kit RIDASCREEN® SET Total (R-Biopharm) qui permet la détection globale par technique immunoenzymatique de type sandwich des entérotoxines SEA, SEB, SEC, SED et SEE de *S. aureus*. En cas d'intoxication alimentaire, la présence globale de ces entérotoxines est recherchée par le CNR dans les produits de vomissements des patients ou les liquides gastriques et digestifs autopsiques à l'aide d'une procédure développée avec l'aide du Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-alfort (Anses). Il faut néanmoins noter que ces recherches sont parfois rendues impossibles en raison du pH trop acide du prélèvement et/ou des volumes de prélèvement requis (>10mL) qui ne sont pas toujours disponibles.

Puces à ADN : Le test *S. aureus* genotyping kit 2.0 (Alere technologies) permet de détecter 336 gènes ou allèles de gènes. L'ensemble du protocole permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée.

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

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

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

PCR toxine simplex : en cas de résultat(s) douteux avec la puce à ADN pour un des gènes codant les toxines staphylococciques, le CNR a maintenu en technique de recours des PCR

simplex avec révélation en gel pour les gènes des principales toxines (*sea, seb, sec, sed, sel, sem, seo, sep, seq, ser, eta, etb, etd, tst, lukSF-PV*).

PCR toxine PVL en urgence sur souche

La détection rapide des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser la prise en charge des patients notamment en cas de suspicion de pneumopathie nécrosante. La mise à disposition d'un tel outil peut permettre une confirmation rapide du diagnostic et la mise en place de thérapeutique ciblée (antibiotiques « anti-toxiniques », Immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Pantone Valentine a été mise en place au CNR à partir des souches. La technique utilise une extraction manuelle et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV* avec révélation par incorporation de SYBR GREEN. Le résultat est disponible en 3 heures et peut être transmis immédiatement au laboratoire prescripteur. Un dossier d'accréditation de cette technique (portée B) a été déposé en 2015 par le CNR et l'accréditation du CNR sera prononcée en 2017 (cf chapitre 5, Démarche Qualité).

2.1.1.3. Techniques immunologiques de diagnostic indirect

Sérologies TSST-1 et PVL

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

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

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

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

Si l'isolement des souches de *S. aureus* responsables des signes cliniques doit demeurer un objectif prioritaire, nous avons montré que ces deux sérologies constituent des outils

rétrospectifs pouvant concourir au diagnostic de certaines infections toxiques staphylococciques. Elles sont contributives lorsqu'un diagnostic direct est impossible (notamment lors de traitement antibiotique précoce ayant pu négativer les prélèvements bactériologiques), ainsi que pour estimer le risque de récurrence de MTSS en cas de persistance d'une séronégativité.

La sérologie **PVL** présente un intérêt tout particulier dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même s'il nous reste encore à investiguer la cinétique de séroconversion. Dans le cas de la sérologie **TSST-1**, l'absence d'anticorps à la phase aiguë du choc en période menstruelle est en faveur d'un choc toxique staphylococcique et la persistance d'un taux négatif à distance de l'épisode de choc est associée à un risque accru de récurrence et donc conduit à conseiller aux femmes concernées de s'abstenir d'utiliser des tampons vaginaux.

Une sérologie **alpha-toxine** (toxine du *core genome* de *S. aureus*) a également été mise en place : il s'agit d'une sérologie contrôle (anticorps anti alpha-toxine présents systématiquement dans la population générale en raison de l'expression constante de cette toxine par toutes les souches de *S. aureus* auquel la population est systématiquement exposée).

2.1.2. Typage

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

Identification des groupes agr

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

Caractérisation de la Casette SCCmec

L'élément génétique mobile portant le gène *mecA* est appelé cassette SCCmec ou « *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* ». Il existe plusieurs types de cassette dont la structure et la taille varient. Elles sont toutes formées de deux éléments essentiels : le complexe *mec* et les gènes codant les recombinases. Le complexe *mec* est composé du gène *mecA*, des éléments de régulation *mecI* et *mecR1*. Des variations ont été détectées, notamment des délétions ou des insertions partielles dans les gènes de régulation de *mecA*, donnant naissance à quatre types de complexes *mec* : classe A, B, C, et D. Les gènes codant les recombinases, responsables de l'intégration et de l'excision de la cassette forment eux le complexe *ccr*. Il est impliqué dans l'intégration au niveau d'un site spécifique des cassettes SCCmec. 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 types de cassettes *SCCmec* différentes, chaque clone de MRSA portant une cassette spécifique unique.

Le CNR dispose d'outils de PCR assurant la détection rapide des différents complexes *mec* et *ccr* (PCR-M1 et PCR-M2 de Kondo). Cette approche est complétée par les données provenant directement des puces à ADN qui permettent notamment la détermination des complexes *mec* et des combinaisons de recombinaisons.

Le *dru*-typing

Afin de disposer d'outils complémentaires de caractérisation des clones de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistant à la méticilline, un outil permettant de caractériser rapidement la nature des cassettes *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.

Technique de MLST

Elle consiste en un séquençage de 7 gènes d'environ 500 pb impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de l'espèce *S. aureus* (gènes de « ménage »). Pour chacun des 7 gènes, chaque séquence différente représente un allèle auquel un numéro arbitraire est attribué par la base de données MLST (multilocus sequence type) (<http://www.mlst.net>) quelle que soit l'origine de la différence, mutation ponctuelle ou large recombinaison. Chaque isolat est désigné par la combinaison de sept chiffres formant ainsi le « Sequence Type » ou ST ou profil allélique. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement reliés entre eux et peuvent être alors regroupés au sein d'une même unité : le complexe clonal (CC). Chaque CC est désigné par le numéro du ST considéré comme l'ancêtre à l'aide du logiciel eBURST® permettant de définir des familles. Cette technique, appliquée à partir de l'an 2000 à l'espèce *S. aureus* présente de nombreux avantages : une excellente corrélation avec le PFGE, une excellente reproductibilité, des données facilement comparables car basées sur des séquences génomiques et un échange aisé des données grâce à une base de données accessible par internet et continuellement actualisée. Enfin, cette technique permet la réalisation de modèles d'évolution, permettant de comprendre l'apparition temporelle des clones de *S. aureus*. Sa nomenclature continuera vraisemblablement de perdurer quand le séquençage de génome entier (qui donne lui-même accès à la séquence de ces gènes de ménage) aura progressivement remplacé les autres techniques.

Technique de *spa*-type

Cette technique est basée sur le séquençage de la région polymorphique de la protéine A (codée par le gène *spa*) qui, bien que basée sur le polymorphisme de ce seul gène (délétions, insertions, duplications, mutations ponctuelles), est un bon reflet du fond génétique d'un isolat. A chaque variation tant de la séquence que du nombre des répétitions de 21 paires de bases de cette région variable de la protéine A, un numéro arbitraire est attribué à l'aide du serveur « RidomStaph Type Software » (<http://www.spaserver.ridom.de/>). L'utilisation d'un tel outil permet de collecter et d'harmoniser l'ensemble des données. De plus, les séquences saisies sont automatiquement contrôlées permettant un haut niveau de

qualité. Cette technique génère alors des « types *spa* » (par exemple t004), que le logiciel regroupera au sein de « *spa-CC* » ou complexes clonaux « *spa* », contenant des « types *spa* » proches. Cette technique apparaît comme plus discriminante que la MLST et de réalisation plus facile et moins coûteuse, car ne nécessitant le séquençage que d'un seul gène. Elle reste donc utilisée au CNR en routine. Cependant, cette méthode est moins discriminante que le séquençage de génome entier qui devrait progressivement s'imposer.

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

Cette technique historique est utilisée lors de l'investigation d'épidémies ayant des fenêtres temporelles et spatiales étroites, car c'est une des techniques la plus discriminante à l'exception du séquençage génome entier. L'ensemble des résultats analysés à l'aide du logiciel BioNumerics® permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline. Cette technique est surtout utilisée pour le typage de souches de staphylocoques non *aureus*, espèces pour lesquelles les techniques de *spa*-typing, MLST *aureus*, puces à ADN ne sont pas utilisables.

Puces à ADN

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

2.1.3. Techniques de séquençage

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

Cette méthode est à présent en phase d'évaluation/validation au sein du CNR des Staphylocoques. Le CNR dispose d'un accès à la plateforme de séquençage génomique des HCL qui comporte notamment un séquenceur NextSeq (Illumina). Ce séquenceur permet un débit maximal de 120 Gb (400 millions de « reads ») par run. Dans la présente période d'évaluation, le CNR réalise un run par mois. Entre 40-50 souches sont séquencées par run en utilisant un séquençage « pair-end » (2x150 bp) visant une couverture moyenne de 30x.

Au sein du CNR, les souches d'intérêt clinique et des souches de référence sont choisies pour permettre d'évaluer la performance des données NGS par rapport à l'identification et typage déjà connus (puces ADN, phénotype de résistance, etc). La culture des souches et l'extraction d'ADN sont réalisées par des technicien(nes) du CNR des Staphylocoques et un ingénieur hospitalier du CNR est responsable de la préparation des banques (bibliothèques) d'ADN pour chaque run.

Voir paragraphe 2.1.1.

2.1.4. Evaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

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

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

Détection PLP2a

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

Détection de la résistance aux glycopeptides

Elle est effectuée seulement pour *S. aureus*.

Sont réalisés :

* les CMI vancomycine et teicoplanine par E-test® avec inoculum classique (0.5 McFarland) sur Muller Hinton,

* un criblage par E-test® vancomycine et teicoplanine, avec un inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cerveille selon les recommandations 2015 du Comité de l'Antibiotique de la Société Française de Microbiologie-EUCAST (CA-SFM EUCAST).

* un criblage par GRD E-test® utilisant une bandelette doublement chargée avec teicoplanine et vancomycine qui a montré des performances excellentes pour la détection des souches VISA et hétéroGISA.

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

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

- sans induction sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.
- 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. 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*. A ce jour, aucune souche de *S. aureus* portant ce mécanisme de résistance n'a été identifiée en France.

Détermination de la résistance aux antibiotiques par puces à ADN

La puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® comme décrit plus haut permet en une seule réaction de PCR et d'hybridation d'avoir accès à un large panel de gènes. Quarante-neuf gènes ou variants de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et antiseptiques chez *S. aureus* sont criblés avec la puce à ADN (Tableau 7). 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.

Tableau 7- Ensemble des gènes de résistance détectés avec la puce à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere)

<i>blaZ</i>	<i>mpbBM</i>	<i>sat</i>	<i>fexA</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>	

Détermination de la résistance au linézolide

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

- . des PCR spécifiques ciblant le locus *cfrA*, le locus *cfrB* (décrit en 2015) en position plasmidique qui codent des méthylases modifiant l'ARN 23S à la position 2503, ont été développées. Les souches que le CNR a été amené à expertiser étaient essentiellement des staphylocoques à coagulase négative adressés pour recherche spécifique du mécanisme associé à une résistance au linézolide détectée phénotypiquement par le laboratoire demandeur. Il faut noter que le premier *S. aureus* positif pour le gène *cfrA* a été détecté en juillet 2015. Cette modification confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (Linézolide), Pleuromutilins et Streptogramine A. Ce mécanisme conduit à des 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 *cfrA*.

- . une PCR spécifique ciblant le locus *optrA* (décrit en 2015) en position plasmidique qui code pour un ABC-transporteur conférant une résistance de haut niveau au linézolide, a été récemment mise en place au CNR.

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

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

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

2.2. Liste des 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 :

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

Le CNR est à même de fournir des souches représentatives des différents clones de *Staphylococcus aureus* sensibles (SASM) ou résistants à la méticilline (SARM) diffusant actuellement en milieu hospitalier (SARM-H) et dans la communauté (SARM-C) (France et Pays étrangers), ainsi que des souches représentatives des différentes formes cliniques (SARM ou SASM) : pneumonies nécrosantes, choc toxique staphylococcique, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique, etc. Ces souches sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) aux laboratoires académiques et hospitaliers sur demande motivée adressée au responsable du CNR sous réserve sous réserve de signature d'un accord de transfert de matériel entre les parties (les HCL et le laboratoire demandeur- Annexe 4).

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

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.

3. 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	- 97 patients avec une pneumonie à <i>S. aureus</i> producteur de PVL (PVL+) et 97 patients PVL-
Etude épidémiologique	
Etude immunogénétique	- Tous les patients PVL+ et 130 membres de leur famille
Critères d'inclusion	- Consentement éclairé - Sujets affiliés (ou bénéficiaire) à un régime de sécurité 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
Etude épidémiologique	
Etude immunogénétique	
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.

4. Annexe 4- Lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques

(A faire en double exemplaire)

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

au Centre National de Référence des Staphylocoques désigné 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 :

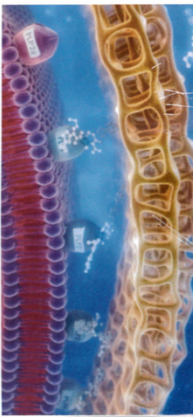
Organisation :

Adresse :

Signature

Date

5. Annexe 5- Programme Postgraduate Education Course - Virulence and resistance in *Staphylococcus aureus*: 2016 state of the art”



Target Audience
20 – 40 young microbiologists and infectious disease physicians with basic knowledge in bacteriology.

Faculty Members
Coralie Bouchat, Lyon, France
Rafael Canton, Madrid, Spain
Olivier Dautwalder, Bron, France
Dina Dumitrescu, Lyon, France
Celine Dupieux, Lyon, France
Tristan Ferry, Lyon, France
Thomas Geissmann, Lyon, France
Yves Gillet, Lyon, France
Hajo Grundmann, Freiburg, Germany
Luca Guarabassi, Basseterre, Saint Kitts and Nevis
Stephan Harbarth, Geneva, Switzerland
Mathias Herrmann, Homburg/Saar, Germany
Barbara Kahl, Münster, Germany
Angela Kearns, London, United Kingdom
Winfried Kern, Freiburg, Germany
Frédéric Laurent, Lyon, France
David Lebeaux, Paris, France
Gerard Lina, Lyon, France
Joel Lindau, London, United Kingdom
Johan Mouton, Rotterdam, Netherlands
Tarek Msaicki, Paris, France
Jean-Philippe Haselgott, Lyon, France
Stefan Schwarz, Neuss/Stadt-Kaisersesch, Germany
Robert Skov, Copenhagen, Denmark
Ajana Tambic, Zagreb, Croatia
Anne Tristan, Lyon, France
Florent Valour, Lyon, France
Françoise Van Bambeke, Brussels, Belgium
François Vandenesch, Bron, France
Thierry Wirth, Paris, France


Contact
Frédéric Laurent
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
Centre National de
Référence des staphylocoques
59 Boulevard Pinel
Bron Cedex, France
Phone +33 472 071 837
Fax +33 472 129 626
frederic.laurent@univ-lyon1.fr

Administrative Secretariat
Hélène Meugnier
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
Centre National de
Référence des staphylocoques
59 Boulevard Pinel
Bron Cedex, France
Phone +33 472 129 621
Fax +33 472 129 626
helene.meugnier@chu-lyon1.fr

Contact Person (Scientific Programme)
Frédéric Laurent
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
Centre National de
Référence des staphylocoques
59 Boulevard Pinel
Bron Cedex, France
Phone +33 472 071 837
Fax +33 472 129 626
frederic.laurent@univ-lyon1.fr

Picture outside: Schematic structure of the penicillin binding protein and penicillin-resistant Staphylococcus aureus (S. aureus) (Frédéric Laurent, Picture Inside: Intracellular Staphylococcus aureus (Electronic microscopical), courtesy of Frédéric Laurent)

© ESCMID, December 2015



ESCMID
MANAGING INFECTIONS
PROMOTING SCIENCE

ESCMID Postgraduate Education Course
Virulence and Resistance in *Staphylococcus aureus*: 2016 State of the Art

Lyon, France
28 June – 1 July 2016

ESCMID Postgraduate Education Course
Virulence and Resistance in *Staphylococcus aureus*: 2016 State of the Art

Organizer
ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ES55)

Co-Organizers
• The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)
• ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ES5A5S)
• ESCMID Study Group for Bloodstream Infections and Sepsis (ES5B5S)
• ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ES5E5K)
• ESCMID PK/PD of Anti-Infectives Study Group (EPASG)

Course Coordinators
• Frédéric Laurent, Lyon, France
• François Vandenesch, Bron, France

Course Objectives
• To provide to postgraduate microbiologists and infectious disease physicians (with basic knowledge in bacteriology) an updated overview of pathophysiology and resistance in *Staphylococcus aureus*.
• To give to participants the opportunity to have state of the art, new insights and scientific exchanges on virulence and resistance on these pathogens including:
– Mechanisms of resistance and virulence *in vivo*
– data, clinical management
– Screening, detection and identification of virulence and resistance determinants in the daily lab
– Infection control practice

6. Annexe 6- Sommaire du Manuel qualité du laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

MANUEL QUALITE

Version : 03

Référentiels NF ISO EN 15189 et NF ISO EN 22870

Page 2/50

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
PRESENTATION DU LABORATOIRE	7
ORGANISATION DU LABORATOIRE	10
A / DEFINIR LA POLITIQUE ET L'ORGANISATION DU LBMMS	12
A1. Politique qualité et engagement de la direction	13
A2. Organisation des responsabilités	13
A3. Organisation de la qualité au LBMMS	15
A4. Communication et éthique	16
A4.1 Communication interne	16
A4.2 Communication avec les professionnels de santé	16
A4.3 Communication avec les patients	18
A4.4 Ethique	18
B / SURVEILLER ET AMELIORER LES PERFORMANCES	19
B1. Satisfaction clients	20
B2. Suivi des indicateurs	21
B3. Gestion des audits internes	21
B4. Maîtrise des non-conformités	21
B5. Gestion des actions correctives et préventives	22
B6. Revue de processus et revue de direction	23
C / PRE-ANALYTIQUE	24
D / ANALYTIQUE	26
E / POST-ANALYTIQUE	28
F / BIOLOGIE DELOCALISEE	30
G / GERER LES RESSOURCES HUMAINES	33
H / GERER LE SYSTEME D'INFORMATION	35
H1. Maîtrise de la documentation	35
H2. Maîtrise du système informatique	37

Ce document ne peut être reproduit sans l'autorisation du laboratoire (MU-POL-MQ-001-03)

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

MANUEL QUALITE

Version : 03

Référentiels NF ISO EN 15189 et NF ISO EN 22870

Page 3/50

I / ACQUERIR ET GERER LES MATERIELS ET LES PRESTATIONS	38
I1. Maîtrise des achats	39
I2. Maîtrise des matériels, réactifs et prestations	40
I3. Sous-traitance	41
J / MAITRISER LES LOCAUX, L'HYGIENE, ET LA SECURITE	42
K / PROCESSUS HORS PERIMETRE D'ACCREDITATION	44
K1. Gérer le dossier administratif et la facturation	44
K2. Assurer la mise en œuvre des protocoles de recherche	45
K3. Gérer la Biothèque hors Centre de Ressources Biologiques des HCL	45
K4. Assurer des consultations d'expertises	45
K5. Former des étudiants	45
ANNEXE 1- POLITIQUE QUALITE DU LBMMS DU CHU DE LYON	46
ANNEXE 2- DOMAINES, SOUS DOMAINES et familles du LBMMS du CHU de Lyon	48
ANNEXE 3- Corrélation NF EN ISO 15189 et MAQ	49

Version : 01	Date d'application : 01/06/2013
Version : 02	Date d'application : 15/05/2014
Version : 03	Date d'application : kalilab
Motif de révision : Mise à jour	
Rédaction : PILOTES DE PROCESSUS	
Vérification : Mylène GADOUX, RAQ LBMMS	
Approbation : Pr Claude NEGRIER, Biologiste responsable du LBMMS, Chef de Pôle Activité Médicale Biologie et Anatomie et Cytologie Pathologiques	