

Rapport annuel d'activité

2020

**Centre national de référence des
Staphylocoques**

Directeur : Pr F. Vandenesch

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

**Année d'exercice
2019**



1	MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	9
2	ACTIVITES D'EXPERTISE	11
2.1	ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES.....	11
2.2	TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES	12
2.3	TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	13
2.4	COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	13
2.5	ACTIVITES D'EXPERTISE	13
2.6	ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	14
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	16
3.1	DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES	16
3.2	SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	17
3.2.1	<i>Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique</i>	17
3.2.2	<i>Syndromes d'exfoliation staphylococcique</i>	19
3.2.3	<i>Infections suppuratives à S. aureus PVL+</i>	20
3.2.4	<i>Furonculoses familiales</i>	22
3.2.5	<i>Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine</i>	22
3.2.6	<i>Intoxications alimentaires individuelles et collectives</i>	24
3.2.7	<i>Ostéites et infections ostéo-articulaires</i>	24
3.2.8	<i>Sérologies PVL et TSST-1</i>	25
3.3	SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	26
3.3.1	<i>Définition de l'échantillon de souches testées</i>	26
3.3.2	<i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	28
3.3.3	<i>Résultats : distribution en fonction des critères pertinents et analyse des tendances</i>	28
3.3.3.1	Résistance aux bêta-lactamines	28
3.3.3.2	Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides.....	30
3.3.3.3	Détection de la résistance au linézolide.....	31
3.3.3.4	Détection de la résistance à la daptomycine	33
3.3.3.5	Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux	34
3.3.4	<i>Analyse des tendances</i>	34
3.4	INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	35
3.5	ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	35
4	ALERTE.....	36
4.1	LA PROCEDURE D'ALERTE DE SANTE PUBLIQUE FRANCE ET DE LA DGS EN CAS DE DETECTION DE PHENOMENE ANORMAL, LES EVENEMENTS AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE AU COURS DE L'ANNEE	36
4.2	DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	36
4.2.1	<i>Épidémies de S. aureus dans plusieurs services de néonatalogie en France</i>	36
4.2.2	<i>Augmentation du signalement d'infections cutanées chez les militaires</i>	41
4.2.3	<i>Recherche de lien de clonalité</i>	41
4.3	ANALYSER DES TENDANCES ET LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME LORS DE L'ALERTE.....	42
5	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	43
5.1	CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE.....	43
5.1.1	<i>Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé, Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques</i>	43
5.1.2	<i>Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)</i>	43
5.1.3	<i>Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :</i>	43
5.1.4	<i>Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...</i>	44
5.2	CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	44
5.3	CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC ...)	45
6	TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	46
6.1	ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS LORS DE L'ANNEE N, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR.....	46
6.2	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE L'ANNEE N, CONCERNANT UNIQUEMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR	51

7	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	54
8	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....	54
8.1	ACTIVITES D'EXPERTISE	54
8.1.1	<i>Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer.....</i>	<i>54</i>
8.1.2	<i>Les techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement ou dont le développement est prévu</i>	<i>54</i>
8.1.3	<i>Les travaux d'évaluations de techniques et des nouveaux antibiotiques envisagés</i>	<i>54</i>
8.1.4	<i>Les travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR.</i>	<i>55</i>
8.2	ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION	55
8.2.1	<i>Les projets de formation envisagés.....</i>	<i>55</i>
8.2.2	<i>Les modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et les modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR.....</i>	<i>55</i>
8.2.3	<i>Les collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales</i>	<i>55</i>
8.3	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	55
8.3.1	<i>Les projets de constitution, développement, animation de réseaux de partenaires.....</i>	<i>56</i>
8.3.2	<i>La contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels...</i>	<i>56</i>
8.3.3	<i>La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux.....</i>	<i>56</i>
8.3.4	<i>Les projets d'enquêtes ou études concourant à la surveillance</i>	<i>56</i>
8.4	CONTRIBUTION A L'ALERTE	57
	ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	58
	ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	66
	ANNEXE 3 : AUTRES INFORMATIONS (NON DESTINEES A ETRE RENDUES PUBLIQUES).....	74
	ANNEXE 4 : LETTRE D'AGREMENT POUR TRANSFERT DE MATERIEL DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES STAPHYLOCOQUES	75
	ANNEXE 5 : SOMMAIRE DU MANUEL QUALITE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES DU CHU DE LYON	77

Préambule

Un rapport annuel d'activité pour l'année N doit être transmis par chaque CNR à Santé publique France à la fin du premier trimestre de l'année N+1.

*L'objectif de ce document est de fournir aux CNR un cadre de présentation homogène (**plan-type**) des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés lors de l'année N.*

*Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter **un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.***

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

*Ce rapport doit inclure un **résumé analytique (en français et en anglais)** destiné à être publié sur le site de Santé publique France.*

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- *Les **annexes 1 et 2** ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. **Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...)** doivent figurer dans le corps du rapport.*
- *L'**annexe 3** regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT, détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées. Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.*

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité.

A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

Résumé analytique

Expertise, surveillance, alerte, information, formation et conseil sont les mots clés des missions des CNR. Sur cette base les principaux résultats et faits marquants de l'année 2019 du CNR des staphylocoques sont les suivants :

- **en matière d'expertise**, le CNR a poursuivi son activité d'expertise sur un rythme toujours très soutenu avec 2420 souches analysées, 517 souches et ADN distribués, avec un nombre de correspondants toujours très élevé issus de 94 départements métropolitains ou des DROM COM

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

- la détection de cas groupés et l'affirmation ou l'infirmité de la transmission grâce à l'utilisation maintenant exclusive du NGS pour l'investigation de ces cas, avec plus de 40 épisodes ou situations épidémiques investiguées en 2019, soit le double du nombre étudié en 2018 ; l'extrême résolution de l'analyse génomique ayant parfois permis de conclure formellement là où les méthodes conventionnelles ne l'auraient pas pu.

- un nombre important de signalements et d'investigation de cas groupés et d'épidémies dans les services de néonatalogie impliquant des souches SARM et SARM de différentes lignées : CC1 MRSA-IV ; CC5 MRSA-I *tst* Géraldine ; CC8 MRSA-IV *sek, seq* ; CC30 MSSA *sea, tst* ; CC121 MSSA *eta*, et d'autres ... Dans certains cas ces clones semblent établis de manière endémique au sein des services et sont à l'origine de résurgence épidémiques itératives. Ce phénomène est peut-être en lien avec l'augmentation de la prématurité, les pratiques favorisant les liens physique parents-nouveau nés (peau-à-peau, banalisation des téléphone portables dans l'environnement des couveuses) et des tensions en matière de ressources en personnel dans les services de néonatalogie.

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

- la surveillance de l'évolution des clones de SARM et de SARM en France où l'on note une relative décroissance des clones de SARM communautaires historiques (ST80, 17% des infections suppuratives en 2019 vs 25% en 2018 ; USA300, 10% des infections suppuratives en 2019 vs 19% en 2018) au profit d'autres clones internationaux comme le Southwest Pacific clone (19% des infections suppuratives en 2019 vs 8% en 2018) ou de nouvelles lignées tel le CC152 PVL+ incluant des SARM et des SARM. Au sujet de cette lignée CC152-MSSA PVL, on notera qu'elle est responsable de 58% des pneumonies à *S. aureus* PVL positive adressées au CNR en 2019. Par comparaison, cette lignée représentait seulement 20% des souches de *S. aureus* PVL-positives collectées dans le PHRC pneumonie du CNR entre 2011 et 2016. Il s'agit donc peut-être d'un pathovar émergent.

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

- par la poursuite en 2019 de l'organisation d'un contrôle de qualité à destination des CNR Européens.

- par son importante visibilité aussi bien médiatique qu'auprès de la représentation nationale (audition de G. Lina par la délégation aux droits des femmes de l'Assemblée nationale pour la mission d'information sur les menstruations) concernant le choc toxique staphylococcique.

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

Contexte COVID 19. Bien que ce rapport ne concerne officiellement que l'année 2019, la crise du COVID survenue en 2020 nous incite à faire un point spécifique sur SARS COV2 et Staphylocoques. Les connaissances acquises par

le CNR sur les pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de LPV survenant fréquemment dans les suites d'une infection respiratoire virale, faisaient craindre une recrudescence de ces tableaux gravissimes chez les patients atteints de SARS COV2. De manière inattendue, les surinfections à *S. aureus* PVL sont restées marginales (aucun cas adressés au CNR avec cette information) et les surinfections documentées à *S. aureus* l'ont été dans des contextes classiques de pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez des sujets de réanimation.

Analytic Summary

Expertise, Surveillance, alert, information, formation, advices are the key words of the NRC missions. On this basis the major achievement of the year 2019 are the following:

- **regarding expertise**, the NRC received as in the past year an impressive number of strains and DNA for characterization (2420), conversely, 517 strains or DNA were sent to requesting laboratories.

- **regarding surveillance and alert**, the NRC has been proactive in this field on the following major points:

- detection, prove or disprove transmission based on NGS approaches which has become our routine tool to investigate more than 40 suspected cases (twice as much as in 2018), allowing definite conclusion because of its resolution at the SNP level, contrasting with the use of previous methods that imposed more cautious conclusions.

- a significant number of signaling and outbreak investigation in neonates ICU involving both MSSA and MRSA of various lineages : CC1 MRSA-IV ; CC5 MRSA-I *tst* Géraldine ; CC8 MRSA-IV *sek, seq* ; CC30 MSSA *sea, tst* ; CC121 MSSA *eta*, and others. In some cases, these clones seem established endemically within services and are the cause of iterative epidemic resurgence. This phenomenon might be a consequence of increase premature child, the development of parental contact with neonates (skin-to-skin, common use of cell-phone in the vicinity of incubators), and the human resources shortages in neonate ICU.

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

- monitoring of the evolution of MSSA and MRSA clones in France where there is a relative decrease in historical community MRSA clones (ST80.17% of suppurative infections in 2019 vs 25% in 2018; USA300, 10% of suppurative infections in 2019 vs 19% in 2018) for the benefit of other international clones such as the Southwest Pacific clone (19% of suppurative infections in 2019 vs 8% in 2018), or new lineages such as CC152 PVL + including MRSA and MSSA. Regarding this CC152-MSSA PVL lineage, it should be noted that it is responsible for 58% of PVL-positive *S. aureus* pneumonia sent to the CNR in 2019. By comparison, this lineage accounted for only 20% of *S. aureus* PVL-positive strains collected in frame of the PHRC pneumonia lead by the NRC between 2011 and 2016. It is therefore perhaps an emerging pathovar.

- **regarding advice, formation, information and scientific animation**, beside its participation to various ad-hoc committees for outbreak investigation, the NRC has achieved the following activities:

- Within the frame of the European study group on Staphylococci (ESG) of the ESCMID, the French NRC organized again in 2019 an external quality control for the other European NRCs.

- by its high visibility both in the media and with the national representation (hearing of G. Lina by the delegation for women's rights of the National Assembly for the information mission on menstruation) concerning the toxic staphylococcal shock.

- Finally, the NRC participates to **an integrative research** « bed to bench & bench to bed » through a strong link with our INSERM research team focused on Staphylococcal Pathogenesis. An important number of research articles with direct link to the NRC activity were published as well as more fundamental articles with potential input for human health.

COVID-19 Context. Although this report officially only concerns the year 2019, the COVID crisis that occurred in 2020 prompts us to make a specific update on SARS COV2 and Staphylococci. The knowledge acquired by the NRC on necrotizing pneumonia caused by PVL-producing *S. aureus*, which frequently occurs in the aftermath of a viral respiratory infection, raised fears of a resurgence of this deadly clinical syndrome in patients infected by SARS-COV2.

Unexpectedly, the superinfections with *S. aureus* PVL remained marginal (no cases referred to the CNR) and the documented superinfections with *S. aureus* were in classic contexts of pneumonia acquired under mechanical ventilation in ICU patients.

1 Missions et organisation du CNR

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

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

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

1. Secteur virulence et épidémiologie

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

2. Secteur résistance

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

3. Secteur sérologie

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

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

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

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

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

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

L'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici fin 2020.

Cf Annexe 1.

2 Activités d'expertise

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

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

Pour les recherches de liens de clonalité, en fonction des espèces de staphylocoques, l'expertise est effectuée avec le NGS. Le CNR implémente actuellement les approches génomiques, en vue d'une part d'une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des clones épidémiques et d'autre part à l'échelle de la microévolution pour l'investigation de cas groupés.

Concernant les souches de staphylocoques reçues pour évaluation de la sensibilité aux antibiotiques, les techniques sont également identiques à celles utilisées précédemment en attendant l'implémentation en 2020 d'un automate permettant de disposer de résultats de CMI vraies (Plaques Sensititre® (Thermo Scientific™)). Cette technique avec lecture automatisée a fait l'objet d'une évaluation favorable en 2017-2018.

Éléments clés en termes de production d'expertise :

- 2420 souches reçues
- 94 départements métropolitains ou DROM COM,
- Expertise virulence -> puces à ADN et antibiogramme,
- Expertise clonalité -> puces à ADN et/ou séquençage
- Expertise résistance -> Antibiogramme par diffusion +/- CMI en microdilution + analyse de population pour les glycopeptides +/- gènes de résistance
- Délai moyen de réalisation d'expertise (entre date d'envoi et rendu, hors séquençage) < 7 jours (72h pour PVL urgente)

2.1 Évolutions des techniques

Séquençage génome entier (NGS)

Cette activité en plein développement est détaillée au chapitre 2.6.

Protéomique

En collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon UMR CNRS 5280 (Jérôme Lemoine), le CNR développe actuellement une méthode de protéomique haut débit¹ ciblant une centaine de facteurs de virulence et de régulateurs globaux en vue de déterminer l'expression de ces facteurs dans les souches cliniques. A terme, cette approche permettra de sélectionner de nouveaux biomarqueurs et de développer éventuellement des tests rapides d'identification des pathovars. Ce projet est soutenu par le programme RHU « investissement d'avenir » dans le cadre d'un consortium associant le CNR de la résistance aux antibiotiques, le CNR des staphylocoques et l'Institut des Sciences analytiques. Voir l'annexe confidentielle pour plus de détails.

Détermination de la résistance aux antibiotiques (Sensititre®)

Conformément aux recommandations des comités de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et européenne (EUCAST), le CNR adapte ses méthodes de détermination de la sensibilité des Staphylocoques aux antibiotiques en complétant les méthodes actuellement utilisées (Vitek2®, diffusion et e-tests®) par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide. Dans cette

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

perspective, le CNR a évalué le système Sensititre® (Thermo Scientific™) selon une configuration regroupant des plaques d'incubation lyophilisées ou congelées de 96 puits, un enseigneur automatisé, un lecteur optique automatisé (Thermo Scientific™ Sensititre™ OptiRead™ System), un lecteur optique manuel (Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ System), et un système informatique de gestion des résultats. L'étude s'est déroulée en deux phases (évaluation de la justesse, puis reproductibilité) entre septembre 2016 et avril 2017. Au vu des résultats de cette étude, des panels d'antibiotiques disponibles et de leurs tarifs, ainsi que des recommandations du CA-SFM/EUCAST, le CNR basculera vers ce système de réalisation des antibiogrammes au cours du dernier trimestre 2020. En raison d'un coût unitaire plus élevé que l'antibiogramme actuellement réalisé, la détermination des CMI par ce système sera ciblée sur un nombre plus limité de souches et non sur l'ensemble des souches reçues comme actuellement.

Caractérisation de l'espèce *Staphylococcus argenteus* et mise au point de l'identification de par technologie MALDI-TOF sur la base de données SARAMIS du système VITEK-MS (bioMérieux)

L'identification de l'espèce *S. argenteus*, espèce très proche de *S. aureus*, reste difficile à ce jour par les techniques d'identification de routine des laboratoires de biologie médicale. Une étude menée par Clémentine Maureau (interne en biologie médicale) a permis de caractériser cette nouvelle espèce au niveau phénotypique, génotypique et phylogénétique grâce à une collection de 77 souches du CNR. Elle a également permis de mettre au point 2 superspectres complémentaires sur la base de recherche SARAMIS disponible sur le système VITEK-MS de bioMérieux. Les tests phénotypiques (coagulase, catalase, clumping factor, galeries biochimiques, antibiogrammes) n'ont pas retrouvé de différence notable entre les espèces *S. argenteus* et *S. aureus*. La recherche de leucocidine de Panton-Valentine a permis de mettre en évidence la présence des gènes codant les deux sous-unités de la toxine chez 6 souches de *S. argenteus*. Phylogénétiquement, le Sequence Type ST2250 est le plus commun de l'espèce *S. argenteus* (72%), suivi du ST1223 (24%). Plusieurs lignées ont pu être identifiées grâce au spa typing et au typage MLST, ces lignées étant corrélées à la localisation géographique de la souche. Ainsi le ST1223 est surtout retrouvé en Guyane tandis que le ST2250 est prévalent en Nouvelle Calédonie. La mise au point des super-spectres sur la base de données SARAMIS a permis d'identifier correctement les souches de *S. argenteus*. Afin d'identifier la prévalence de souches *S. argenteus* identifiées en tant que *S. aureus* par la base utilisée en routine par le laboratoire (Myla, bioMérieux), 100 souches du laboratoire choisies de manière aléatoire ont été analysées et aucune n'a été identifiée comme *S. argenteus*. Au final, cette étude montre que la technique MALDI-TOF est une technique fiable permettant de différencier de manière efficace les deux espèces *S. aureus* et *S. argenteus*.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Evaluation des performances du test PBP2a SA Culture Colony Test (Alere – Abbott) sur subcultures précoces d'hémocultures positives à staphylocoques.

Il est primordial de pouvoir déterminer rapidement la sensibilité ou la résistance à la méticilline des staphylocoques responsables de bactériémies pour instaurer précocement une antibiothérapie optimale. Une étude a ainsi été menée au CNR afin d'évaluer la performance du test immunochromatographique PBP2a SA Culture Colony Test® distribué par Alere - Abbott sur des subcultures précoces de *S. aureus* et de staphylocoques à coagulase négative résistants à la méticilline (SARM et SCN-RM) provenant de flacons d'hémoculture positifs.

Au total, 136 isolats de SARM (*mecA*+, n=134 et *mecC*+, n=2) et 36 isolats de SCN-RM ont été testés. À 4 h de subculture des hémocultures positives, l'identification des souches par MALDI-TOF et le test PBP2a SACCT ont été réalisés. Les tests étaient répétés à t=6h et t=24h de subculture lorsque les résultats du PBP2a et/ou du MALDI-TOF n'étaient pas corrects à t=4h.

Les résultats obtenus montrent que le test PBP2a SA Culture Colony Test® présente une excellente sensibilité sur les SARM *mecA*+ (99,3%) et une sensibilité moindre sur les SCN-RM (94,4%) à 4 h de subculture. Le test PBP2a n'a pas détecté les souches de SARM *mecC*+ testées (n=2). La performance de ce protocole sur les SCN-RM est améliorée lorsqu'il est effectué après 6 h de subculture. En effet, une limite de ce protocole pour les SCN est la faible pousse bactérienne obtenue après 4 h de subculture, empêchant parfois la réalisation du test PBP2a.

Conclusion : L'utilisation du test PBP2a SA Culture Colony Test® en combinaison avec le MALDI-TOF sur des subcultures précoces d'hémocultures est donc une technique fiable pour différencier rapidement les bactériémies à

SASM et à SARM *mecA*+. Pour la détection des SCN-RM, un résultat négatif sur une subculture précoce (4 h) doit être interprété avec plus de prudence.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

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

2.4 Collections de matériel biologique

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

En 2019, le CNR a reçu 2420 souches pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles (Cf paragraphe 2.5) et 313 souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

En 2019, nous avons envoyé 517 souches ou ADN à nos correspondants en France (y compris Lyon) (445) et à l'étranger (Angleterre (56), Irlande (11), Suède (2), Suisse (2), Danemark (1)).

Cf Annexe 1.

2.5 Activités d'expertise

Entre 2006 et 2019, le CNR a reçu 31 075 souches de staphylocoques pour expertise (Figure 1) avec une augmentation constante du nombre de souches reçues pour expertise. (A noter les pics en 2011 et 2015 qui correspondent aux nombreuses souches reçues au CNR dans le cadre de différents protocoles).

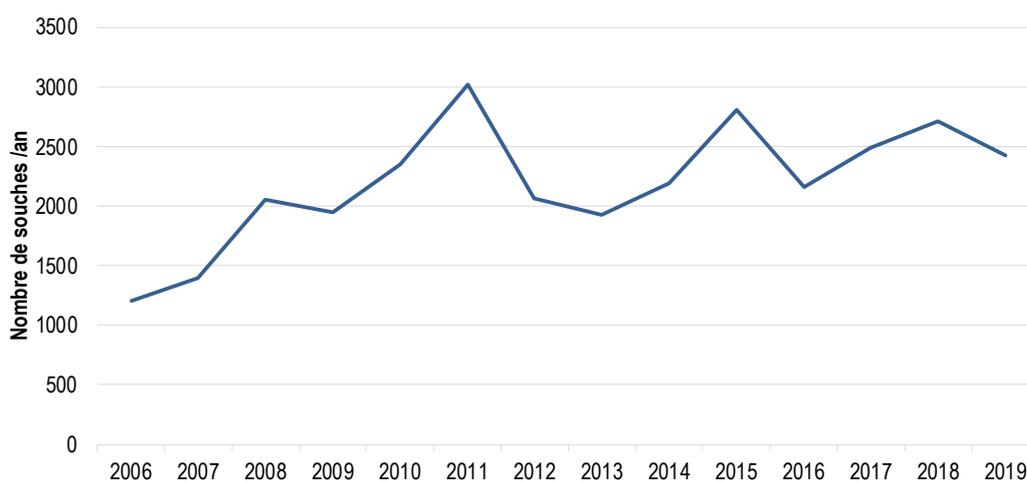


Figure 1- Évolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2019.

En 2019, le CNR a reçu 2420 souches pour expertise (virulence et résistance) hors protocoles. Ces souches provenaient de 94 départements métropolitains ou des DROM COM. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 30 % (Auvergne Rhône-Alpes), 17 % (Ile de France), 10 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions. Quatre pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco et du Luxembourg.

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

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

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

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

En 2019, nous avons reçu **313** souches pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

2.6 Activités de séquençage

Au cours de l'année de 2019, le CNR des Staphylocoques a poursuivi la montée en charge de l'utilisation du séquençage haut-débit (NGS) dans son activité de routine. Le CNR a utilisé pour cela la plateforme NGS des Hospices Civils de Lyon qui met à disposition 1 séquenceur Illumina Miseq et 2 séquenceurs Illumina NextSeq.

Concernant les analyses bio-informatiques, le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines maison. Il faut noter qu'une bio-informaticienne a été recrutée en avril 2017, sur un poste d'ingénieur hospitalier au sein du CNR pour gérer l'ensemble des analyses et projets NGS.

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

- Si OUI :

- Type d'accès (interne ou externe au CNR) : plateforme NGS interne des Hospices Civils de Lyon
- Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : Illumina Miseq et NextSeq

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

- Si OUI :

- Type d'accès (interne ou externe au CNR) : interne
- Outils utilisés pour l'analyse des séquences : le CNR utilise exclusivement des logiciels open source qui sont implémentés via des scripts/pipelines.

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

- Si OUI, pour quelles activités :

- Investigations d'épidémies : OUI (Cf paragraphe alerte)
- Surveillance : OUI (Cf paragraphe surveillance)

- Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles). Les analyses bio-informatiques comprennent les étapes suivantes :

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

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

- Recherche de variants et construction d'arbres phylogénétiques en utilisant une souche de référence adaptée au complexe clonal étudié et les logiciels Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>), fasttree (reconstruction de phylogénies)⁵, et gubbins (détection d'événements de recombinaison)⁶, IGV⁷.

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

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

- Vérification d'insertions et/ou délétions de régions entre souches isogéniques ou des souches mère/filles en utilisant un workflow de mapping de reads : bwa-mem (ref 12 = ancienne ref 5) et IGV.

- **Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies** : nombre de séquences réalisées dans l'année. En 2019, 110 souches ont été séquencées dans le cas d'investigation d'épidémies ou de cas groupés. (Cf paragraphe XX)

- **Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance** : nombre de séquences réalisées dans l'année et modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées. En 2019, 266 souches ont été séquencées comprenant des *S. aureus* et des *S. epidermidis*. En 2019, le CNR a donc opéré une sélection basée sur un compromis entre l'urgence, l'intérêt épidémiologique, la nécessité de constituer une base de données pertinente pour le CNR. L'objectif pour les *S. aureus* était la surveillance du clone CC152-MSSA-PVL+ qui est le clone PVL+ le plus prévalent en France depuis plusieurs années (Cf paragraphe XX) et pour *S. epidermidis*, l'objectif était la surveillance de la résistance notamment au linézolide et la diffusion des clones multirésistants (Cf chapitre 3.3)

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

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

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

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

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

4 Seemann T, *Abricate*, **GitHub** <https://github.com/tseemann/abricate> with the Resfinder – doi:10.1093/jac/dks261 database;

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

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

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

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

9 Anton B et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.

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

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

3 Activités de surveillance

Éléments clefs en termes de surveillance :

- Stabilité des notifications de chocs toxiques staphylococciques malgré la forte médiatisation de cette maladie
- Stabilité du nombre de souches d'infections suppuratives avec un fort taux de PVL (>70%, 95.3% dans les infections primitives)
- Poursuite de l'émergence des CC152 MSSA PVL. Apparition de CC152-MRSA à suivre.
- Poursuite de la croissance du nombre de souches de staphylocoques résistantes au linézolide et à la daptomycine

3.1 Description du réseau de partenaires

Les souches reçues au CNR des staphylocoques sont envoyées par l'ensemble des CHU, CHG de France métropolitaine mais aussi par un nombre croissant de LABM en 2019 notamment pour l'expertise résistance.

En 2019, le CNR a reçu **2420 souches pour expertise** (virulence et résistance) qui sont bien le reflet de l'épidémiologie de l'ensemble des régions françaises hors protocoles.

Ces souches provenaient de **94 départements métropolitains ou des DROM-COM**. Plus de 70 % des souches provenaient de 5 régions principales : 30 % (Auvergne Rhône-Alpes), 17 % (Ile de France), 10 % (Nouvelle Aquitaine), 8 % (Pays de la Loire), 7 % (Hauts de France), et < ou = 5 % pour chacune des autres régions (cf. Figure 2). Quatre pourcent provenaient des DROM-COM (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte, Ile de la Réunion, Tahiti), de Monaco et du Luxembourg.

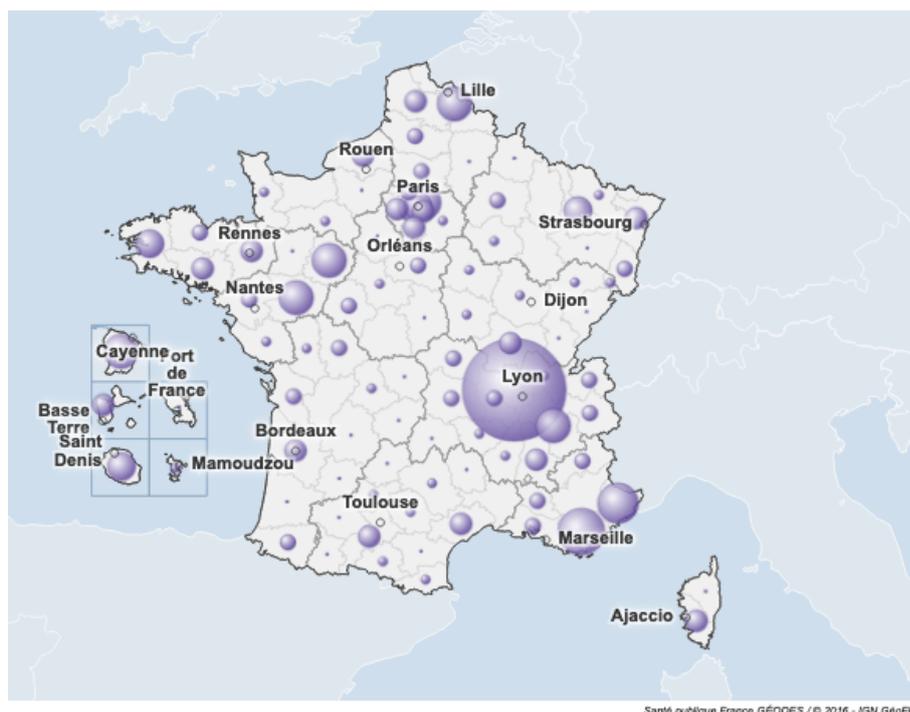


Figure 2- Répartition géographique des souches reçues en 2019 pour expertise (identification, recherche de facteurs de virulence, lien de clonalité ou contrôle de la sensibilité aux antibiotiques)

Nous avons reçu **313 souches** pour protocole ou travaux de recherche de nos correspondants en France et à l'étranger.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé 815 souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et 56 souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 3).

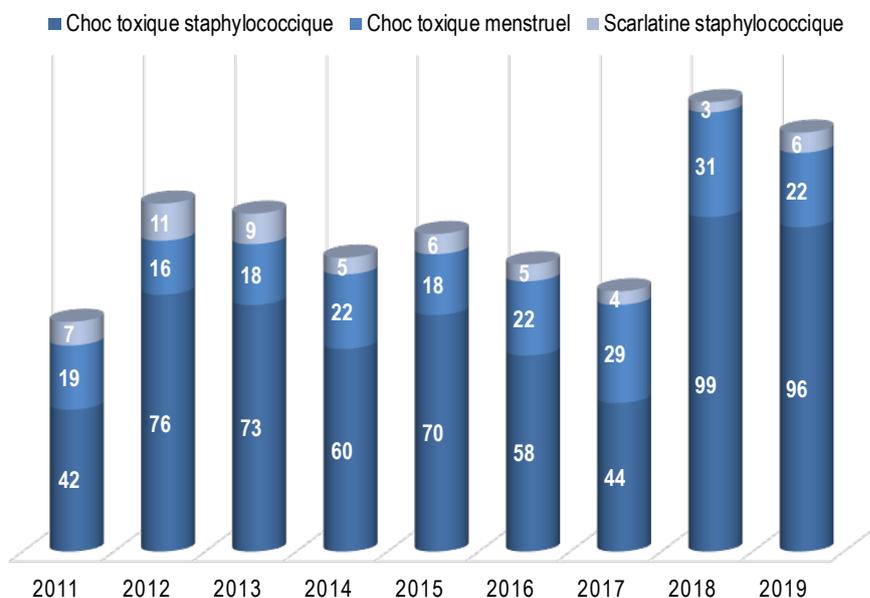


Figure 3- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2011 et 2019.

En 2019, 118 cas de CTS ont été rapportés, dont 22 cas de CTS menstruels. Ces chiffres semblent relativement stables par rapport à ceux des années précédentes.

Concernant les cas de **chocs toxiques menstruels**, l'âge des patientes s'étend de 13,5 à 40 ans avec une médiane de 18,2 ans. La grande majorité de ces souches (21/22) possédaient la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Le complexe clonal CC30-MSSA a été majoritairement retrouvé (16/22 souches soit 73%), clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté. Parmi les 6 souches restantes, on retrouve 4 souches appartenant au complexe clonal CC22-MSSA (TSST-1+), 1 souche au CC45-MSSA (TSST-1+), 1 souche au CC398-MSSA sans superantigènes. Aucune souche de SARM n'est retrouvée.

Lors de la transmission des résultats à ses prescripteurs, le CNR œuvre pour rappeler les données épidémiologiques à sa disposition, ainsi que les éléments de prévention, y compris par la réalisation de sérologie anti-TSST-1 visant à évaluer le risque de récurrence. Sur 16 sérologies anti-TSST-1 réalisées dans le cadre d'un CTS menstruel, 87,5% révélaient l'absence d'anticorps anti-TSST-1. Il a été rappelé aux prescripteurs que cette absence de séroconversion est associée à un risque accru de récurrence de CTS menstruel et doit conduire à la contre-indication du port de tampons ou coupelles périodiques. Attente résultats sérologies 2020

En France, la surveillance des CTS repose sur les données recueillies par le CNR des staphylocoques. Tous les cas de CTS recensés au CNR sont le fait de déclarations spontanées des cliniciens ou des microbiologistes à des fins diagnostiques ou épidémiologiques. Ainsi, depuis que le CNR des staphylocoques recense ces cas, on note une stabilisation du nombre de cas à une vingtaine par an mais en l'absence de déclaration obligatoire il n'est pas possible de connaître la véritable prévalence de cette pathologie en France (Figure 4).

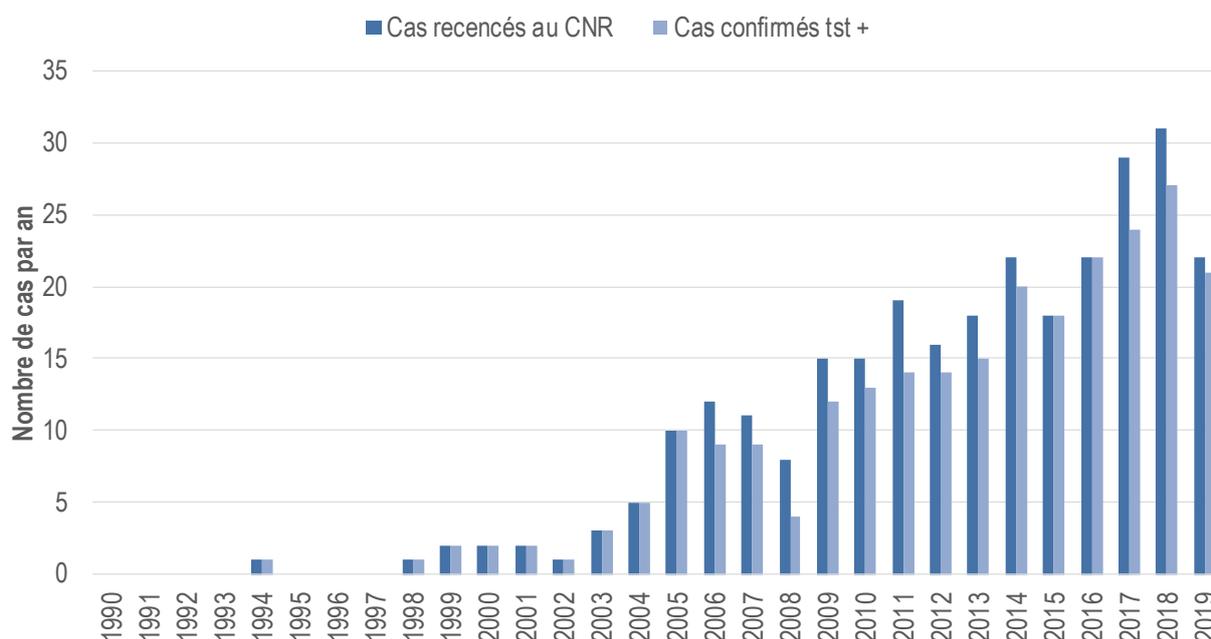


Figure 4 – Évolution du nombre de souches de *S. aureus* reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique d'origine menstruelle (CTS menstruel) entre 1990 et 2019. Données brutes et données restreintes aux cas certains associés à une souche possédant le gène *tst-1*.

Concernant les **chocs toxiques non menstruels**, le CNR a reçu **96 souches** durant l'année 2019, toutes associées à des chocs survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. L'âge des patients s'étend de 0 à 93 ans avec une médiane d'âge de 48 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1,4. Une souche de *S. lugdunensis* a également été expertisée dans le cadre d'un choc septique chez un bébé suite à l'allaitement (mais sans qu'aucun facteur de virulence imputable ne soit détecté).

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

- 29% (n = 28) de souches possédant au moins le gène codant la TSST-1 ;
- 35,4% (n = 34) de souches négatives pour le gène codant la TSST-1 mais possédant au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB, SEC ou SEP) ;
- 35% (n = 34) de souches ne possédant aucun superantigène majeur ;
- 10% (n = 10) de souches possédant les gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine.

La majorité des souches étaient sensibles à la métilcilline (94%). Parmi les clones retrouvés parmi les souches de SARM, le complexe CC30-MSSA reste majoritaire (29% des souches) suivi des clones CC398, CC5 et CC8.

Les 7 souches de SARM appartenaient aux clones suivants :

- 1 souche de clone « Lyon » (CC8-MRSA-IV; clone nosocomial diffusant en France) ;
- 1 souche du clone CC8 ST8-MRSA-[IV+ACME] (PVL+), « USA300 » (clone communautaire épidémique d'Amérique du Nord, rarement isolé en France de cas sporadiques ou de petits foyers épidémiques) ;
- 2 souches du clone CC8-MRSA-V ;
- 1 souche du clone CC121-MRSA-IV (PVL+) ;
- 1 souche du clone CC88-MRSA-IV (PVL+) ;
- 1 souche du clone CC6-MRSA-IV, WA MRSA-51.

En 2019, 6 cas (ou suspicion) de **scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients, était compris entre 0 et 35 ans avec une médiane à 9 ans. Quatre de ces souches possèdent au moins un gène codant un superantigène (TSST-1, SEA, SEB, SEC). Une souche possédait le gène codant la leucocidine de Panton-Valentine

et une souche ne possédait pas de facteurs de virulence. Parmi ces souches on compte 2 CC30-MSSA, 1 CC22-MSSA, 1 CC45 et 1 CC159-MSSA (une souche n'a pas été typée).

3.2.2 Syndromes d'exfoliation staphylococcique

Depuis 2011, le CNR a analysé au total **537 souches** isolées dans un contexte de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **159 cas de maladie exfoliante généralisée** (*staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) ou de *mild* SSSS et **284 cas d'impétigo bulleux** (Figure 5).

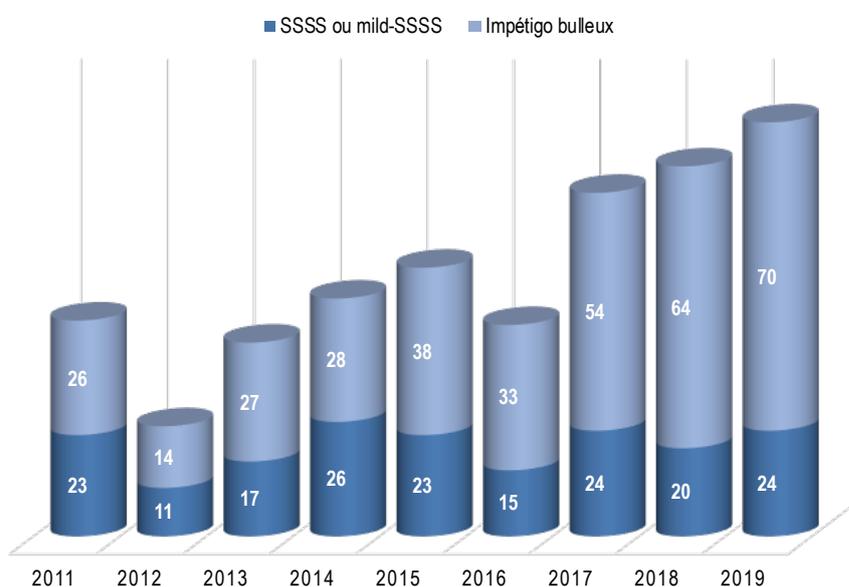


Figure 5- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2011 et 2019.

En 2019, le CNR a analysé **94 souches** de syndrome d'exfoliation staphylococcique dont **24 cas de maladie exfoliante généralisée** et **70 cas d'impétigo bulleux**. On constate donc encore une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR dans le cadre d'impétigo bulleux par rapport à l'année précédente ; tandis que le nombre de souches associés aux syndromes d'exfoliation généralisée semble stable.

En 2019, pour les 24 cas de patients ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique classique, l'âge s'étend de zéro à 84.3 ans avec une médiane à 3.8 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1. Les profils toxiques révélaient :

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

Six cas d'exfoliation généralisée ont été rapportés chez des adultes (âgés de 33,9 à 84.3 ans).

Parmi les 24 souches associées aux cas de maladie exfoliante généralisée, aucun SARM n'a été retrouvé.

En 2019, l'âge des 70 patients ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de zéro à 78.4 ans avec une médiane de 11.3 ans tandis que le sexe ratio ♂/♀ de ces patients est de 1,25. L'analyse du profil toxique de ces 70 souches a permis de révéler :

- 35 souches possédant les gènes codant ETA et ETB,
- 34 souches pourvues de l'ETA seule,
- une souche possédant l'ETB seule.

Parmi les 64 souches associées aux cas d'impétigo bulleux, on ne retrouvait aucun SARM.

3.2.3 Infections suppuratives à *S. aureus* PVL+

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

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

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

Nous recevons, depuis 2011, de nombreuses souches dans le cadre d'infections suppuratives nécessitant un drainage chirurgical et plus ou moins récidivantes (Figure 6). En 2019, on constate une **diminution** du nombre de souches reçues en raison de l'efficacité de notre prestation de conseil sur l'intérêt des prescriptions. En effet, il n'est pas nécessaire de faire parvenir au CNR des souches de surinfection ou de colonisation d'escarre-ulcère car l'habillage toxinique de ces souches est généralement non contributif et n'entraîne pas de modification de la prise en charge des patients en l'absence d'autres signes cliniques associés.

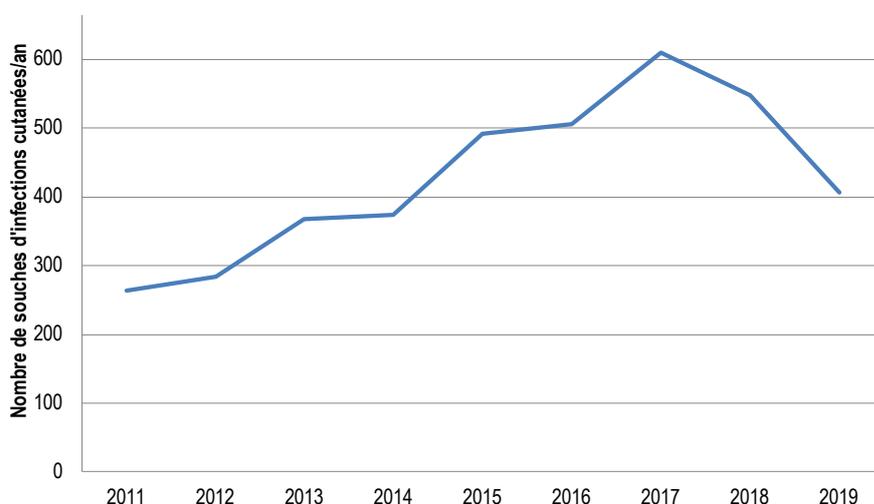


Figure 6- Évolution du nombre de souches reçues dans le cadre d'infections suppuratives (hors épidémies).

Ainsi en 2019, nous avons expertisé **406 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, érysipèle...) hors épidémies. La **proportion de souches PVL+** est de **78%** au total mais de **95,3%** lorsque l'on ne considère que les infections primitives (Figure 7).

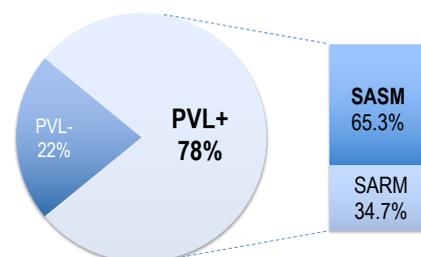


Figure 7- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2019 (n=406).

Parmi les souches PVL+ :

(i) **65,3 % sont des SARM** (Figure 7). On note une grande diversité des clones de SARM PVL. Le clone majoritaire est le **clone CC152-MSSA** (Figure 8a). Nous observons depuis 2013 une augmentation des souches

reçues appartenant à ce complexe clonal. Il n'était qu'en quatrième position en 2013 et représentait moins de 11% des souches de SARM PVL+ alors qu'en 2019, il est en première position et représente 34% des souches de SARM PVL+ responsables d'infections suppuratives.

(ii) **34,7 % sont des SARM** (Figure 7). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés. En 2019, pour la première année, le clone ST80 (*agr3*, PVL+, *mecA*+) n'est plus clone de SARM PVL+ le plus prévalent en France. Il représente 17% en 2019 des SARM PVL+ isolés d'infections suppuratives contre 25% en 2018. Nous observons toujours des cas d'infections avec le clone d'origine Nord-américaine et à diffusion mondiale : le clone USA300 (*agr1*, PVL+, *mecA*+) mais sa prévalence est restée stable au cours des 5 dernières années (Figure 8b). Ces observations de terrain sont en accord avec les modèles bayésiens qui prédisent une stabilité, voire une diminution de la démographie de ces deux clones (Stegger, Mbio 2014, Glaser Mbio 2016).

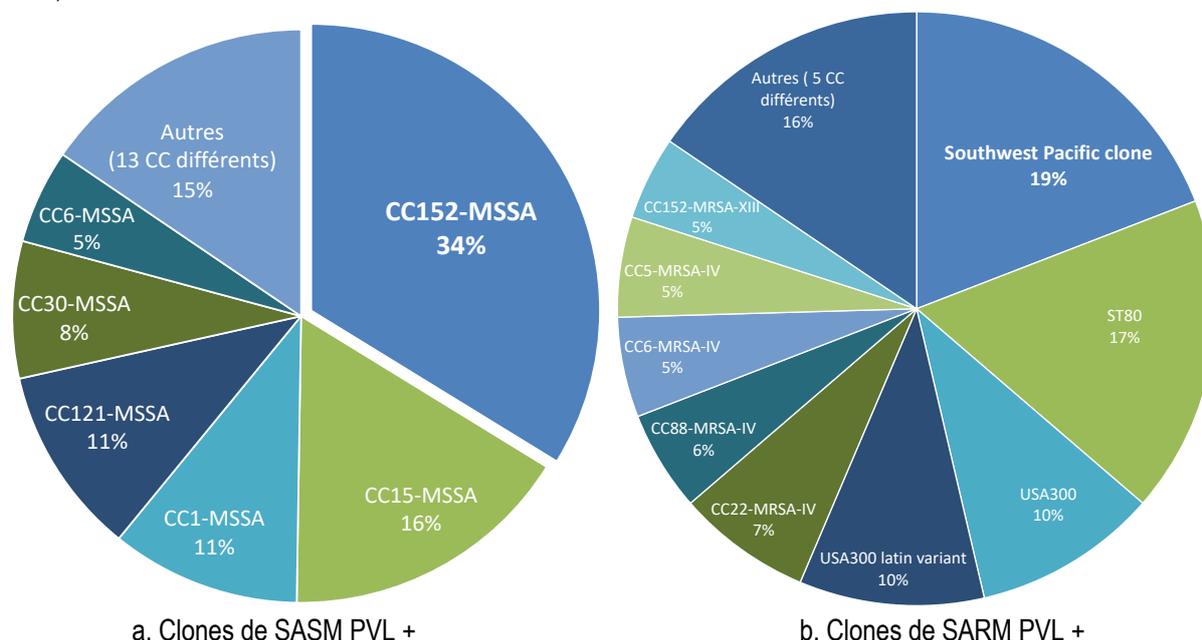


Figure 8- Caractéristiques des clones de *S. aureus* PVL+ (SASM et SARM) responsables d'infections suppuratives en 2019

La proportion relativement faible (10%) du clone USA 300 au sein des souches de SARM isolées d'infections cutanées suppuratives est en accord avec les observations de l'étude Européenne initiée par le CNR français établissant la prévalence des SARM et notamment celle des clones communautaires dans les infections cutanées sévères des patients admis dans les services d'urgence (Bouchiat, JAC 2017) .

Il convient de poursuivre la **surveillance du clone CC152-MSSA PVL+**. En effet, ce complexe clonal reste le plus prévalent en 2019, qu'il s'agisse d'infections cutanées mais également dans le contexte des pneumonies (cf. 3.2.5). Une étude génomique de ce complexe clonal est en cours afin de mieux comprendre son épidémicité. Par ailleurs, nous observons l'**apparition d'un clone CC152-MRSA-XIII PVL +** en France, dont il conviendra de suivre la diffusion

3.2.4 Furonculoses familiales

En 2019, 68 recherches directes sur prélèvement des gènes codant la PVL dans un contexte de furonculose familiale ont été effectuées à partir d'écouvillonnage de différents sites de portage (nez, gorge, périnée, anus) à l'hôpital femme/mère/enfant (en collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Yves Gillet, Dr Laure Hees)), pour la détection des porteurs sains ou symptomatiques et vérifier l'efficacité de la décontamination. Le CNR suit notamment les souches isolées à partir des prélèvements positifs afin de surveiller l'acquisition de résistance à la mupirocine et la chlorhexidine lors de protocoles de décontamination répétés. Il n'y a pas eu d'échec de décolonisation, ni d'acquisition de résistance (mupirocine, chlorhexidine) au cours de l'année 2019.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, le CNR a reçu 68 demandes d'expertise pour recherche de leucocidine de Panton Valentine dans un contexte d'infections cutanées à diffusion intrafamiliale avec différentes souches d'infections et de portage pour chacun des membres des différentes familles.

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

Sur l'année 2019, 167 souches de *S. aureus* ont été envoyées au CNR dans des contextes de pneumopathies et/ou d'abcès pulmonaires. Parmi ces souches, 44 (26,3%) étaient sécrétrices de PVL tandis que la majorité des souches ne produisaient pas ce facteur de virulence. Contrairement aux années précédentes, l'épidémie de grippe de l'hiver 2018-2019 ne semble pas associée à un pic d'augmentation du nombre de pneumonies à *S. aureus*, notamment liées à des souches PVL+ (Figure 9). 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.

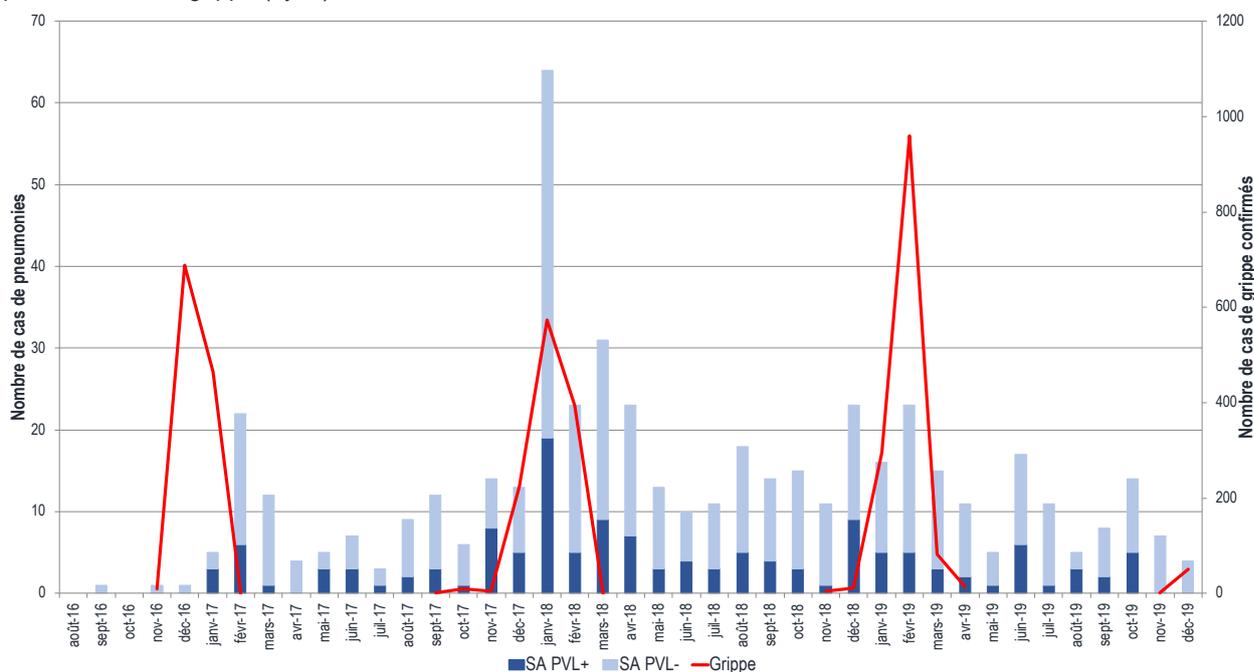


Figure 9- nombre de cas de pneumonies à *S. aureus* produisant ou non la PVL et nombre de cas de grippe confirmés pendant la période 2016-2019.

Contrairement à la tendance observée en 2018, la proportion de SARM est plus élevée chez les souches produisant la PVL (29%) par rapport à celles ne la produisant pas (9,2%) (Figure 10).

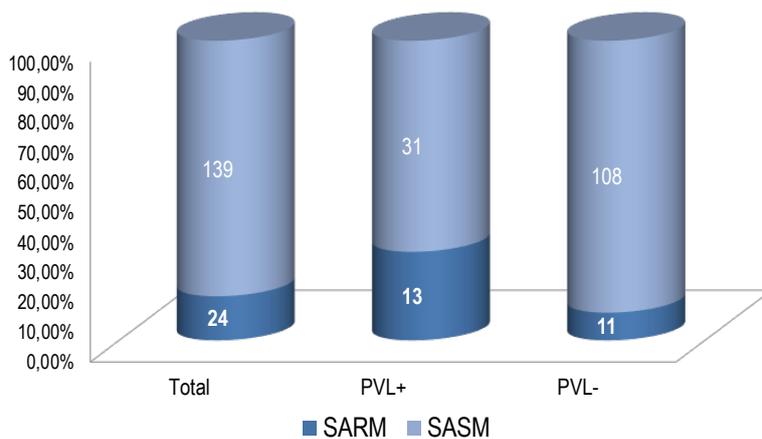


Figure 10- Proportion de SASM et de SARM au sein des souches sécrétrices ou non de la leucocidine de Panton Valentine, parmi les souches isolées dans un contexte de pneumonie en 2019.

Concernant les clones de *S. aureus* impliqués dans les pathologies PVL+, le clone de SASM majoritaire est le clone CC-152-MSSA. Ce clone, émergent en France, est le clone le plus impliqué dans la majorité des pathologies en France (bactériémies, pneumonies nécrosantes, autres) (Figure 11). Concernant les clones de SARM produisant la leucocidine de Panton Valentine, les clones diffusants actuellement sont retrouvés tels que le clone USA300 et son variant (spanish ou latin variant) ou encore le clone océanique.

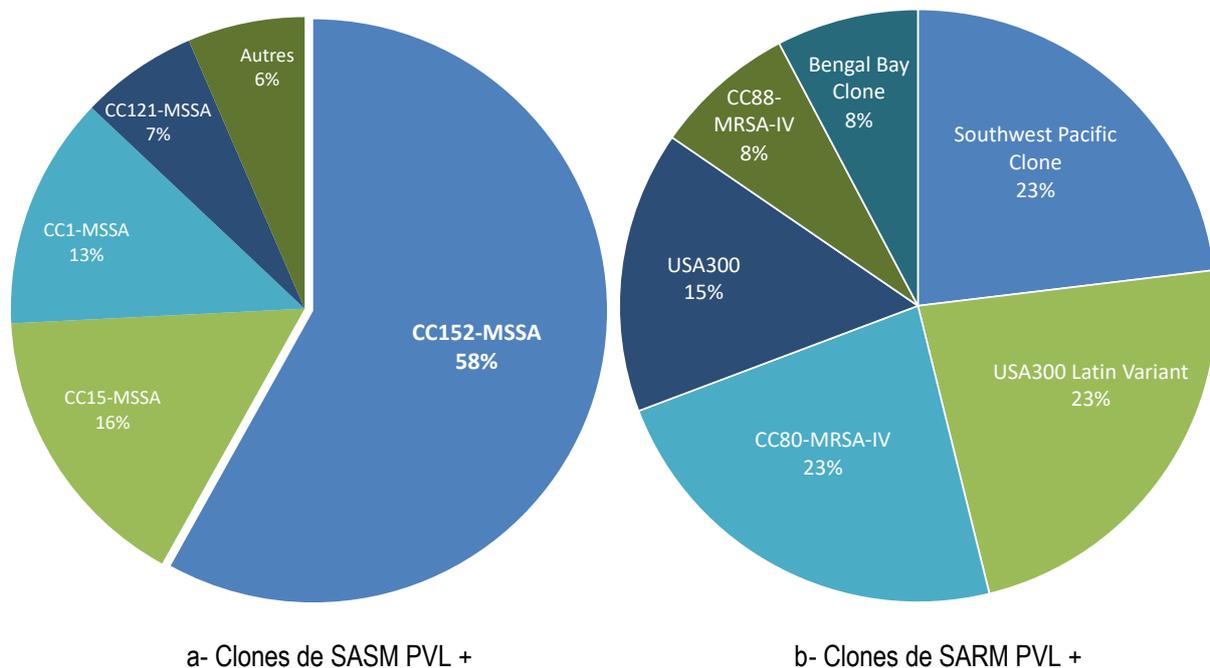


Figure 11- Caractéristiques des clones de SASM et SARM PVL + responsables de pneumonies en 2019.

Concernant les clones de *S. aureus* PVL- (SARM et SASM confondus) retrouvés dans les pneumonies sévères PVL-, l'épidémiologie correspond aux clones retrouvés largement en France dans d'autres pathologies avec notamment les clones CC398, CC30 et CC45 pour les SASM et les grands clones nosocomiaux diffusant en France pour les SARM comme le clone Lyon ou le clone pédiatrique et New pédiatrique (Figure 12).

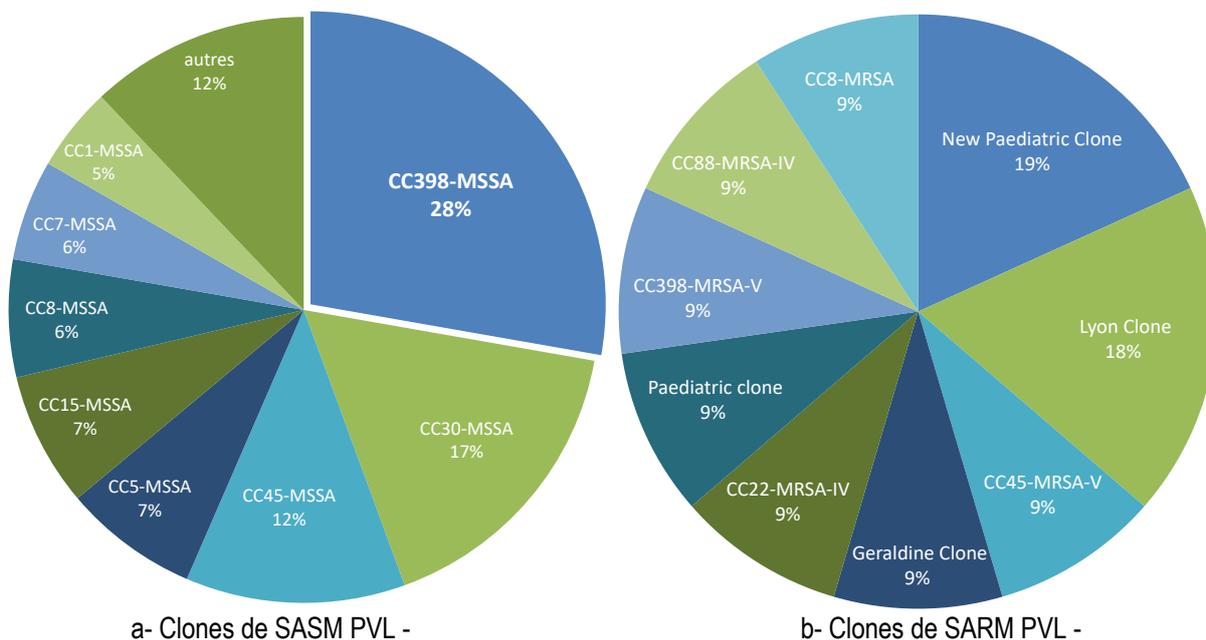


Figure 12- Caractéristiques des clones de SASM et SARM ne produisant pas la PVL et responsables de pneumonies en 2019.

3.2.6 Intoxications alimentaires individuelles et collectives

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

En 2019, le CNR a été contacté dans le cadre d'une TIAC dans un établissement de type EHPAD. Le CNR a reçu 8 souches de *S. aureus* provenant de 3 patients isolées de prélèvements de selles, de prélèvements digestifs autres ou d'hémoculture. Les souches appartenaient à des fonds génétiques différents (un fond génétique par patient). Le CNR a également reçu 5 vomis pour recherche d'entérotoxines staphylococciques. La recherche par technique ELISA n'a pas permis de mettre en évidence de toxines dans ces vomis.

Au total, les souches de *S. aureus* reçues dans le cadre de cette TIAC ne semblent pas impliquées dans la symptomatologie des patients. Aucune toxine staphylococcique n'a été détectée dans les prélèvements de vomis. Ainsi il n'a pas été possible de conclure à une éventuelle TIAC à *S. aureus* chez ces patients.

3.2.7 Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2011, nous avons expertisé **731 souches d'infections** ostéo-articulaires (exclus les « pieds diabétiques » sans ostéite). En 2018, nous avons reçu 125 souches de *S. aureus*, isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire (Figure 13).

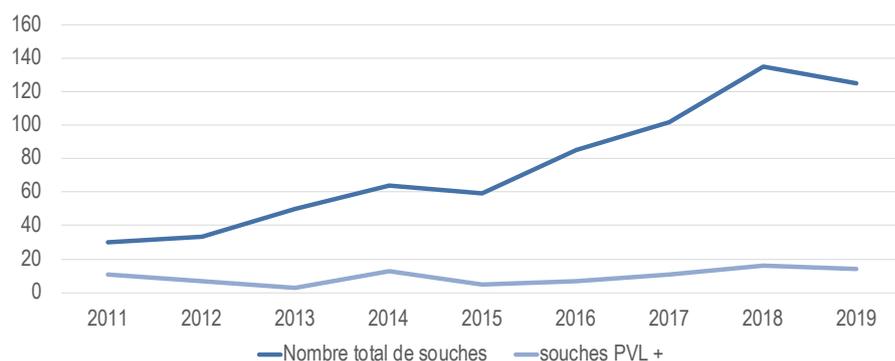


Figure 13- Évolution du nombre de souches reçues au CNR pour infections ostéo-articulaires entre 2011 et 2019.

Les patients étant âgés de 0,5 à 98,2 ans (médiane d'âge 60,2 ans) avec un sexe ratio ♂/♀ de 3,2. Parmi les souches de *S. aureus*, 25 étaient des SARM (Figure 14).

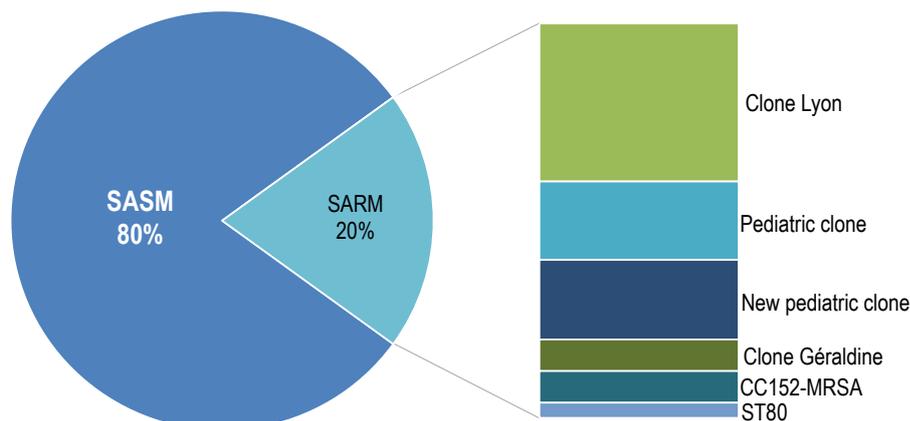


Figure 14- Caractéristiques des *S. aureus* responsables d'infections ostéo-articulaires en 2018 (n=125).

Les tableaux cliniques incluent des ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèses de genou, de hanche... Parmi ces infections diverses, la part des souches porteuses de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) s'élevait à 11,2% (n = 14) (onze SASM dont six CC152-MSSA et trois SARM avec un CC80-MRSA et deux CC152-MRSA)

3.2.8 Sérologies PVL et TSST-1

Pour l'année **2019, 30 sérums ont été adressés au CNR** pour sérologie anti-PVL (leucocidine de Panton-Valentine) et/ou anti-TSST-1 (toxine du choc staphylococcique), versus 31 en 2018. Ce chiffre est assez faible mais stable. Cela reflète les indications assez restreintes de ces sérologies mais également probablement un manque d'informations des biologistes et des cliniciens. Pour pallier ce problème, le site Internet du CNR a été enrichi courant juillet 2020 d'une page précisant les indications et l'intérêt de ces sérologies dans le diagnostic et le suivi des infections staphylococciques à composante toxinique.

Cinq demandes, en provenance de cinq hôpitaux différents, concernaient une **sérologie PVL**, deux dans le cadre de pneumonies d'allure nécrosante, deux dans le cadre d'infections cutanées récidivantes et une dans un contexte d'une éruption cutanée fébrile diffuse avec toux et troubles digestifs. Une seule de ces sérologies s'est révélée positive à 9780 UA/mL : il s'agissait d'un patient présentant des abcès à *S. aureus* PVL-positif à répétition, avec plusieurs échecs de décolonisation. Cette sérologie n'avait pas été réalisée à titre diagnostique puisque nous avons également reçu la souche PVL-positif du patient mais avait été proposée devant les récurrences multiples d'abcès malgré les protocoles de décolonisation bien menés, afin de vérifier si le patient présentait bien une immunité anti-PVL. Cependant, il est décrit que les anticorps anti-PVL protègent seulement des formes graves d'infections, telles les pneumonies nécrosantes, mais pas ou peu des formes superficielles comme les abcès. Les quatre autres sérums se sont révélés négatifs, le taux de positivité étant fixé à >4900 UA/mL (taux entre 430 et 4340 UA/mL).

Concernant les deux patients présentant un tableau pulmonaire, nous n'avons reçu qu'un sérum prélevé précocement après le début des symptômes, ce qui ne permet pas d'interpréter la sérologie puisque le délai était trop court pour qu'une séroconversion ait pu avoir lieu. Cependant, pour un d'entre eux, la souche de *S. aureus* responsable du tableau infectieux a été isolée et était en fait PVL-négative.

Concernant le patient présentant un tableau d'éruption cutanée fébrile diffuse avec toux et troubles digestifs, nous n'avons également reçu qu'un sérum prélevé précocement après le début des symptômes, ce qui ne permet pas d'interpréter la sérologie de manière fiable. Cependant, le tableau clinique était plutôt en faveur d'un choc toxique lié

à une toxine superantigénique mais ce diagnostic n'a pu être confirmé en l'absence de culture de la bactérie responsable.

Au total, ces sérologies PVL ont été peu contributives mais il faut rappeler que le diagnostic des infections liées à la PVL repose avant tout sur l'isolement de la souche infectante de *S. aureus* et la recherche des gènes codant la PVL. Lorsque la souche n'a pu être isolée, la sérologie PVL peut permettre d'obtenir un diagnostic rétrospectif mais dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une sérologie précoce et une plus tardive (à au moins 3-4 semaines d'intervalle) afin d'objectiver une séroconversion.

Vingt-six sérologies TSST-1 ont été effectuées pour 15 prescripteurs différents. Elles concernaient 16 patients (dont 15 femmes) et étaient négatives dans 69% des cas (n=18). Les sérologies TSST-1 étaient réalisées dans un contexte de choc toxique menstruel (MTSS) dans 20 cas (77%) et de choc toxique non menstruel (NMTSS) dans 6 cas (23%).

Les sérums en contexte de **MTSS** (reçus pour 11 patientes) étaient séronégatifs pour TSST-1 dans 17 cas sur 20 et très faiblement positif dans un cas (très inférieur à la valeur de la population générale, ce qui ne permet pas d'écarter une réaction croisée et donc une sérologie faussement positive), soit 90% des cas au total. Concernant le résultat faiblement positif, la patiente était séronégative au moment du choc mais le sérum prélevé deux mois plus tard présentait un taux d'anticorps de 140 UA/mL, ce qui est très faible par rapport à la moyenne dans la population générale (1000 à 1300 UA/mL) et pourrait être lié à une réaction faussement positive. Les deux sérums positifs en contexte de MTSS concernaient : a) une patiente suspectée d'avoir développé un choc toxique en période menstruelle en 2018 mais chez laquelle la souche de *S. aureus* n'avait pas été retrouvée, et qui présentait une sérologie positive à 520 UA/mL un an plus tard, ce qui rend le diagnostic de choc menstruel incertain, et b) une patiente présentant un taux d'anticorps élevé (3600 UA/mL) au moment du choc, probablement lié à l'administration d'immunoglobulines polyclonales. Dix patientes ayant développé un choc toxique menstruel avant ou pendant l'année 2019 ont bénéficié de prélèvements tardifs (> trois semaines après l'épisode de choc) pour recherche de séroconversion ; aucune augmentation significative d'anticorps n'a été observée chez neuf 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.

Les sérums en contexte de **NMTSS** concernaient 5 patients. Nous n'avons reçu un sérum précoce et un sérum tardif que pour une patiente : il n'a pas été objectivé de séroconversion anti-TSST, ce qui était cohérent avec le fait que la souche isolée lors de l'épisode infectieux ne possédait pas la TSST ; à noter que la souche possédait l'entérotoxine A qui pourrait expliquer le tableau de choc observé chez la patiente. Pour les 4 autres patients, seul un sérum précoce a été reçu : pour 3 sur 4, la sérologie était positive avec des taux similaires à ceux de la population générale, le dernier étant séronégatif. L'absence de souche de *S. aureus* isolée et l'absence de sérum tardif permettant d'objectiver une séroconversion anti-TSST-1 ne permettent donc pas de conclure sur la possibilité d'un choc toxique non menstruel. Dans ces cas, une sérologie isolée anti-TSST-1 est souvent non contributive pour le diagnostic d'une toxémie à TSST-1. Comme pour la sérologie anti-PVL, un diagnostic rétrospectif peut être obtenu grâce à la sérologie anti-TSST-1 mais dans ce cas, il est nécessaire de réaliser une sérologie précoce et une plus tardive afin d'objectiver une séroconversion.

L'ensemble des 26 demandes de sérologie TSST-1 émanait de **14 prescripteurs différents**. Ce nombre de prescripteurs assez limité nous incite à mieux diffuser l'information autour de ces sérologies et notamment leurs indications et leurs apports en termes de prise en charge du patient.

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

3.3.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Au total, **525 souches** ont été adressées au CNR en 2019 pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques, en provenance de 166 laboratoires et/ou prescripteurs différents. Ceci représente une **diminution de 16% par rapport à l'année 2018** (627 souches) (Figure 15). Cette diminution est due principalement au fait que le

CNR a modifié ses conditions de réalisation des CMI des glycopeptides en microdilution à partir du 1^{er} mai 2019 afin que les laboratoires expéditeurs limitent leurs envois aux souches de *S. aureus*, les seules pour lesquelles le CNR peut réellement apporter une expertise complémentaire, et n'adressent plus au CNR les souches de staphylocoques à coagulase négative, ce qui représentait 83 souches reçues en 2018 (cf paragraphe 3.3.3.2.). Pour les autres familles d'antibiotiques, nous observons un nombre de demandes en légère diminution pour la résistance aux bêta-lactamines, stable pour la résistance au linézolide, et en augmentation pour la daptomycine et la dalbavancine. Ce besoin de vérifier la sensibilité à ces antibiotiques reflète l'augmentation du nombre de souches de staphylocoques multirésistantes offrant des options thérapeutiques réduites et est également lié à la mise sur le marché récente de certaines molécules anti-staphylococciques comme la ceftaroline, le ceftobiprole, le tédizolide ou la dalbavancine pour lesquelles les laboratoires ne disposent pas tous des techniques permettant de tester la sensibilité des souches de staphylocoques.

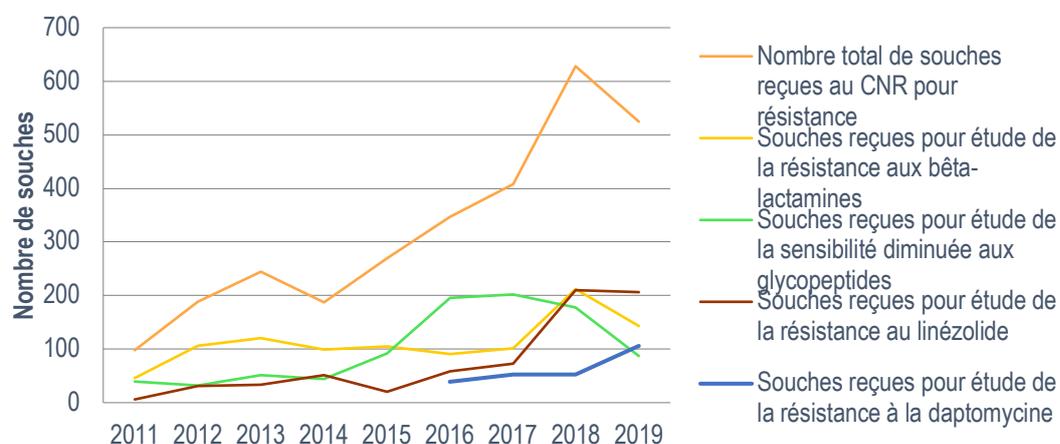


Figure 15 – Souches reçues au CNR pour expertise de la **résistance aux antibiotiques** entre 2011 et 2019.

En 2019, les souches expertisées au CNR pour la résistance comprenaient 469 demandes extérieures et 56 souches pour des patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon. La répartition de ces souches par espèce est décrite dans le tableau 1 : *S. aureus* et *S. epidermidis* sont toujours les deux espèces les plus reçues, en lien avec leur implication majeure dans les infections humaines.

Tableau 1– Répartition selon l'espèce des souches de staphylocoques reçues au CNR pour expertise de la résistance aux antibiotiques en 2019.

Espèce	Nombre de souches reçues (%)
<i>S. argenteus</i>	1 (0,2)
<i>S. aureus</i>	230 (43,8)
<i>S. capitis</i>	15 (2,9)
<i>S. cohnii</i>	1 (0,2)
<i>S. epidermidis</i>	224 (42,7)
<i>S. haemolyticus</i>	15 (2,9)
<i>S. hominis</i>	14 (2,7)
<i>S. kloosii</i>	1 (0,2)
<i>S. lugdunensis</i>	7 (1,3)
<i>S. pettenkoferi</i>	4 (0,8)
<i>S. saprophyticus</i>	9 (1,7)
<i>S. sciuri</i>	1 (0,2)
<i>S. warneri</i>	3 (0,6)
Total	525

En plus de ces demandes, toutes les souches de SARM ou de *S. aureus* présentant une croissance difficile, isolées chez des patients mucoviscidiques aux Hospices Civils de Lyon, sont conservées au CNR pour vérification de la sensibilité aux glycopeptides et réalisation de l'antibiogramme lorsque les souches montrent une croissance difficile (111 souches pour l'année 2019).

3.3.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Les souches sont catégorisées phénotypiquement sensibles, intermédiaires ou résistantes pour les différents antibiotiques testés en utilisant les concentrations critiques établies dans le communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2019 (CA-SFM/EUCAST).

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

Les techniques utilisées au CNR sont détaillées en Annexe 2.

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

3.3.3.1 Résistance aux bêta-lactamines

Les PCR *mecA* et *mecC* sont réalisées systématiquement sur toutes les souches adressées au CNR. Le CNR est en outre spécifiquement sollicité pour des problèmes concernant la détection/confirmation de la résistance aux bêta-lactamines, principalement la résistance à la méticilline. En 2019, **143 souches** ont été étudiées dans ce contexte : 133 souches pour une demande de confirmation de sensibilité/résistance à la méticilline, 1 souche pour typage de la bêta-lactamase et 9 souches pour demande de confirmation de sensibilité/résistance à la ceftaroline ou au ceftobiprole (céphalosporines de dernière génération actives sur les souches résistantes à la méticilline).

Typage de la pénicillinase staphylococcique

La souche reçue pour typage de la pénicillinase était **une souche de *S. aureus*** isolée d'une hémoculture. La demande a été faite dans un contexte de bactériémie persistante pendant 12 jours malgré un traitement par céfazoline et l'absence de foyers infectieux identifiés, traitement changé à J12 pour la cloxacilline qui a alors permis de négativer les hémocultures. La souche était négative pour les gènes *mecA/C* et était phénotypiquement sensible à la méticilline. Le typage de la bêta-lactamase, réalisée grâce à l'analyse de la souche par whole-genome sequencing, a révélé une bêta-lactamase de type A. Des études ont montré que certaines souches de SASM pouvaient présenter un effet inoculum vis-à-vis de la céfazoline *in vitro* (c'est-à-dire une augmentation franche des CMI lorsque l'inoculum bactérien est élevé), le plus souvent associé à une bêta-lactamase de type A. Cela pourrait donc expliquer ce cas de bactériémie persistante sous céfazoline même si le lien entre effet inoculum *in vitro* et échecs cliniques *in vivo* n'a pas été clairement démontré (Chong *et al.*, EJCMID 2015 ; Song *et al.*, EJCMID 2017).

Résistance à la méticilline

Les 133 demandes de confirmation de la sensibilité/résistance à la méticilline concernaient **108 souches de *S. aureus*** et **25 souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN)**.

Tableau 2- Bilan des souches reçues au CNR pour vérification de la résistance à la méticilline et des résultats obtenus au CNR sur ces souches.

	<i>S. aureus</i>	SCN
Souche <i>mecA</i> +	29	9
Souche <i>mecC</i> +	11	0
Souche sensible à la méticilline	68	16
Total	108	25

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

- **81 souches** de *S. aureus* pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de la présence ou absence de gène *mec*. Il s'agissait en général de 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 proche des valeurs critiques, ou iii) pour des souches avec des profils de résistance moins habituels (souches phénotypiquement sensibles à la méticilline mais multirésistantes aux autres antibiotiques, ou résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones et/ou macrolides), ou iv) des souches avec des résultats discordants entre deux techniques (antibiogramme en milieu liquide vs en diffusion, antibiogramme vs méthodes moléculaires ou méthodes immunochromatographiques) ou entre le test céfoxitine et la CMI oxacilline en automate Vitek2®. Sur ces 81 souches, 21 possédaient le gène *mecA* et les 60 autres ne possédaient aucun gène *mec*.

- **13 souches** de *S. aureus* adressées au CNR pour recherche de gène *mecC*. Cette demande était motivée par deux raisons : i) le plus souvent des souches résistantes à la méticilline sur l'antibiogramme mais avec une recherche de PLP2a ou de gène *mecA* négative et/ou ii) une alerte du système expert d'analyse des antibiogrammes qui incitait à rechercher la présence du gène *mecC* devant un antibiogramme pouvant faire suspecter ce type de souche (notamment des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline mais multisensibles aux autres classes d'antibiotiques). **Onze** de ces souches, isolées chez dix patients différents, se sont révélées porteuses du **gène *mecC***. Sur les 2 autres souches, une était en fait porteuse du gène *mecA*, et une s'est avérée sensible à la méticilline. Les 10 souches *mecC*-positives ont été isolées à Bordeaux, Clermont-Ferrand, La Roche-sur-Yon, Orsay, Montpellier (n=2), La Teste-de-Buch, Mulhouse, Royan et Saintes. Sept de ces souches appartenaient au complexe clonal CC130 qui est le clone *mecC*+ le plus courant en Europe ; les 3 autres souches appartenaient aux complexes clonaux CC49 et CC599 (n=2).

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

Pour 3 souches, il s'agissait d'une discordance entre la technique multiplex FilmArray (Biofire) qui avait détecté un SARM sur un prélèvement respiratoire alors que la culture a retrouvé 3 morphotypes de *S. aureus*, tous sensibles à la méticilline : l'analyse par puce à ADN n'a pas retrouvé de fragment de cassette *SCCmec* dans ces souches qui auraient pu expliquer un résultat faux-positif du FilmArray.

Les onze autres souches concernaient des discordances entre techniques GeneXpert MRSA (Cepheid) et la culture. Pour une souche, elle avait été détectée phénotypiquement résistante à la méticilline mais négative pour le gène *mec* en GeneXpert : au CNR, elle s'est révélée *mecA*- et *mecC*- négative mais était finalement phénotypiquement sensible à la méticilline, ce qui est donc concordant avec les résultats moléculaires. Pour 5 souches, elles étaient phénotypiquement résistantes à la méticilline mais présentaient un profil discordant en GeneXpert : *mecA* positif, jonction *SCC* négative. L'analyse par puce à ADN a révélé que 4 de ces souches possédaient des cassettes *SCCmec* composites comprenant des recombinaisons additionnelles et la dernière présentait une cassette de type V variant et appartenait à un clone peu fréquent en France, ces 2 raisons pouvant expliquer que les amorces du GeneXpert ne détectent pas la jonction *SCC* chez ces souches. A noter que la positivité d'une PCR *mecA* sur souche pure doit les faire considérer comme des SARM. Pour 3 souches, elles étaient phénotypiquement sensibles à la méticilline mais présentaient un profil discordant en GeneXpert : *mecA* positif, jonction *SCC* négative. Les 3 souches ont été confirmées comme sensibles à la méticilline au CNR et ne possédaient en fait pas le gène *mecA*, pouvant laisser supposer une possible contamination de la souche par un staphylocoque à coagulase négative méticillino-résistant (qui aurait positivé la PCR *mecA* du GeneXpert mais pas la PCR *SCC* qui elle est spécifique de *S. aureus*). Enfin, 2 souches étaient positives à la fois pour *SCC* et *mecA* en GeneXpert mais sensibles à la méticilline en diffusion : le CNR a confirmé ce profil avec une PCR *mecA* positive mais un phénotype sensible à l'oxacilline et la céfoxitine. Il s'agissait donc de SARM cryptiques, exprimant la résistance à faible niveau, qui doivent cependant être rendues SARM sur la base de la PCR *mecA* positive même si la résistance n'est pas détectée phénotypiquement.

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

- **8 souches** de *S. saprophyticus* et *S. lugdunensis*. Les souches appartenant à ces deux espèces présentent fréquemment des CMI élevées ou limites pour l'oxacilline et la céfoxitine car ces espèces ont naturellement des CMI

pour les bêta-lactamines plus élevées que les autres espèces de staphylocoques. Néanmoins les souches véritablement résistantes à la méticilline avec présence du gène *mecA* sont rares. Lorsque les diamètres ou les CMI céfoxitine ou oxacilline rendent un résultat douteux ou discordant pour ces espèces, il est nécessaire de confirmer la présence d'une PLP additionnelle ou d'un gène *mec*. C'est dans ce contexte que nous avons reçu ces souches : 3 souches étaient positives en PCR *mecA* (1/1 *S. saprophyticus*, 2/7 *S. lugdunensis*), et les 5 autres étaient négatives pour *mecA* et *mecC* et étaient donc sensibles à la méticilline.

- **17 souches** de staphylocoques à coagulase négative appartenant à d'autres espèces (*S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pettenkoferi*, *S. warneri*) exprimant un profil phénotypique douteux pour lesquelles le laboratoire expéditeur demandait une confirmation de l'absence/présence d'un gène *mec* : 6 possédaient le gène *mecA* et étaient donc résistantes à la méticilline. Les 9 autres souches étaient négatives pour les gènes *mecA/mecC* et étaient donc sensibles à la méticilline à l'exception d'une souche de *S. pettenkoferi* qui présentait une CMI oxacilline à 0,5 mg/L, la catégorisant d'après le CASFM comme résistante à l'oxacilline.

Détermination de la sensibilité à la ceftaroline et au ceftobiprole

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

En 2019, la détermination de la CMI **ceftaroline** ou la confirmation d'une résistance détectée par le laboratoire expéditeur ont été demandées pour **8 souches** résistantes à la méticilline :

- **4 souches de *S. aureus*** : 2 étaient sensibles à la ceftaroline, avec des CMI à 0,5 et 0,75 mg/L et deux étaient résistantes avec des CMI à 6 et 2 mg/L. Les deux souches résistantes étaient des souches de SARM isolées chez des patients mucoviscidosiques qui étaient résistantes également aux aminosides (excepté la gentamicine pour une souche), aux macrolides, fluoroquinolones et au linézolide, ce qui laissait peu d'options thérapeutiques hormis la daptomycine et les glycopeptides. Une des 2 souches sensibles présentait un profil de multirésistance touchant y compris la daptomycine et présentait des CMI élevées pour les glycopeptides, la ceftaroline représentait donc une des seules options thérapeutiques.
- **4 souches de staphylocoques à coagulase négative** : **2 souches de *S. haemolyticus*** (une sensible avec une CMI cependant élevée à 1 mg/L et une résistante avec une CMI à 1,5 mg/L), **1 souche de *S. epidermidis*** (sensible à la ceftaroline avec une CMI à 0,38 mg/L) et **1 souche de *S. capitis*** (sensible avec une CMI à 0,19 mg/L).

Trois souches de staphylocoques à coagulase négative ont été envoyées pour vérification de la CMI du **ceftobiprole** : **2 souches de *S. epidermidis*** (une sensible avec une CMI à 2 mg/L et une résistante avec une CMI à 6 mg/L) et **une souche de *S. haemolyticus*** résistante au ceftobiprole avec une CMI à 6mg/L (également résistante à la ceftaroline avec une CMI à 1,5 mg/L)

3.3.3.2 Détection de souches de staphylocoques de sensibilité diminuée aux glycopeptides

En 2019, l'étude de la sensibilité aux glycopeptides a été effectuée pour **87 souches de staphylocoques** provenant de laboratoires extérieurs (61 staphylocoques à coagulase positive et 26 staphylocoques à coagulase négative), l'envoi étant justifié le plus souvent par des CMI élevées aux glycopeptides (> 1mg/L). Depuis 2015, les recommandations du CA-SFM/EUCAST ont abaissé les CMI à partir desquelles une sensibilité diminuée doit être recherchée chez *S. aureus* et ont indiqué la nécessité de déterminer les CMI des glycopeptides par la technique de microdilution, ce qui a été à l'origine d'une augmentation du nombre de demandes reçues par le CNR. Par conséquent, devant l'afflux massif de souches pour cette demande, le CNR a pris la décision au 1^{er} mai 2019 de ne plus réaliser les CMI des glycopeptides en microdilution pour les staphylocoques à coagulase négative, ceci après information des laboratoires par courrier et par le site Internet du CNR dans les deux mois précédents. En effet, plusieurs réactifs

commercialisés sont à disposition des laboratoires depuis plusieurs années et pour les souches de staphylocoques non-*aureus*, aucune technique de confirmation (type APOP) n'est recommandée et validée, le CNR n'apporte donc aucune expertise particulière sur ce type de souche.

Sur les **61 souches de staphylocoques à coagulase positive** reçues dans ce contexte (*S. aureus*, n=60 ; *S. argenteus*, n=1), 4 souches (6,6% ; 3 SARM et 1 SASM) ont été confirmées comme présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type hGISA selon la méthode de référence recommandée par le CA-SFM/EUCAST qui est l'analyse de population (APOP, avec un ratio d'AUC par rapport à la souche Mu3 >0,9). Deux de ces 4 souches hGISA étaient également résistantes à la daptomycine avec une CMI à 1,5 mg/L. Pour 4 autres souches, le test de dépistage des hGISA (test en gradient de diffusion sur milieu BHI avec un inoculum lourd de 2 McF) et l'analyse de population étaient négatifs ; cependant elles ne pouvaient être rendues sensibles aux glycopeptides car elles présentaient des CMI >2 pour la teicoplanine et/ou la vancomycine, ce qui conduit à les catégoriser résistantes aux glycopeptides en dépit du fait qu'elles ne répondent pas aux critères retenus par le CA-SFM pour définir une sensibilité diminuée aux glycopeptides de type GISA.

Cinquante-trois souches étaient sensibles aux glycopeptides sur la base des techniques de dépistage. Parmi elles, 8 présentaient une CMI vancomycine à 2 mg/L (catégorisée sensible) mais il est décrit dans la littérature que le risque d'échec thérapeutique est plus élevé lorsque la CMI vancomycine est >1 mg/L. Dans ce contexte, il convient de déconseiller l'utilisation de glycopeptides sur ces souches même si elles ne répondent pas aux critères retenus pour définir les GISA ou hGISA.

Concernant les **staphylocoques à coagulase négative, 26 souches** ont été étudiées au CNR en 2019 pour détermination de la sensibilité aux glycopeptides : 4 souches présentaient une sensibilité diminuée aux glycopeptides (CMI > 4 mg/L pour la teicoplanine et/ou CMI > 2 mg/L pour la vancomycine). Ces souches appartenaient aux espèces *S. epidermidis* (n=3) et *S. haemolyticus* (n=1), dont une était résistante au linézolide et une à la daptomycine. A noter que 3 souches n'ont pas présenté de croissance en microdilution (réactifs UMIC, Biocentric®) alors que c'est la technique recommandée par le CA-SFM et ont donc été testées en bandelette Etest.

3.3.3.3 Détection de la résistance au linézolide

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

- à l'acquisition des **gènes plasmidiques *cfrA* ou *B*** (chloramphenicol-florfenicol resistance) qui codent des méthyltransférases de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S, méthylations qui masquent la cible de cette famille de molécules sur le ribosome,
- à l'acquisition du **gène plasmidique *optrA*** qui code une protéine ABC dont le mécanisme est incomplètement connu mais agissant probablement par un mécanisme de protection ribosomale,
- à des **mutations du gène codant l'ARNr 23S** entraînant un changement de conformation du ribosome bactérien et une perte d'affinité 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 2019, le CNR a expertisé **206 souches de staphylocoques** pour lesquelles le laboratoire expéditeur avait identifié une CMI augmentée pour le linézolide. **Cent-quatre-vingt-quinze souches**, dont **24 *S. aureus***, ont été confirmées **résistantes au linézolide** (CMI > 4 mg/L). Le nombre de souches détectées résistantes au linézolide est stable par rapport aux années précédentes (179 en 2018) mais nous observons une augmentation importante du nombre de souches de *S. aureus* résistantes reçues au CNR (entre 2 et 6 par an de 2013 à 2018)(Figure 16).

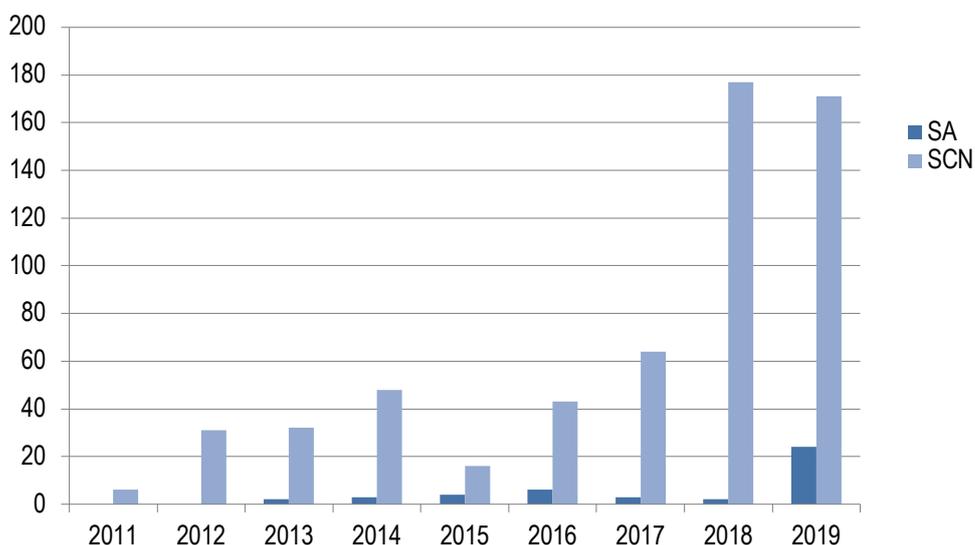


Figure 16. Nombre de souches de staphylocoques **résistantes au linézolide** reçues au CNR entre 2011 et 2019. SA = *S. aureus*, SCN = staphylocoques à coagulase négative.

S. aureus

Les **24 souches** de *S. aureus* résistantes au linézolide étaient résistantes à la méticilline pour 9 d'entre elles et provenaient de 20 villes différentes. 13 souches étaient issues de prélèvements respiratoires, 4 d'hémocultures et une d'un prélèvement ostéo-articulaire. 3 souches possédaient le gène plasmidique *cfr* (associé à la mutation G2576T de l'ARNr 23S pour une d'elles), en provenance de Lyon, Amiens et Suresnes. Sur les souches négatives pour *cfr*, 7 souches présentaient la mutation G2576T au niveau de l'ARN ribosomal 23S. Sur les 14 souches sans *cfr* ni mutation de l'ARNr 23S, nous avons recherché des mutations des protéines ribosomales L3 et L4 : 11 des souches présentaient la mutation V118A au niveau de L4, +/- associée à d'autres mutations de ce même gène ; les 3 autres ne présentaient pas de mutation connue au niveau des protéines ribosomales.

Staphylocoques à coagulase négative

Les **171 souches** de SCN résistantes au linézolide appartenait à 4 espèces : *S. epidermidis* (n=158), *S. capitis* (n=4), *S. hominis* (n=8) et *S. saprophyticus* (n=1) et étaient résistantes à la méticilline pour 168 d'entre elles.

Parmi les 158 souches de ***S. epidermidis*** résistantes au linézolide, 16 possédaient le gène plasmidique *cfr* ; dans 11 de ces 16 souches, le gène *cfr* était associé à la mutation G2576T de l'ARNr 23S. Treize de ces souches provenaient du CHU de Nancy et seront prochainement séquencées afin d'étudier l'environnement génétique du gène *cfr* dans ces souches et leur fond génétique/leur lien épidémiologique.

Parmi les 142 souches de *S. epidermidis* ne possédant pas le gène *cfr*, 121 possédaient la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S. Les 21 souches ne présentant pas de mutation de l'ARNr 23S possédaient par contre des mutations au niveau des protéines ribosomales L3 et/ou L4.

Parmi les 4 souches de ***S. capitis*** résistantes au linézolide, une possédait le gène plasmidique *cfr*, associé à la mutation T2319C de l'ARNr 23S. Deux souches présentaient une double mutation de l'ARNr 23S (T2319C + G2576T) et la dernière présentait des mutations non synonymes au niveau de la protéine ribosomale L3.

Les 8 souches de ***S. hominis*** portaient la mutation G2576T au niveau de l'ARNr 23S. La souche de ***S. saprophyticus*** présentait une CMI modérément élevée pour le linézolide (8 mg/L) et ne possédait pas de mutation de l'ARNr 23S. Ces souches étaient *cfr*-négatives.

Ces données confirment que la mutation majeure associée à la résistance au linézolide retrouvée en France est toujours la mutation G2576T. Nous observons également une réaugmentation du nombre de souches *cfr* positives pour 2019 par rapport aux années précédentes (3 détectées en 2015, 8 en 2016, 19 en 2017, 9 en 2018, 20 en 2019). Ceci semble montrer que i) le gène *cfr* reste assez rare mais est présent en France, dans différentes espèces de

staphylocoques, y compris *S. aureus*, et ii) que l'accumulation de mutations de résistance lors de mésusage de linézolide dans certains services reste le principal mécanisme d'émergence de souches résistantes à cet antibiotique.

La prévalence de la résistance au linézolide a longtemps été faible en France mais l'augmentation croissante de l'utilisation du linézolide s'est accompagnée de l'émergence de souches résistantes (Figure X). Elles sont de moins en moins rares et restent probablement sous-diagnostiquées car le linézolide n'est pas systématiquement testé, les résistances de bas niveau mal détectées et les souches pas assez systématiquement adressées au CNR. On peut cependant noter une augmentation du nombre de souches envoyées au CNR depuis 2018. Les résistances au linézolide sont retrouvées essentiellement chez les SCN en lien le plus souvent avec des mutations sur l'ARNr 23S et ces souches peuvent être responsables d'épidémies intra- ou inter-hospitalières puisque plusieurs endémo-épidémies intra- et inter-hospitalières ont déjà été décrites. De façon plus inquiétante, il existe des résistances plasmidiques au linézolide, telles que celle médiée par le gène *cfr*. Cette résistance plasmidique a 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 l'année 2020. Cette étude s'avère d'autant plus nécessaire que vient d'être commercialisée une nouvelle molécule au sein de la famille des oxazolidinones, le tédizolide, et que la forme IV du linézolide a été génériquée depuis quelques années avec une chute du prix, ce qui conduit à une augmentation de sa prescription.

Concernant le gène *cfr*, là encore, la prévalence exacte de ce mécanisme de résistance est inconnue en France, la sensibilité des souches de staphylocoques à coagulase négative au linézolide n'étant pas systématiquement testée, la résistance au linézolide étant probablement négligée et/ou peu rapportée et les souches concernées n'étant pas systématiquement adressées au CNR pour identification du mécanisme de résistance.

3.3.3.4 Détection de la résistance à la daptomycine

La daptomycine est un lipoglycopeptide, dont la concentration critique a été fixée à 1 mg/L par le CA-SFM/EUCAST. La daptomycine constitue une alternative pour le traitement des infections à SARM, notamment au cours des endocardites ou lorsque l'infection est associée à une prothèse ou cathéter, du fait de 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. Ces demandes sont en forte augmentation, liée à l'augmentation d'utilisation de la daptomycine au détriment des glycopeptides.

En 2019, le CNR a été sollicité pour réaliser spécifiquement la détermination de la CMI daptomycine pour **106 souches de staphylocoques (vs 53 souches en 2018)** (27 *S. aureus* et 79 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 27 souches de *S. aureus* reçues pour cette demande, 14 souches étaient bien résistantes à la daptomycine avec des CMI comprises entre 1,5 et 4 mg/L. Dix de ces souches étaient des SARM et onze de ces souches provenaient d'hémocultures.

Sur les 79 souches de SCN testées, 32 (7 *S. capitis*, 21 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis*, 1 *S. pettenkoferi* et 1 *S. sciuri*) étaient résistantes à la daptomycine avec des CMI entre 1,5 et 2 mg/L. Trente de ces souches étaient résistantes à la pénicilline et 24 provenaient d'hémocultures.

Jusqu'à début 2018, le CNR réalisait le séquençage du gène *mprf* sur les souches de *S. aureus* résistantes à la daptomycine. En effet, le gène *mprf* code une lysyl-phosphotidylglycérol synthase qui assure le transfert de la lysine chargée positivement sur le phosphotidylglycérol de la membrane cellulaire. La délétion de ce gène ou l'apparition de mutations sur ce gène réduit les charges positives de la membrane bactérienne et ainsi diminue la sensibilité de la bactérie à la daptomycine qui est une molécule anionique et doit venir s'insérer au sein de la membrane bactérienne pour être active. Néanmoins le rôle causal de ces mutations sur *mprf* dans la résistance est encore mal connu et la résistance à la daptomycine est probablement un mécanisme multifactoriel, lié à des mutations de plusieurs gènes, rendant complexe la confirmation moléculaire de la résistance. Le séquençage du gène *mprf* a donc été arrêté par le

CNR courant 2018 car jugé peu contributif. Les souches résistantes à la daptomycine sont conservées dans l'attente d'un séquençage génome complet.

3.3.3.5 Détermination de la sensibilité à d'autres anti-infectieux

Le CNR est également amené à recevoir occasionnellement des souches pour vérifier la sensibilité ou détecter des mécanismes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques 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 en gradient de concentration permettant des mesures précises des CMI aux anti-staphylococciques utilisés en thérapeutique.

- **Sept souches** (4 *S. aureus*, 2 *S. epidermidis* et 1 *S. pettenkoferi*) ont été reçues car elles présentaient une **croissance difficile** et l'antibiogramme n'était pas réalisable dans les conditions usuelles. Ils ont été réalisés au CNR sur glucose contenant du sang afin de faciliter la croissance de ces souches déficientes.
- **Six souches** (dont 4 *S. aureus*) ont été reçues pour **confirmation du profil d'antibiogramme** car elles présentaient un profil jugé atypique par les laboratoires expéditeurs.
- **Cinq souches** de *S. aureus* ont été reçues pour vérification de la CMI de la **mupirocine** (principalement après échec de décolonisation nasale) : les 5 souches étaient sensibles à cet antibiotique.
- **Vingt-quatre souches** (14 *S. epidermidis*, 8 *S. aureus* et 2 *S. haemolyticus*) ont été reçues pour détermination de la sensibilité à la **dalbavancine**. Le CNR réalise dans ce contexte une mesure de CMI pour la vancomycine en microdilution (une souche sensible à la vancomycine étant sensible à la dalbavancine) et une CMI par bandelette Etest pour la dalbavancine. Le CASFM recommande de tester cet antibiotique en microdilution mais le CNR ne dispose pour l'instant pas de technique en microdilution (mais devrait en disposer fin 2020-début 2021). Sur ces 24 souches, 22 se sont avérées sensibles à la dalbavancine et deux souches, appartenant aux espèces *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, se sont avérées résistantes avec une CMI à 0,38 et 0,75 mg/L.
- **Dix souches** ont été reçues pour vérification de la sensibilité aux **synergistines** (pristinamycine et quinupristine-dalfopristine). Quatre d'entre elles étaient résistantes à l'érythromycine, la clindamycine et se sont révélées également résistantes aux synergistines. Les 6 autres souches étaient sensibles à la clindamycine mais le laboratoire expéditeur avait obtenu un résultat douteux pour les synergistines : ces souches étaient bien sensibles aux synergistines (à savoir que le phénotype sensible à la clindamycine, résistant aux synergistines est très rare chez les staphylocoques).
- **Deux souches** (*S. aureus* et *S. epidermidis*) ont été reçues pour détermination de la CMI du **tédizolide** et se sont révélées sensibles à cet antibiotique.
- **Une souche** de *S. aureus* a été reçue pour détermination de la CMI de la **tigécycline** et s'est révélée sensible à cet antibiotique. **Deux souches** (*S. aureus* et *S. epidermidis*) ont été reçues pour détermination de la CMI de la **doxycycline** et se sont révélées sensibles à cet antibiotique.

3.3.4 Analyse des tendances

Globalement, nous observons :

- Un nombre toujours élevé de souches reçues pour confirmation et étude de la résistance au linézolide. Ceci démontre une sensibilisation des laboratoires à la problématique de l'émergence de cette résistance. La

surveillance des déterminants responsables de cette résistance, notamment de la prévalence des gènes transférables comme *cftr*, est un enjeu majeur pour les prochaines années.

- Une augmentation du nombre de souches détectées résistantes à la daptomycine, associée à l'utilisation de plus en plus large de cet antibiotique.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Se reporter au chapitre 4. «Alerte » pour SPF

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

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

Le CNR des staphylocoques a 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 (Cf 5.2 Activités d'expertise auprès de structures européennes (ECDC, ...)).

Aucune étude spécifique n'a pu être réalisée au cours de l'année 2019 (et n'est prévue en 2020), les activités et les financements de l'ECDC étant actuellement surtout focalisés sur les entérobactéries et les acinetobacters produisant des carbapénèmases.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

4 Alerte

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

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

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

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

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

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

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

Depuis 2011, le CNR 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, Épinal, Lens, Arras, Mulhouse, Le Mans, Centre Hospitalier Sud Francilien, Lyon, Chambéry).

Certaines de ces investigations sont encore en cours avec des cas en 2019. Au cours de ces épisodes épidémiques, si des infections ont été identifiées, on observe surtout une augmentation du portage à *S. aureus* dans ces services qui ont nécessité les bio-nettoyages avec décontamination des personnels après ou sans dépistage préalable. Il est important de rappeler l'importance du dépistage de SA dans les services de néonatalogie aussi bien les SARM que les SASM. Ces épidémies avec des souches plutôt communautaires doivent également faire réfléchir à une possible introduction des souches par les parents au sein des services et aux mesures à mettre en place dans ce contexte (Figure 17).

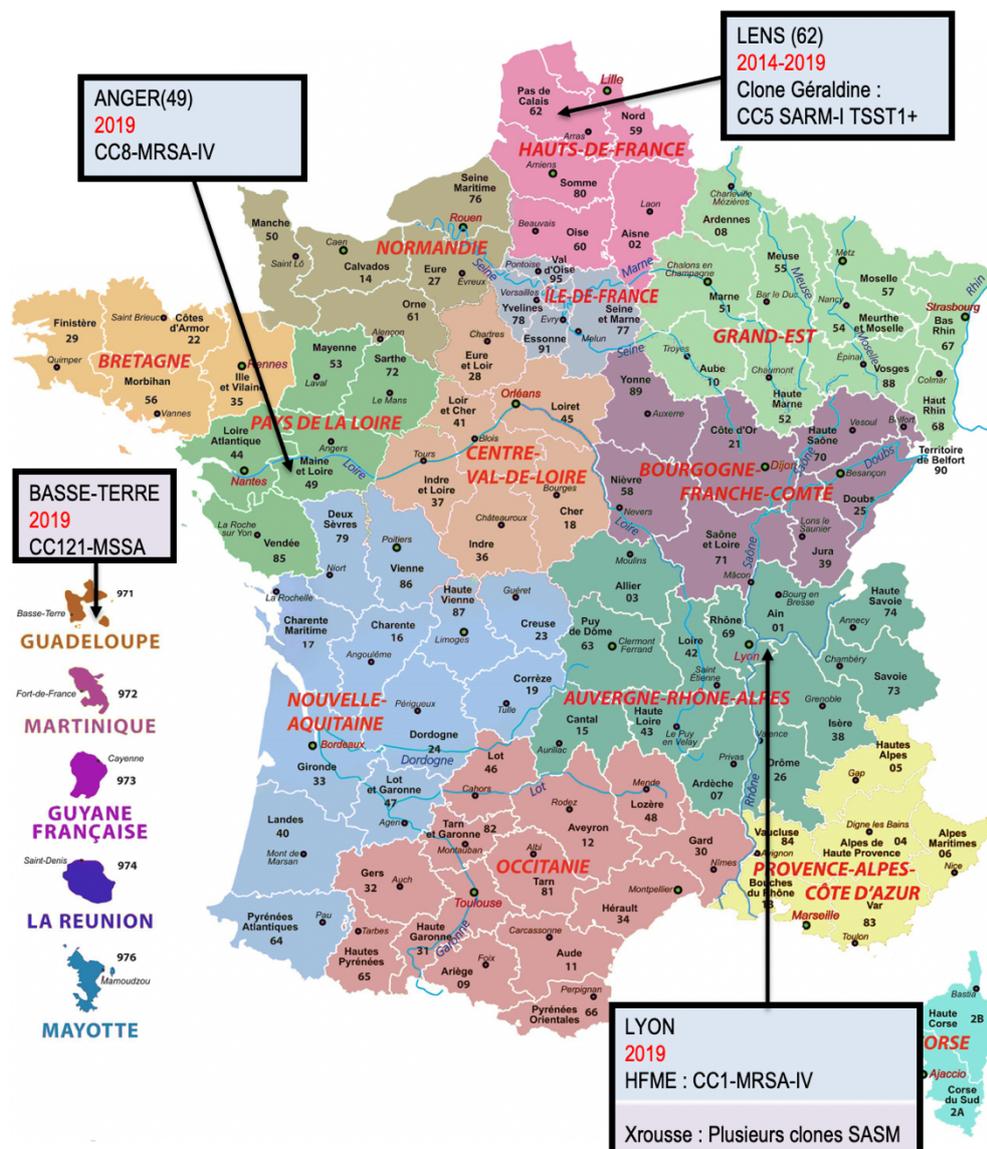


Figure 17. Épidémies d'infections à *S. aureus* dans les services de néonatalogie en France en 2019

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 Bordeaux¹², de Limoges¹³, d'Épinal et Arras et a poursuivi depuis 2017 l'investigation du service de néonatalogie de Lens. Ainsi, en 2019, nous avons à nouveau reçu 4 souches isolées dans le service de néonatalogie du CHU de Lens que nous avons analysées par séquençage pour déterminer s'il s'agissait d'une même souche ou de l'introduction successive de différentes souches appartenant au même clone. Ces souches ont été comparées à : (i) des souches du clone Géraldine isolées dans le même service entre 2015-2016 (n=25) et en 2018 (n=10) (ii) des souches du clone Géraldine isolées des épisodes épidémiques dans d'autres services (n=45) et (iii) des souches du clone Géraldine isolées hors cas d'épidémies et de différents départements (n=11).

¹² 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.

¹³ 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.

Le génome de la souche la plus ancienne de l'épidémie du clone Géraldine, dans le service de réanimation néonatale au CH de Lens (ST20150021, isolée en novembre 2014), a été utilisée comme référence pour construire un arbre phylogénétique basé sur les positions polymorphiques conservées (SNP dans le core-génome).

La comparaison génomique a montré la structure fortement clonale des souches isolées à Lens soit pendant le premier épisode épidémique soit pendant le nouvel épisode épidémique, détecté en 2018, en cours. Ainsi, le nombre maximum de SNP entre les souches phylogénétiquement les plus éloignées du groupe Lens n'est que de 44 SNP (Figure 18).

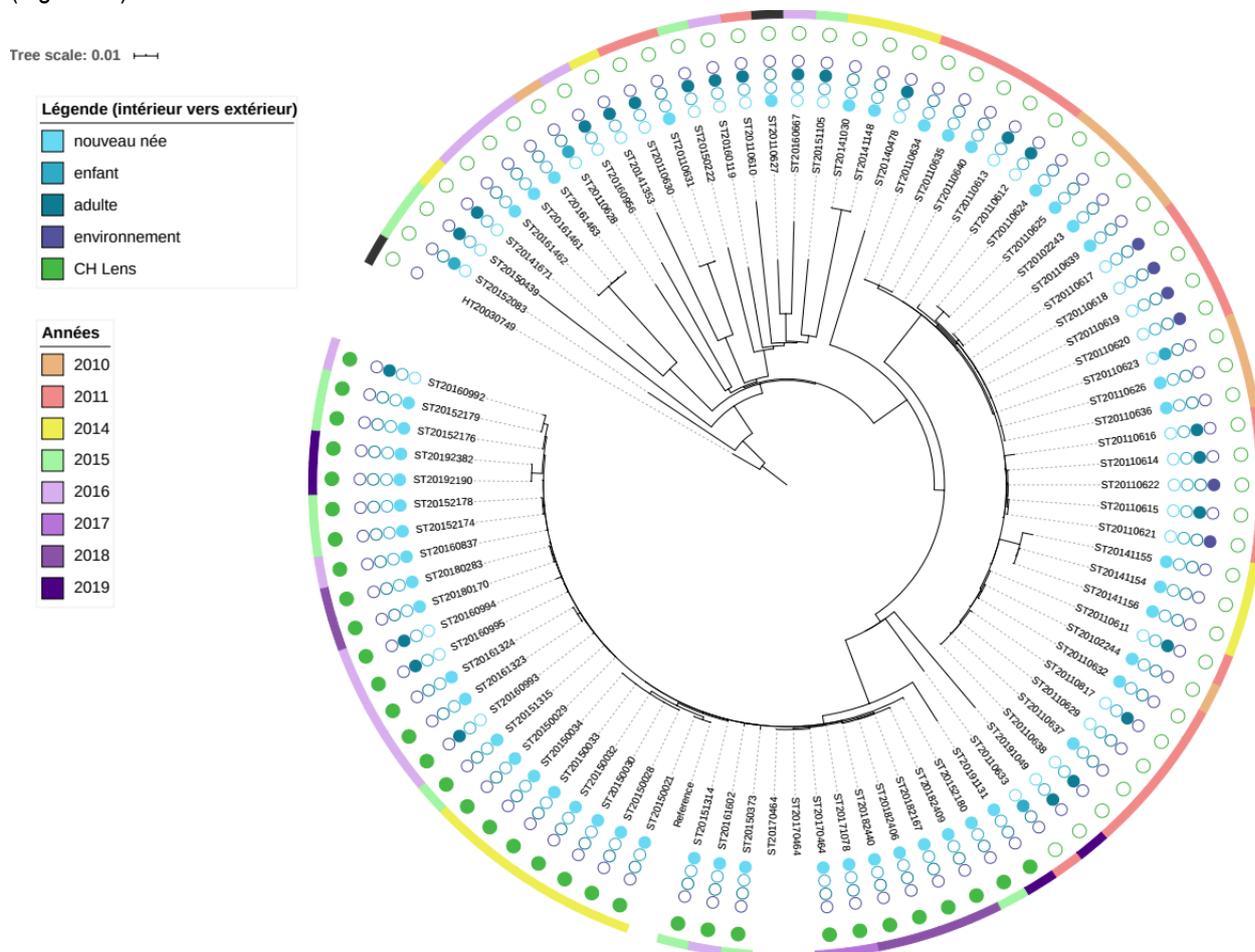


Figure 18. Phylogénie basée sur 1676 SNP du core-génome des souches ST5-MRSA-I, clone Géraldine.

Ces résultats corroborent l'endémie de cette souche Géraldine au sein du service de Néonatalogie de Lens.

ST8-MRSA-V / WA MRSA 115/132.

En 2019, le CNR a participé à la détection et l'investigation d'épidémies à SARM (ST8 MRSA-V SEKQ+ PVL-) dans le service de Néonatalogie de Angers. Ce clone a la particularité de présenter des résistances au bêta-lactamines et aux aminoglycosides.

Trente-deux souches (dont des souches de portage chez les nouveau-nés et des soignants et des souches d'infection chez les nouveau-nés), isolées entre janvier 2016 et octobre 2019, ont été séquencées au CNR.

La comparaison génomique a montré la présence de 2 populations différentes dans ce service. Une souche isolée en janvier 2018 est clairement différente des autres (ST20191631). Les 22 autres souches ont une structure fortement clonale avec deux 2 sous-populations. Le nombre maximum de SNP entre ces 22 souches est de 89 SNP et un minimum de 153 SNP avec la souche ST20191631 (Figure 19).

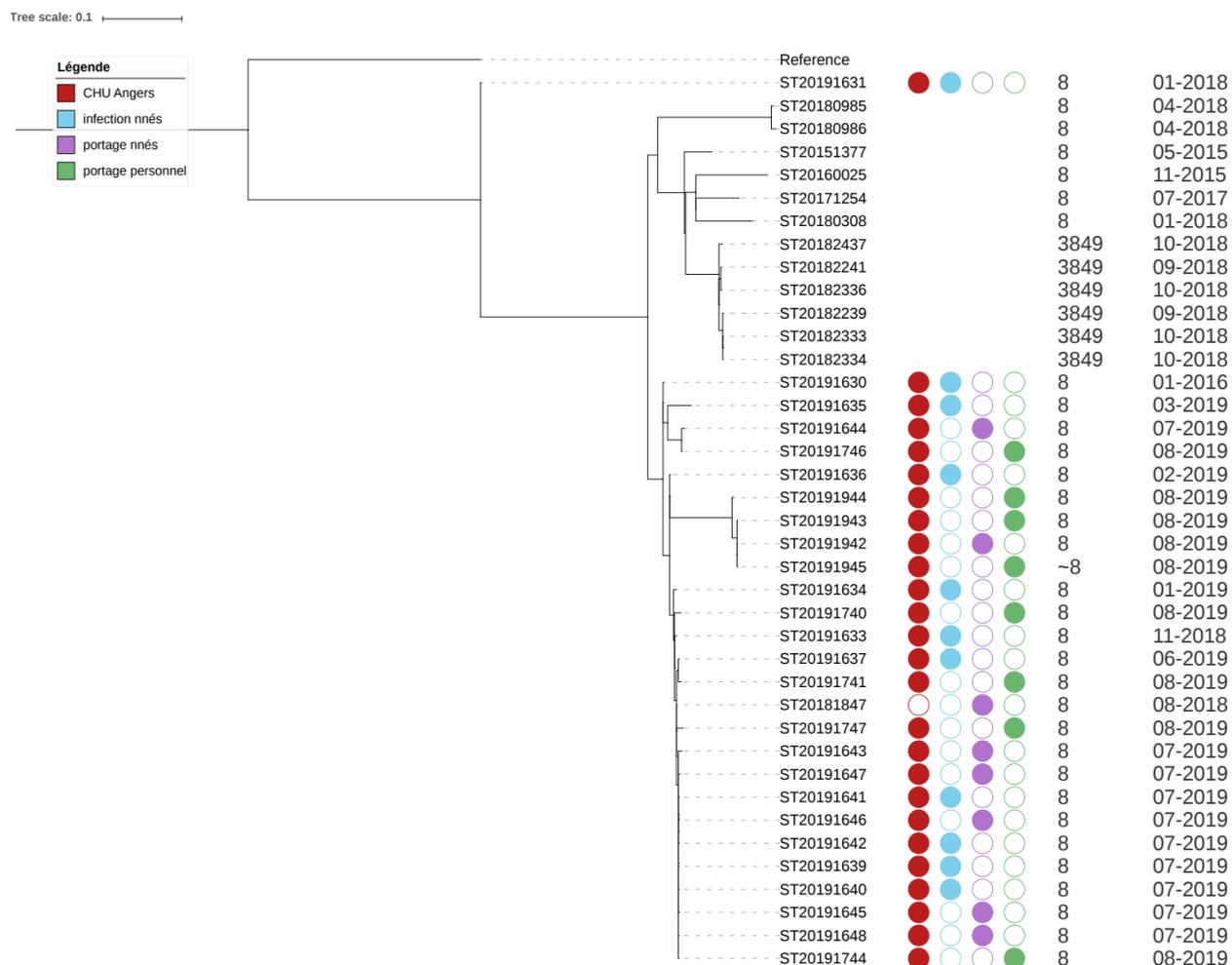


Figure 19. Phylogénie basée sur 1198 SNP du core-génoème des souches ST8-MRSA-V/ WA MRSA 115/132.

Ces résultats corroborent l'endémie de d'une population ST8 MRSA-V au sein du service de Néonatalogie de Angers.

CC30-MSSA.

En 2018 et 2019, dans le service de néonatalogie de l'hôpital de La Croix-Rousse, une enquête a été menée montrant une augmentation de la prévalence du portage à *S. aureus* (clones différents) au sein du service. Il a été décidé le renforcement des mesures d'hygiène au sein du service, une amélioration de la sensibilisation des parents aux mesures d'hygiène notamment.

En 2019, dans le même service, 8 cas de SASM CC30-MSSA *sea+* *tst+* ont été identifiés (portage et/ou infections), entre juin et septembre 2019.

Le CNR a investigué le lien épidémiologique de ces souches à la suite d'une demande de comparaison faite par le service.

La comparaison génomique a montré la présence de 2 populations différentes dans ce service. La distance maximum en SNP entre chaque population étant de 2 SNP tandis que la distance moyenne entre les 2 populations détectées dans le service été de 234 SNP.

La distance génétique des souches intra-population suggère une transmission directe dans le service des 2 populations (Figure 20).

Tree scale: 0.1

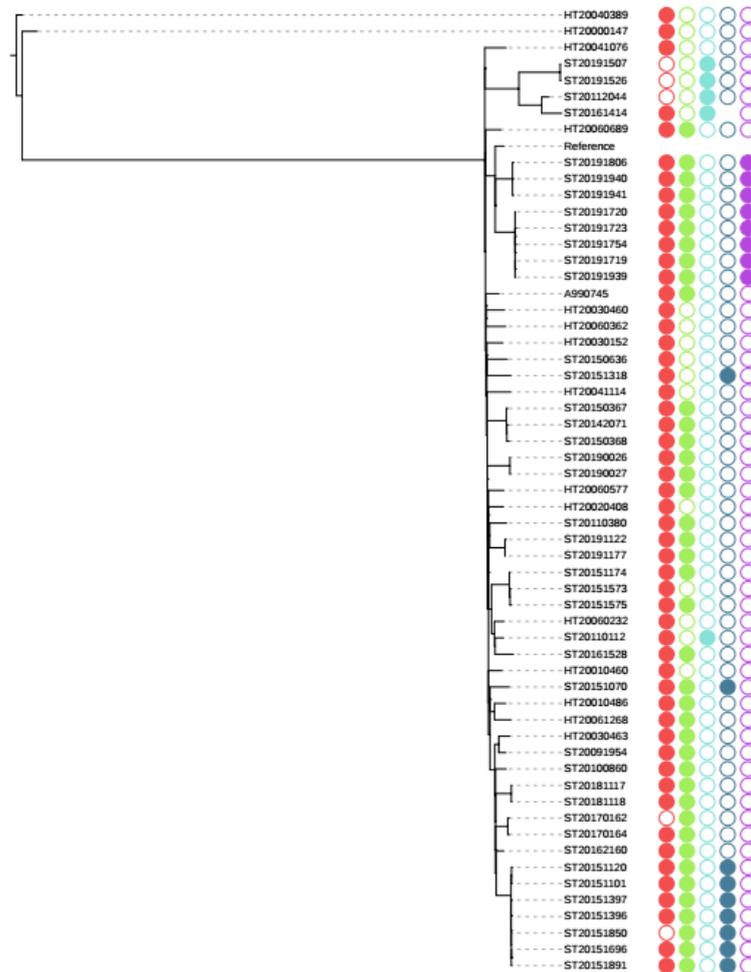
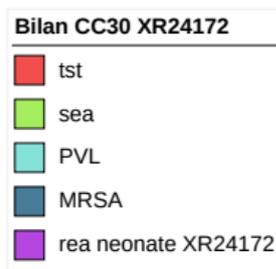


Figure 20. Phylogénie basée sur 836 SNP du core-génomme des souches CC30-MSSA .

CC121-MSSA.

En 2019, nous avons reçu plusieurs souches de *S. aureus* isolées dans le service de néonatalogie de Basse Terre pour recherche de lien de clonalité : 4 souches d'infections (3 de 2018 et 1 de 2019) et 16 souches de portage (seulement une appartenait au même complexe clonal que les souches d'infections). Les 4 souches d'infections et une souche de portage appartiennent au complexe clonal CC121-MSSA producteur de l'exfoliatine A (Figure 21). Les souches isolées en juillet 2018 ne présentent que 5 SNPs de différence (pour 18 jours d'écart entre l'isolement de ces deux souches) ce qui est compatible (compte tenu de l'horloge moléculaire de *Staphylococcus aureus*) avec une source commune de contagé, voire une transmission directe. Pour ce qui est des souches isolées en février 2019, la souche de portage du personnel et la souche d'infection présentent 27 SNPs de différence pour 12 jours d'écart, ce qui est difficilement compatible avec une transmission directe. De même il existe une différence de 99 SNPs entre les souches de juillet 2018 et celles de février 2019 ce qui est bien trop important pour incriminer la même « souche ». En revanche, on ne peut exclure une circulation importante de ces souches CC121-MSSA dans l'écosystème local du service de réanimation et/ou de l'hôpital dans son ensemble et/ou de Basse Terre en général, écosystème dans lequel circule et se diversifie ce clone.

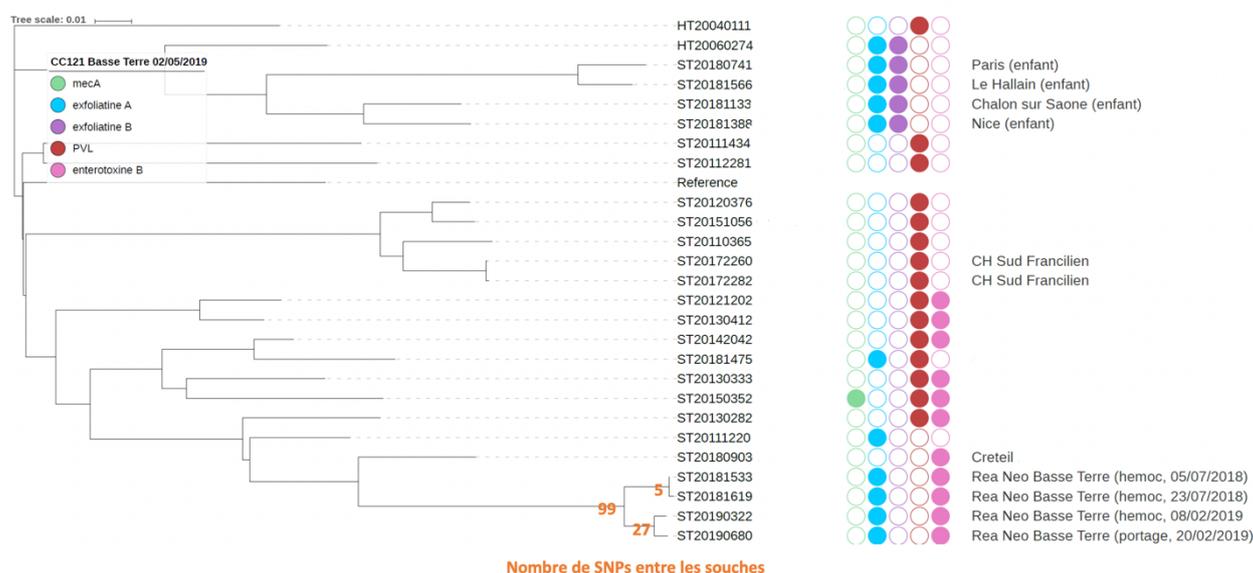


Figure 21. Phylogénie basée sur 5598 SNP du core-génome des souches CC121-MSSA.

4.2.2 Augmentation du signalement d'infections cutanées chez les militaires

Le CNR a été sollicité dans le cadre de signalement de cas groupés d'infections cutanées au sein différents régiments de l'armée française. Il s'agissait le plus souvent d'infections cutanées primitives de type furoncles ou abcès nécessitant ou non un drainage chirurgical. Les souches étaient des SARM ou des SASM possédant les gènes codant la leucocidine de Panton Valentine. Il n'a pas été montré de transmission directe de ces souches mais une augmentation de la prévalence ou au moins du signalement de cas d'infections à *S. aureus* PVL+ chez les militaires en opération ou non

4.2.3 Recherche de lien de clonalité

En 2019, de nombreuses demandes de recherche de lien de clonalité concernant des souches de *S. aureus* (SARM ou SASM) mais également des souches de staphylocoques non *aureus* (SCN) ont été adressées au CNR. Il pouvait s'agir de plusieurs souches isolées chez un même patient, de souches isolées lors de cas groupés ou d'une augmentation 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 était sollicité par les intervenants locaux (Figure 22).

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 nous permet d'affiner l'interprétation de nos résultats. Pour toutes les souches reçues dans un contexte de recherche de lien de clonalité, après un screening par PCR, une approche par séquençage génomique complet a permis d'affiner les résultats obtenus par les techniques classiques utilisées par le CNR.

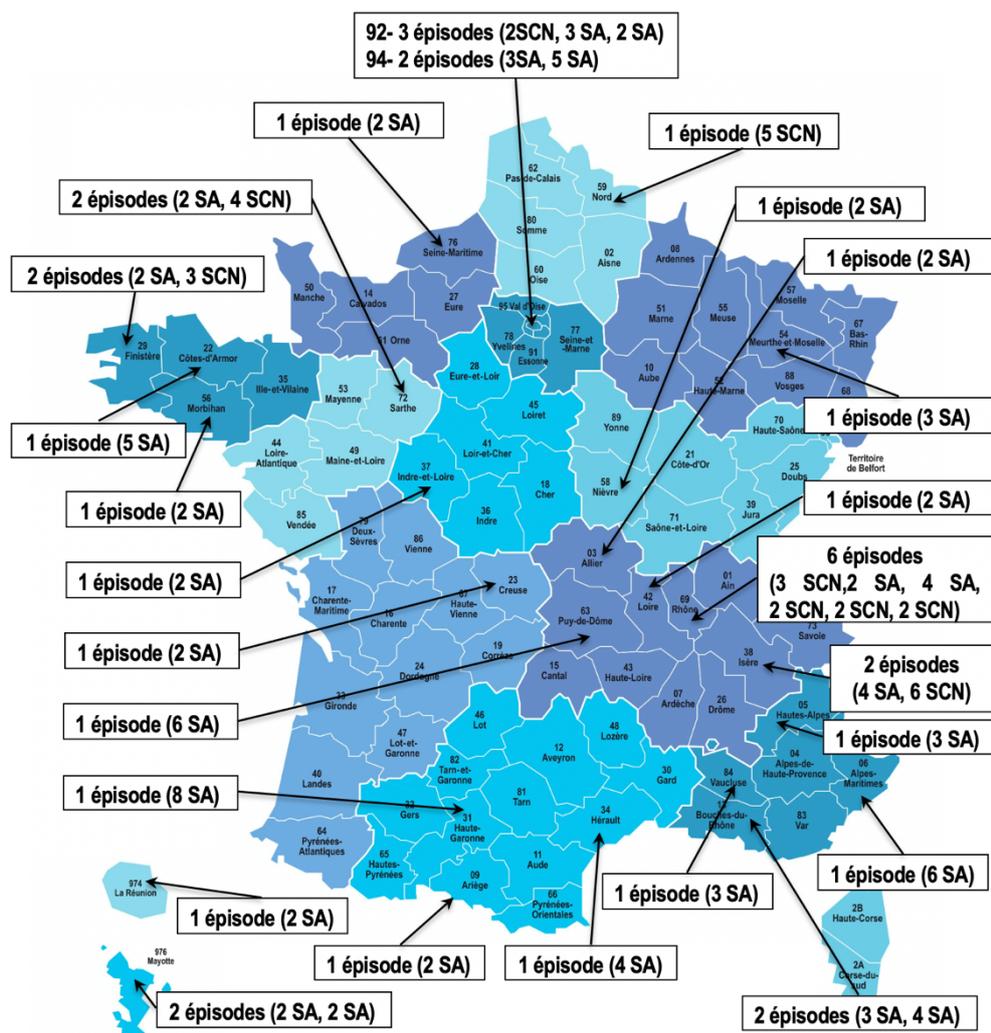


Figure 22- Recherches de lien de clonalité effectuées au CNR en 2019 (hors services de néonatalogie)

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

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

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

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

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

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

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

Organisation de FMC spécifiques

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

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

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

En 2019, le CNR n'a pas élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

Anne Tristan a participé en 2018 au groupe de travail pour l'élaboration des **recommandations HAS** de bonne pratique sur le thème : « Prise en charge des infections cutanées bactériennes courantes » adoptées par le Collège de la HAS le 27 février 2019.

Gérard Lina a participé à l'élaboration des CA-SFM EUCAST, 2019, V2.0, CA-SFM EUCAST, 2019, V1.0 et EUCAST 2019 (<http://www.eucast.org/>)

5.1.3 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :

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

Site Internet

Le CNR dispose d'un site internet <http://cnr.univ-lyon1.fr> où figurent l'ensemble des éléments concernant le fonctionnement du CNR (missions générales et spécifiques, coordonnées des membres du CNR, fiches de renseignements), les modalités d'envoi des souches et les fiches devant accompagner tout envoi au CNR, les analyses réalisées par le CNR, les documents concernant les enquêtes en cours (PHRC...), une synthèse concernant les différentes formes d'infections staphylococciques et leurs caractéristiques, les recommandations concernant la prise en charge des infections staphylococciques, les collaborations passées et en cours, les bilans annuels ou quadriennaux, ainsi que les congrès ou formations organisés par le CNR. Les informations pratiques et actualités sont mises à jour régulièrement sur le site. En raison du changement de serveur du site internet, une refonte du site du CNR a été faite en 2019 et sera finalisée d'ici fin 2020.

Interventions en séminaires FMC et Congrès

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

Publications didactiques en français

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

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

Les différentes demandes adressées au CNR sont gérées à travers un colloque hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce colloque permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel et de faire une revue des demandes parvenues au CNR et des réponses adressées aux correspondants. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais en interne et /ou en lien avec les demandeurs et/ou leur(s) tutelle(s) (CPias, ARS, CIRE, Santé Publique France). Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique par courrier (environ 2500 courriers en 2019). En fonction du contexte et de la nature des résultats obtenus, des contacts téléphoniques sont établis avec les cliniciens et/ou microbiologistes ayant adressé la demande. L'analyse des cas groupés fait l'objet d'un rapport présentant les résultats obtenus et les conseils du CNR afin d'assurer au mieux la gestion de ces épisodes.

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

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Santé Publique France

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

ANSM

Cf paragraphe 4.2.5

ECDC

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

ECDC – EARSS *Staphylococcus*

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

IMMI

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

ESCMID - ESGS

Le CNR Français est à l'origine de la création en 2013 au sein de l'ESCMID de l'European Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Infections (ESGS). Ce groupe comporte actuellement 102 membres issues de 23 pays. Son comité exécutif est formé de 5 personnes dont F. Vandenesch est le vice-chair.

Parmi les multiples missions de ce groupe, deux ont une importance majeure dans le cadre des missions du CNR :

- Organiser un contrôle de qualité externe pour les laboratoires de référence européens. Ce CQE a été organisé par notre CNR en 2017, 2018 et en 2019 pour **14 laboratoires** participants de **11 pays d'Europe**
- Organiser une surveillance de la sensibilité diminuée et de la résistance aux glycopeptides et lipoglycopeptides en Europe dans les bactériémies afin d'établir des données d'incidence en lien avec les consommations antibiotiques par centres. Cette étude qui devait démarrer en 2020 à l'initiative du CNR français sera reportée à 2021 en raison du COVID

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

Assemblée nationale

Gérard Lina. Audition par la délégation aux droits des femmes de l'Assemblée nationale pour la mission d'information sur les menstruations. 18.09.2019

Médias

Gérard Lina

- *Santé Magazine*. Règle, Des protections sans risques. 01/10/2019
- *Forme & Bien-être*. Comment prévenir le choc toxique avec les coupes menstruelles et les tampons. 03.07.2019.
- *Terrafemina*. Syndrome du Choc toxique : quels sont les symptômes et comment l'éviter ? 08.07.2019.
- *Le monde* « Choc toxique, endométriose, substances toxiques : les protections hygiéniques sont-elles dangereuses ? Youtube https://www.lemonde.fr/societe/video/2019/06/27/choc-toxique-endometriose-substances-toxiques-les-protections-hygieniques-sont-elles-dangereuses_5482332_3224.html. 27.07.2019.
- *Arte Snapchat*. « C'est quoi, le syndrome du choc toxique ? Choc toxique: une étude pointe les coupes menstruelles et le manque d'informations sur les tampons ». 26.09.2019.

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM « **Pathogénie des Staphylocoques** » dirigée par F. Vandenesch. Cette équipe qui a été évaluée très favorablement au printemps 2020 par l'HCERES, l'INSERM et le CNRS lors de la vague A a été recréée au 1^{er} janvier 2021 par les différentes tutelles. Elle est intégrée au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, Dir F.L. Cosset, Dir Adjoint F. Vandenesch), un centre de recherche labellisé par l'INSERM, le CNRS, l'Université de Lyon et l'Ecole Normale Supérieure de Lyon qui réunit 23 équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes (<http://ciri.inserm.fr/en/>). Trois axes de recherche sont développés au sein de l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » : un **axe d'épidémiologie-clinique**, un **axe physiopathologique** et un **axe fondamental** centré sur les mécanismes de régulation de la virulence et les petits ARN. L'axe clinique porte sur l'épidémiologie (y compris dans ses approches génomiques et phylodynamiques), la résistance et la clinique des infections staphylococciques ; il constitue l'axe le plus directement en lien avec l'activité du Centre National de Référence des Staphylocoques.

En 2019-20, 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.

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

Wirth T, Bergot M, Rasigade JP, et al. Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. *Nat Microbiol.* 2020;5(5):735-745. doi:10.1038/s41564-020-0676-2

Abstract.

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

Des sources et des réservoirs multiples pour *Staphylococcus capitis* au sein des services de réanimation néonatales

Butin M, Dumont Y, Monteix A, Raphard A, Roques C, Martins Simoes P, Picaud JC, Laurent F. Sources and reservoirs of *Staphylococcus capitis* NRCS-A inside a NICU. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019 Oct 17;8:157.

Abstract.

Background: The methicillin-resistant clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A, involved in sepsis in neonatal intensive care units (NICUs) worldwide, is able to persist and spread in NICUs, suggesting the presence of reservoirs inside each setting. The purpose of the present study was to identify these reservoirs and to investigate the cycle of transmission of NRCS-A in one NICU.

Methods: In a single institution study, NRCS-A was sought in 106 consecutive vaginal samples of pregnant women to identify a potential source of NRCS-A importation into the NICU. Additionally, NICU caregivers and

environmental including incubators were tested to identify putative secondary reservoirs. Finally, the efficacy of disinfection procedure in the elimination of NRCS-A from incubators was evaluated.

Results: No *S. capitis* was isolated from vaginal samples of pregnant women. Three of the 21 tested caregivers (14%) carried *S. capitis* on their hands, but none remain positive after a five-day wash-out period outside NICU. Moreover, the clone NRCS-A persisted during six consecutive weeks in the NICU environment, but none of the sampled sites was constantly contaminated. Finally, in our before/after disinfection study, all of 16 incubators were colonized before disinfection and 10 (62%) incubators remained colonized with NRCS-A after the disinfection procedure.

Conclusions: The partial ineffectiveness of incubators' disinfection procedures is responsible for persistence of NRCS-A inside a NICU, and the passive hand contamination of caregivers could be involved in the inter-patient transmission of *S. capitis*.

La désinfection à la vapeur est un moyen efficace de prévention des infections à *S. capitis* en réanimation néo-natale

Ory J, Cazaban M, Richaud-Morel B, Di Maio M, Dunyach-Remy C, Pantel A, Sotto A, Laurent F, Lavigne JP, Butin M. Successful implementation of infection control measure in a neonatal intensive care unit to combat the spread of pathogenic multidrug resistant *Staphylococcus capitis*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Mar 27;8:57.

Abstract.

Background: Once present in a neonatal intensive care unit (NICU), multidrug resistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A is able to settle and diffuse.

Objective: The objective of this study was to evaluate the impact of infection control (IC) interventions to reduce the spread of *Staphylococcus capitis* NRCS-A in a NICU.

Methods: Between December 2012 and December 2017, all patients presenting positive sampling (blood, skin or catheter) to *S. capitis* were included, and clinical data were recorded from electronic clinical charts. The IC team has continually implemented measures of control infections (hand hygiene, standard precautions, patient contact isolation and disinfection of the inanimate environment). From May 2015, a steam cleaner was implemented in the cleaning procedure instead of disinfectant to disinfect heating tables and incubators. Four periods were determined: Period 1 (P1) before steam cleaner acquisition; Period 2 (P2) after implementation steam cleaner; Period 3 (P3) when the steam cleaner had broken down, and Period 4 (P4) when the steam cleaner was functional again. The consumption of antibiotics and the epidemiology of infections inside the NICU were investigated during the study period.

Results: During the studied period, 37 infants were infected or colonized by *S. capitis*. The incidences of infection or colonization by *S. capitis* were P1 = 1.04‰, P2 = 0.55‰, P3 = 3.95 ‰ and P4 = 0‰ and were significantly different between P1-P3 and P2-P4 ($p < 0.001$). During the different periods, antibiotics consumption and bacterial epidemiology of the ward were stable.

Conclusions: The use of steam vapor system was associated with a significantly decreased incidence of *S. capitis* NRCS-A infection or colonization and could constitute an effective and safe procedure to control and eradicate its diffusion inside NICUs.

Une méthode innovante pour identifier le succès épidémique d'un micro-organisme sur la base de l'analyse génomique

Wirth T, Wong V, Vandenesch F, Rasigade JP. Applied phyloepidemiology: Detecting drivers of pathogen transmission from genomic signatures using density measures. *Evol Appl*. 2020;13(6):1513-1525. Published 2020 May 22. doi:10.1111/eva.12991

Abstract.

Understanding the driving forces of an epidemic is key to inform intervention strategies against it. Correlating measures of the epidemic success of a pathogen with ancillary parameters such as its drug resistance profile provides a flexible tool to identify such driving forces. The recently described time-scaled haplotypic density (THD) method facilitates the inference of a pathogen's epidemic success from genetic data. Contrary to demogenetic approaches that define success in an aggregated fashion, the THD computes an independent index of success for each isolate in a collection. Modeling this index using multivariate regression, thus, allows us to control for various sources of bias and to identify independent predictors of success. We illustrate the use of THD to address key questions regarding three

exemplary epidemics of multidrug-resistant (MDR) bacterial lineages, namely *Mycobacterium tuberculosis* Beijing, *Salmonella* Typhi H58, and *Staphylococcus aureus* ST8 (including ST8-USA300 MRSA), based on previously published, international genetic datasets. In each case, THD analysis allowed to identify the impact, or lack thereof, of various factors on the epidemic success, independent of confounding by population structure and geographic distribution. Our results suggest that rifampicin resistance drives the MDR Beijing epidemic and that fluoroquinolone resistance drives the *S. aureus* ST8/USA300 epidemic, in line with previous evidence of a lack of resistance-associated fitness cost in these pathogens. Conversely, fluoroquinolone resistance measurably hampered the success of *S. Typhi* H58 and non-H58. These findings illustrate how THD can help leverage the massive genomic datasets generated by molecular epidemiology studies to address new questions. THD implementation for the R platform is available at <https://github.com/rasigadelab/thd>.

Un test immunochromatographique pour détecter de manière fiable la PBP2a et 2c sur colonies

Dupieux C, Mouton W, André C, Vandenesch F, Bes M, Tristan A, Laurent F. Performance of the Revised Version of an Immunochromatographic Assay for Detection of *mecA*- and *mecC*-Mediated Methicillin Resistance in Staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2019 Dec 23;58(1):e01346-19.

Abstract.

The revised version of the PBP2a SA culture colony test (Alere) is a highly reliable, easy-to-use, and rapid test to detect *mecA*-positive isolates, which are the most prevalent among methicillin-resistant staphylococcal clinical isolates. In contrast to the previous version, it can be used for rapid detection of methicillin resistance in SNA isolates in routine practice. However, users must be aware that this revised version no longer allows identification of *mecC*-positive MRSA isolates, even after induction. Thus, with this revised version of the test, for an *S. aureus* isolate phenotypically detected as being methicillin resistant using cefoxitin or oxacillin (with cefoxitin being more reliable for the detection of *mecC*-positive isolates), *mecC*-positive MRSA can be suspected if the PBP2a SACCT result is negative. Conversely, in case of phenotypic doubt regarding methicillin resistance, such as with an atypical profile in automated methods (cefepime resistant and oxacillin susceptible), a negative PBP2a SACCT result, even after induction, does not allow exclusion of a *mecC*-positive isolate.

Les difficultés à distinguer une morsure d'araignée d'une infection à *Staphylococcus aureus* producteur de toxine de Panton Valentine

Del Giudice P, Hubiche T, Fribourd A, Gillon J, Roudière L, Merle R, Tristan A, Vandenesch F, Blanc-Amrane V. Morsure d'araignée ou infection à *Staphylococcus aureus* producteur de toxine de Panton Valentine ? [Spider bite or infection caused by Panton Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*?]. *Ann Dermatol Venereol*. 2019 Nov;146(11):711-714.

Abstract.

Introduction: Spiders, especially those of the genus *Loxocles* such as *L. rufescens*, endemic in Mediterranean regions, are frequently reported as causes of venom poisoning in humans in the south of France. The most common signs consist of cutaneous necrosis presenting initially as inflammatory cellulitis and progressing towards the emergence of a necrotic center.

Patients and methods: We report 4 cases, initially considered as spider bites due to their sudden occurrence and pain. Rigorous clinical examination coupled with collection of samples for laboratory analysis ultimately enabled the diagnosis to be corrected to one of suppurative skin infection caused by *Staphylococcus aureus* producing the cytotoxin Panton Valentine leucocidin.

Discussion: These observations highlight the potential for confusion between spider bites and infections with PVL-producing *S. aureus*.

Les personnels techniques (ouvriers, ingénieurs biomédicaux) des hôpitaux sont une catégorie à très haut risque de portage nasal à *S. aureus*

Boisset S, Saadatian-Elahi M, Landelle C, Bes M, Gustave CA, Tristan A, Fassier JB, Laurent F, Grando J, Vandenesch F, Bouchiat C. Unexpected categories at risk of *S. aureus* nasal carriage among hospital workers. *Int J Hyg Environ Health*. 2019 Sep;222(8):1093-1097.

Abstract.

Objectives: Thirty percent of the general population are *Staphylococcus aureus* nasal carriers. It has been shown that this increases with repeated contact with patients, but it is not known whether all categories of healthcare workers are at equal risk of carriage. We aimed to explore *S. aureus* nasal carriage among healthcare professionals.

Methods: Prospective study conducted in two French university hospitals in 2014 and 2016. Volunteers were screened for *S. aureus* nasal carriage. Profession and hygiene habits were collected. Based on the results of this initial study, a second study focused on semi-skilled workers and biomedical equipment technicians (BETs) only; participants were given education on the basic rules of hygiene, then re-screened three months later.

Results: In the initial study, 38.8% of the 436 participants were detected as nasal carriers. There was a significant difference in nasal carriage according to professional category ($p < 0.0001$); the lowest was found among administrative agents (17.3%), followed by healthcare providers (37.4%), laboratory technicians (37.6%). The greatest proportion was found among semi-skilled workers and BETs (52.9%). *Spa*-typing ruled out the hypothesis of a single clone dissemination among colleagues. After the three-month hygiene awareness campaign, all re-screened individuals remained positive, and with their respective initial strain.

Conclusions: To the best of our knowledge we report here for the first time that semi-skilled workers and BETs are specifically more at risk of *S. aureus* nasal colonisation. This striking finding urges hospital hygiene departments to evaluate this specific professional category and implement strategies to improve hygiene awareness.

Le portage nasal mais aussi rectal à *S. aureus* des patients en réanimation sont un facteur de risque d'infection invasive à *S. aureus*.

Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, Mariat C, Haddar CH, Carricajo A, Fonsale N, Grattard F, Pozzetto B, Laurent F, Berthelot P, Verhoeven PO. Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Oct;38(10):1811-1819.

Abstract.

The aim of this study was to investigate the relationship between nasal and rectal *Staphylococcus aureus* carriage in intensive care unit (ICU) patients and the occurrence of ICU-acquired infections related to *S. aureus* carriage. Three hundred and ninety-five patients admitted in ICU were screened for *S. aureus* nasal and rectal carriages and followed to record *S. aureus* infections during their stay. *S. aureus* strains were genotyped by arbitrarily primed PCR, *spa*-typing, microarray and whole genome sequencing. At ICU admission, 112 of 363 (30.9%) patients carried *S. aureus* including 61 (16.8%) exclusive nasal carriers, 40 (11.0%) combined nasal and rectal carriers and 11 (3.0%) exclusive rectal carriers. The 152 *S. aureus* isolates from nasal and rectal swabs belonged to 19 clonal complexes (CCs). Patients colonized in both nose and rectum harboured different strains in at least 40% of cases according to arbitrarily primed PCR data. Nasal carriers of CC5 *S. aureus* had an increased risk of rectal carriage (RR = 1.85, $P < .05$). *S. aureus* nasal and rectal carriage was a risk factor of *S. aureus* ICU-acquired infection (RR = 4.04; 95%CI [1.38-11.76]). Incidence rates of endogenous ICU-acquired infections in exclusive nasal carriers, exclusive rectal carriers and in both nasal and rectal carriers were 0.08 (5/61), 0.09 (1/11) and 0.03 (1/40), respectively ($p = 0.47$). Rectal swabbing increased the detection of *S. aureus* carriage and revealed an important diversity of *S. aureus* strains in ICU patients. Further studies are needed to understand how *S. aureus* rectal carriage increases the risk of endogenous ICU-acquired infections.

Une nouvelle cassette SCCmec de structure mosaïque au sein de SARM ST5 Français

Barraud O, Laurent F, Dyon-Tafari V, Dupieux-Chabert C, Bes M, Ploy MC, Garnier F, Martins Simoes P. Novel staphylococcal cassette chromosome composite island (SCC-CI) with a new subtype of SCCmecVI cassette found in ST5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France. Int J Antimicrob Agents. 2019 May;53(5):694-697.

Abstract.

An emergent kanamycin-susceptible ST5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage has been identified in France. Whole-genome sequencing revealed a 40-kb staphylococcal cassette chromosome (SCC) composite island with a mosaic structure including three SCC elements: a Ψ SCCcop/ars, a SCCLim88A with a *ccrC* recombinase, and a novel subtype of SCCmec type VI (VIb). This mosaic structure suggests a high recombination rate of SCC elements from distinct staphylococci species.

Les SARM *mecC* peuvent persister longtemps au sein des fermes d'élevage bovin

Bietrix J, Kolenda C, Sapin A, Haenni M, Madec JY, Bes M, Dupieux C, Tasse J, Laurent F. Persistence and Diffusion of *mecC*-Positive CC130 MRSA Isolates in Dairy Farms in Meurthe-et-Moselle County (France). *Front Microbiol.* 2019 Jan 30;10:47.

Abstract.

Background: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) is classically conferred by the acquisition of the *mecA* gene encoding an additional penicillin binding protein with low affinity for beta-lactams. A *mecA* variant, named *mecC*, was described in 2011. MRSA isolates harboring *mecC* of both animal and human origin have since been collected in different European countries. In France, animal cases were reported in 4 dairy farms between 2008 and 2013 in the Meurthe-et-Moselle county, all located in a 30 km perimeter, suggesting a possible dissemination of *mecC*-positive MRSA strains. We performed a prospective study to evaluate the local epidemiology of such strains in terms of (i) dissemination among animals, humans and in the environment, and (ii) persistence in Meurthe-et-Moselle dairy cattle farms. **Methods:** The 4 French dairy farms with previous reports of *mecC*-positive MRSA strains and 14 farms in the same perimeter were included in this study. In each farm, nasal swabs, rectal swabs and milk samples were collected from 10 randomly selected cows, as well as nasal samples from family pets, volunteer farmers and veterinarians. One farm (E0), in which *mecC*-MRSA isolates were detected, was selected to study more deeply the dissemination of *mecC*-positive strains within the farm. After pre-enrichment of swabs and milk, they were subcultured on MSSA/MRSA chromogenic selective agar plates. *S. aureus* colonies were tested with a multiplex PCR to detect the *mecA* and *mecC* genes. The *mecC*-positive strains were characterized using DNA microarray. **Results:** *mecC*-positive strains were recovered in four farms, corresponding to the ones with previous reports of *mecC*-positive MRSA strains, and originated only from dairy cow samples. The screening in the E0 farm showed that 22% of the dairy cows carried *mecC*-positive MRSA. Three strains were also isolated from the environmental samples. All *mecC*-positive strains belonged to the clonal complex CC130 and harbored the same *spa*-type t1736. **Conclusion:** This study found that *mecC*-positive MRSA isolates are able to persist within the same farms for several years after being introduced in this setting and are able to widely disseminate but only among dairy cows suggesting that milking machines might be a key player.

Reconnaitre le choc toxique staphylococciques chez la jeune fille en période menstruelle

Dugourd PM, Dupont A, Hubiche T, Chiaverini C, Alkhalifa A, Roudiere L, Tristan A, Gustave CA, Del Giudice P. Érythème généralisé fébrile et choc : choc toxique staphylococcique [Staphylococcal toxic shock syndrome should be considered in the event of diffuse erythema with fever and shock]. *Ann Dermatol Venerol.* 2019 Apr;146(4):287-291.

Abstract.

Background: Toxic shock syndrome (TSS) was first described by Todd in 1978. The relevant Lancet publication reported 7 cases of children with fever, exanthema, hypotension and diarrhoea associated with multiple organ failure. An association between TSS and use of hyper-absorbent tampons in menstruating women was discovered in the 1980s. Following the market withdrawal of such tampons, TSS virtually disappeared. Herein we report a new case of TSS in a 15-year-old girl.

Patients and methods: A 15-year-old patient was admitted to intensive care for severe sepsis and impaired consciousness associated with diffuse abdominal pain. Dermatological examination revealed diffuse macular exanthema. Laboratory tests showed hepatic cytolysis (ASAT 101 U/L, ALAT 167 U/L, total bilirubin 68µmol/L) and an inflammatory syndrome. Lumbar puncture and blood cultures were sterile while thoraco-abdomino-pelvic and brain scans were normal. The patient was menstruating and had been using a tampon over the previous 24hours. Vaginal sampling and tampon culture revealed TSST-1 toxin-producing *S. aureus*. Management consisted of intensive care measures and treatment with amoxicillin-clavulanic acid and clindamycin for 10 days.

Conclusion: In case of septic shock associated with diffuse macular exanthema a diagnosis of TSS must be envisaged, particularly in menstruating women

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

(I) Publications nationales et Publications internationales

Wirth T, Bergot M, Rasigade JP, et al. Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. *Nat Microbiol.* 2020;5(5):735-745.

Wirth T, Wong V, Vandenesch F, Rasigade JP. Applied phyloepidemiology: Detecting drivers of pathogen transmission from genomic signatures using density measures. *Evol Appl.* 2020;13(6):1513-1525.

Maali Y, Diot A, Martins-Simões P, Bes M, Bouvard D, Vandenesch F, Verhoeven PO, Laurent F, Trouillet-Assant S. Identification and characterization of *Staphylococcus delphini* internalization pathway in non-professional phagocytic cells. *Infect Immun.* 2020 Feb 24;IAI.00002-20.

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

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

Dupieux C, Mouton W, André C, Vandenesch F, Bes M, Tristan A, Laurent F. Performance of the Revised Version of an Immunochromatographic Assay for Detection of *mecA*- and *mecC*-Mediated Methicillin Resistance in Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2019 Dec 23;58(1):e01346-19.

Desgranges E, Bronesky D, Corvaglia A, François P, Caballero C, Prado L, Toledo-Arana A, Lasa I, Moreau K, Vandenesch F, Marzi S, Romby P, Caldelari I. RsaI, un ARN régulateur aux multiples facettes, module le métabolisme du pathogène opportuniste *Staphylococcus aureus* [RsaI, a multifaceted regulatory RNA, modulates the metabolism of the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*]. *Med Sci (Paris).* 2019 Dec;35(12):1221-1223.

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

Briaud P, Camus L, Bastien S, Doléans-Jordheim A, Vandenesch F, Moreau K. Coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* transcriptome, antibiotic resistance and internalization into epithelial cells. *Sci Rep.* 2019 Nov 12;9(1):16564.

Loss G, Simões PM, Valour F, Cortês MF, Gonzaga L, Bergot M, Trouillet-Assant S, Josse J, Diot A, Ricci E, Vasconcelos AT, Laurent F. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Oct 22;9:363.

Butin M, Dumont Y, Monteix A, Raphard A, Roques C, Martins Simoes P, Picaud JC, Laurent F. Sources and reservoirs of *Staphylococcus capitis* NRCS-A inside a NICU. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019 Oct 17;8:157.

Del Giudice P, Hubiche T, Fribourd A, Gillon J, Roudière L, Merle R, Tristan A, Vandenesch F, Blanc-Amrane V. Morsure d'araignée ou infection à *Staphylococcus aureus* producteur de toxine de Panton Valentine ? [Spider bite or infection caused by Panton Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*?]. *Ann Dermatol Venereol.* 2019 Nov;146(11):711-714.

Lalaouna D, Baude J, Wu Z, Tomasini A, Chicher J, Marzi S, Vandenesch F, Romby P, Caldelari I, Moreau K. RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of *Staphylococcus aureus* during manganese starvation. *Nucleic Acids Res.* 2019 Oct 10;47(18):9871-9887.

Boisset S, Saadatian-Elahi M, Landelle C, Bes M, Gustave CA, Tristan A, Fassier JB, Laurent F, Grando J, Vandenesch F, Bouchiat C. Unexpected categories at risk of *S. aureus* nasal carriage among hospital workers. *Int J Hyg Environ Health*. 2019 Sep;222(8):1093-1097.

Baude J, Bastien S, Gillet Y, Leblanc P, Itzek A, Tristan A, Bes M, Duguez S, Moreau K, Diep BA, Norrby-Teglund A, Henry T, Vandenesch F; INFECT Study Group. Necrotizing Soft Tissue Infection *Staphylococcus aureus* but not *S. pyogenes* Isolates Display High Rates of Internalization and Cytotoxicity Toward Human Myoblasts. *J Infect Dis*. 2019 Jul 19;220(4):710-719.

Josse J, Valour F, Maali Y, Diot A, Batailler C, Ferry T, Laurent F. Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Front Microbiol*. 2019 Jul 17;10:1602.

Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, Mariat C, Haddar CH, Carricajo A, Fonsale N, Grattard F, Pozzetto B, Laurent F, Berthelot P, Verhoeven PO. Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Oct;38(10):1811-1819.

Lina G. New insights into coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Sep;25(9):1063.

Kolenda C, Monteix A, Houhamdi L, Preynat-Boucher P, Giannoli JM, Escuret V, Laurent F, Morfin F. Do liquid wastes from automated instruments in medical laboratories have their proper microbicide effect? *Ann Biol Clin (Paris)*. 2019 Jun 1;77(3):295-305.

Deplanche M, Mouhali N, Nguyen MT, Cauty C, Ezan F, Diot A, Raulin L, Dutertre S, Langouet S, Legembre P, Taieb F, Otto M, Laurent F, Götz F, Le Loir Y, Berkova N. *Staphylococcus aureus* induces DNA damage in host cell. *Sci Rep*. 2019 May 22;9(1):7694.

Matard B, Donay JL, Resche-Rigon M, Tristan A, Farhi D, Rousseau C, Mercier-Delarue S, Cavalier-Balloy B, Assouly P, Petit A, Bagot M, Reygagne P. Folliculitis decalvans is characterized by a persistent, abnormal subepidermal microbiota. *Exp Dermatol*. 2020 Mar;29(3):295-298.

Butin M, Claris O, Laurent F. Clinical impact of vancomycin heteroresistance in staphylococcal strains involved in neonatal sepsis: Discussion of a case report. *Arch Pediatr*. 2019 May;26(4):236-237.

Ory J, Cazaban M, Richaud-Morel B, Di Maio M, Dunyach-Remy C, Pantel A, Sotto A, Laurent F, Lavigne JP, Butin M. Successful implementation of infection control measure in a neonatal intensive care unit to combat the spread of pathogenic multidrug resistant *Staphylococcus capitis*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Mar 27;8:57.

Laurent F, Butin M. *Staphylococcus capitis* and NRCS-A clone: the story of an unrecognized pathogen in neonatal intensive care units. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Sep;25(9):1081-1085.

Barraud O, Laurent F, Dyon-Tafari V, Dupieux-Chabert C, Bes M, Ploy MC, Garnier F, Martins Simoes P. Novel staphylococcal cassette chromosome composite island (SCC-CI) with a new subtype of SCCmecVI cassette found in ST5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 May;53(5):694-697.

Abad L, Tafari V, Tasse J, Josse J, Chidiac C, Lustig S, Ferry T, Diot A, Laurent F, Valour F. Evaluation of the ability of linezolid and tedizolid to eradicate intraosteoblastic and biofilm-embedded *Staphylococcus aureus* in the bone and joint infection setting. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Mar 1;74(3):625-632.

Bronesky D, Desgranges E, Corvaglia A, François P, Caballero CJ, Prado L, Toledo-Arana A, Lasa I, Moreau K, Vandenesch F, Marzi S, Romby P, Caldeleri I. A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J*. 2019 Mar 15;38(6):e99363.

Bietrix J, Kolenda C, Sapin A, Haenni M, Madec JY, Bes M, Dupieux C, Tasse J, Laurent F. Persistence and Diffusion of mecC-Positive CC130 MRSA Isolates in Dairy Farms in Meurthe-et-Moselle County (France). *Front Microbiol*. 2019 Jan 30;10:47.

Dugourd PM, Dupont A, Hubiche T, Chiaverini C, Alkhalifa A, Roudiere L, Tristan A, Gustave CA, Del Giudice P. Érythème généralisé fébrile et choc : choc toxique staphylococcique [Staphylococcal toxic shock syndrome should be considered in the event of diffuse erythema with fever and shock]. *Ann Dermatol Venerol*. 2019 Apr;146(4):287-291.

Bergot M, Martins-Simoes P, Kilian H, Châtre P, Worthing KA, Norris JM, Madec JY, Laurent F, Haenni M. Evolution of the Population Structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Front Microbiol*. 2018 Dec 13;9:3055.

(II) *Communications nationales et communications internationales*

ORALES

André C, Martins-Simões P, Cortès Farrel M, Cremet L, Bemer P, Corvec S, Caillon J, Vandenesch F, Dupieux-Chabert C, Laurent F. Outbreak of oxazolidinone-resistant staphylococci due to the concomitant dissemination of a *cfr*-positive subpopulation belonging to the MDR worldwide-disseminated “Australian” ST2 *S. epidermidis* clone and of its *cfr*-positive plasmid in various *S. aureus* lineages. ECCMID, Amsterdam, avril 2019.

Billon A, Gustin MP, Tristan A, Gustave CA, Vanhems P, Lina G. Mauvais usage des tampons et syndrome menstruel de choc toxique en France : étude cas-témoin. 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 16-17 décembre 2019.

AFFICHEES

Durand G, Martins-Simoes P, Bes M, Gustave CA, Fulchiron C, Fruiquière B, Rivat S, Munoz L, Ranc AG, Vandenesch F, Laurent F, Tristan A, Dupieux-Chabert C. Truncation of GdpP mediates B-Lactam resistance in *mec* gene-negative clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* expressing unexpected heterogeneous methicillin resistance. ECCMID, Amsterdam, 2019.

Cortès Farrel M, André C, Martins-Simões P, Cremet L, Bemer P, Corvec S, Caillon J, Dupieux-Chabert C, Laurent F. First outbreak of linezolid-resistant isolates with evidence of inter-species transfer of *cfr*-positive plasmid in several *Staphylococcus aureus* clones and one of the MDR worldwide-disseminated “Australian” *S. epidermidis* clones. Congrès Microbes, ASM, San Francisco, USA, 2019.

Dupieux-Chabert C, André C, Jeanne E, Vuillot C, Bes M, Vandenesch F, Tristan A, Martins Simoes P, Laurent F. CMI linézolide des staphylocoques : comparaison des techniques Etest®/UMIC®. RICAI, Paris, 2019.

Munier C, Dupieux-Chabert C, Kolenda C, Bes M, Dauwalder O, Vandenesch F, Tristan A, Laurent F. Utilisation du test immunochromatographique PBP2a (Alere-Abbott) sur cultures primaires précoces à partir d'hémocultures positives à staphylocoques. RICAI, Paris, 2019.

(III) *Conférences sur invitations*.

Dupieux-Chabert C. *Staphylococcus epidermidis*, une nouvelle menace ? Journée scientifique Correvio, Paris, janvier 2019

Dupieux-Chabert C. Staphylocoques et résistances aux antibiotiques. Journées de Biologie clinique Necker/Institut Pasteur, Paris, janvier 2019.

Dupieux-Chabert C. Fiabilité des méthodes de détection de la résistance aux antibiotiques (hors méthodes de référence) : bactéries à Gram positif. RICAI, Paris, décembre 2019.

Lina G. Syndrome du choc toxique menstruel en 2019 ? 35ème Journée du Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique, mai 2019, Lyon.

Vandenesch F. Antibiotic pollution is a potential driver of CA-MRSA expansion. International Conference on One Health Antimicrobial Resistance (ICOHAR). Utrecht, Netherlands 16 – 18 April 2019.

Vandenesch F. Demographic fluctuation of community-acquired antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* lineages: potential role of a low level antibiotic and heavy metal exposures. Seminar of the dpt Microbiology & Molecular Medicine, University of Geneva. Geneva, Switzerland, 6 May 2019.

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

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

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR poursuivra en 2020/21 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal. Les éléments spécifiques et/ou nouveaux sont :

8.1 Activités d'expertise

8.1.1 Le réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Le CNR est en lien avec un important réseau de correspondants de CHU, CHR et laboratoires privés (370 en 2019). Il fidélisera ses correspondants actuels et poursuivra le développement de ce réseau par une retour d'information rapide et personnalisé à l'ensemble des correspondants. Il essaiera de raccourcir les temps de rendu grâce à la transmission électronique sécurisée des comptes rendus et de leur interprétation

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

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

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

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

Etude de déterminations des CMI de la ceftaroline et du ceftobiprole sur une collection de staphylocoques à coagulase négative (étude EUCAST/SFM)

Actuellement, il n'existe pas de concentration critique pour la ceftaroline et le ceftobiprole vis-à-vis des staphylocoques à coagulase négative. Le CNR participera courant 2020 à une étude multicentrique organisée par l'EUCAST afin d'évaluer les CMI en microdilution de la ceftaroline et du ceftobiprole sur des souches de staphylocoques à coagulase négative considérées sauvages (30 souches des 7 espèces de SCN les plus fréquentes dans les infections humaines), ceci afin que l'EUCAST puisse déterminer les cut-offs épidémiologiques et ainsi des concentrations critiques pour ces antibiotiques vis-à-vis des SCN.

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

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

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

8.2 **Activités de conseil, formation et information**

8.2.1 Les projets de formation envisagés

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

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

Pour la diffusion des conseils, des informations aux professionnels et la **rétro-information** des partenaires, le CNR propose de reconduire le modèle adopté jusque-là en cherchant à l'améliorer : chaque demande adressée au CNR continuera à faire l'objet d'une réponse individualisée apportant le maximum d'informations aux prescripteurs des analyses afin d'améliorer la prise en charge des patients concernés ou de gérer au mieux les situations épidémiologiques rencontrées dans les situations de cas groupés.

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

Comme cela a été le cas en 2019, le CNR des staphylocoques s'engage à répondre à toutes les demandes de ses tutelles concernant les infections staphylococciques qu'il s'agisse de gestion des phénomènes épidémiques, de recommandations au niveau nationale concernant la gestion des patients, de leur traitement, de leur prise en charge plus globale ou de l'analyse de risque de transmission humaine ou animale.

8.2.4 Autres activités de référence

En 2020, le CNR organisera de nouveau le CQE européen avec une nouveauté majeure : en sus des souches transmises pour caractérisation phénotypique et moléculaire, des fichiers FastQ de génomes de *S. aureus* seront fournis pour analyse bioinformatique et interprétation en termes de détection ou pas d'un phénomène épidémique. Il s'agit, en s'affranchissant de la phase (et du coût) de la réalisation technique du séquençage, de tester la capacité des laboratoires d'experts à exploiter cet outils et répondre aux objectifs de caractérisation des souches qui nous sont adressées (résistance, virulence, lien de clonalité,...).

8.3 **Contribution à la surveillance épidémiologique**

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

Cf chapitre 8.3.4

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

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

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

8.3.3 La contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Comme indiqué au chapitre 5.2, le CNR est un membre actif du groupe ESGS de l'ESCMID et participe via cette instance à différents travaux thématiques sur la résistance et/ou sur la prise en charge des infections à Staphylocoques. L'étude sur la sensibilité diminuée et la résistance aux glycopeptides et lipoglycopeptides en Europe dans les bactériémies qui devait démarrer en 2020 est reportée à 2021 en raison du COVID.

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

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

Le linézolide fait partie de la famille des oxazolidinones. Ces molécules constituent une option thérapeutique intéressante pour certaines infections à staphylocoques et à entérocoques, y compris les souches multirésistantes. Cependant, plusieurs études ont montré une augmentation de la prévalence des résistances chromosomiques ou plasmidiques à cette famille d'antibiotiques chez les entérocoques et les staphylocoques en Europe. Cette émergence de la résistance est préoccupante en raison de l'omniprésence des staphylocoques à coagulase négative (SCN) dans la flore cutanéomuqueuse et des entérocoques dans la flore digestive. Ces bactéries commensales constituent autant de réservoirs possibles de gènes de résistance aux oxazolidinones potentiellement transférables aux souches pathogènes comme les souches de *Staphylococcus aureus* virulentes et parfois déjà multirésistantes.

Compte tenu de l'augmentation importante des prescriptions de linézolide, le CNR des Staphylocoques et le CNR de la Résistance aux Antibiotiques – Laboratoire associé Entérocoques lanceront courant 2020 une étude afin d'évaluer la prévalence de la résistance des staphylocoques et des entérocoques au linézolide en France. Cette étude se fera par le moyen d'un questionnaire envoyé aux CH et CHU participant au réseau GMC (Groupe de Microbiologie Clinique) pour recueillir la proportion de staphylocoques et d'entérocoques détectés résistants au linézolide dans ces laboratoires entre 2013 et 2019 par rapport à l'ensemble des souches sur lesquelles a été réalisé un antibiogramme.

L'objectif de cette étude préliminaire est de déterminer la prévalence de la résistance et des mécanismes de résistances aux oxazolidinones en France chez les souches de *S. aureus*, de SCN et d'entérocoques. Cette étude préliminaire permettra d'avoir une estimation de la prévalence et de dimensionner une potentielle étude prospective avec recueil de souches pour au final disposer d'une vision épidémiologique globale de la résistance aux oxazolidinones en France chez les staphylocoques et les entérocoques. Ces données permettront d'adapter les mesures de prévention et contrôle de la diffusion des souches résistantes aux oxazolidinones ainsi que la prise en charge des patients colonisés/infectés. Le but est de préserver l'efficacité thérapeutique des oxazolidinones qui doivent pouvoir conserver leur place, dans le futur, dans l'arsenal thérapeutique.

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

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

8.4 Contribution à l'alerte

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

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

1. Expertise

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

2. Conseil

Dans le cadre des missions Biotox :

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

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

1. Secteur virulence et épidémiologie

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

2. Secteur résistance

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

3. Secteur sérologie

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

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

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

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

1.3 Locaux et équipements

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

- le R+5 est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie,
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique),
- le R+2 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24,
- le R+3 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie-Hématologie 24h24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée,

- le R+1 héberge le CNR des staphylocoques, le CNR des Légionelles, l'hygiène environnementale et la Parasitologie-Mycologie non automatisée.



L'étage des CNR de Bactériologie.

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (Figure 23). Les CNR bénéficient par ailleurs de toute l'infrastructure et des différents plateaux de l'IAI, notamment les outils d'identification MALDI-TOF et d'antibiogramme du plateau de microbiologie 24/24 (R+2), les outils de biologie moléculaire et d'analyse bioinformatique du plateau de Biologie Moléculaire (R+4) et toutes les facilités logistiques du bâtiment. Cela inclut notamment l'existence d'un secrétariat centralisé pour l'ensemble de l'IAI assurant une réponse téléphonique 6 jours sur 7 sur un n° unique. En dehors des heures ouvrables et le week-end, ce numéro est basculé sur les n° d'astreinte sur site. Ainsi, un interlocuteur pour le CNR est pratiquement toujours disponible au minimum pour orienter la réponse. Outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie, incluant celles du CNR, le laboratoire a acquis un outil de gestion de base de données spécifique pour les CNR sur une base du logiciel BioNumerics® hébergé sur un serveur sécurisé à la direction de l'informatique des hospices civils de Lyon.



Figure 23. Espaces du R+1 (en jaune) affectés aux CNR de Bactériologie (Staphylocoques et Légionelles)

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve la totalité des échantillons (congélation à -20 °C) qui lui sont adressés qu'il s'agisse de souches cliniques, de souches type ou de référence, de sérums et autres prélèvements cliniques (pus, biopsies...). Il dispose aussi d'une 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 de signature d'un accord de transfert de matériel entre les parties (les HCL et le laboratoire demandeur- Annexe 5).

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

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

1.5 Démarche qualité du laboratoire

1.5.1 L'enjeu de l'accréditation

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

1.5.2 La structure qualité du laboratoire

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

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

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

Cartographie des processus du LBMMS

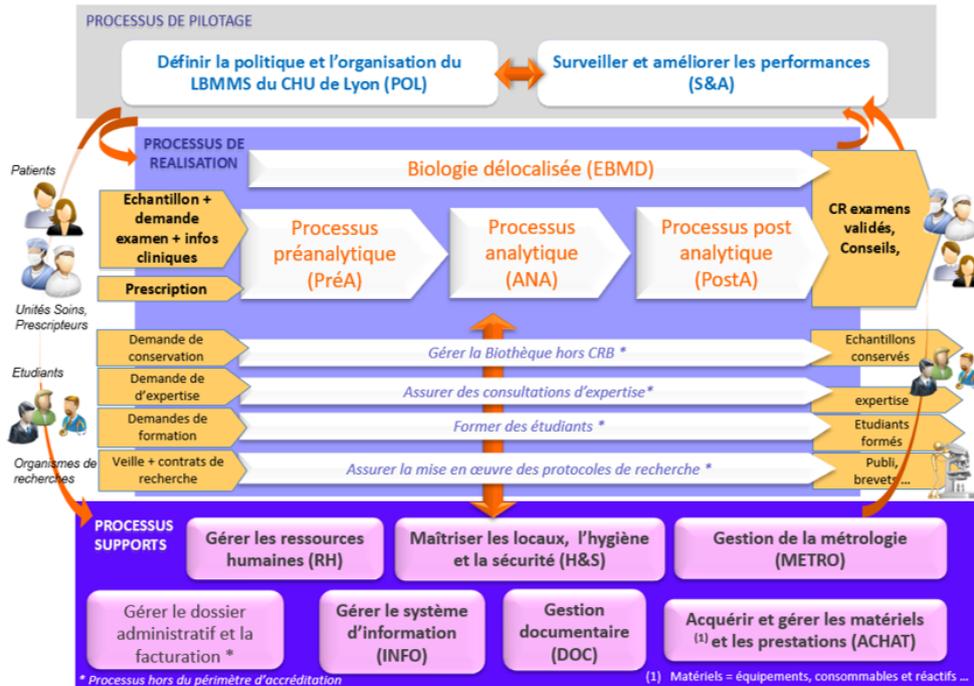


Figure 24- Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001-05)

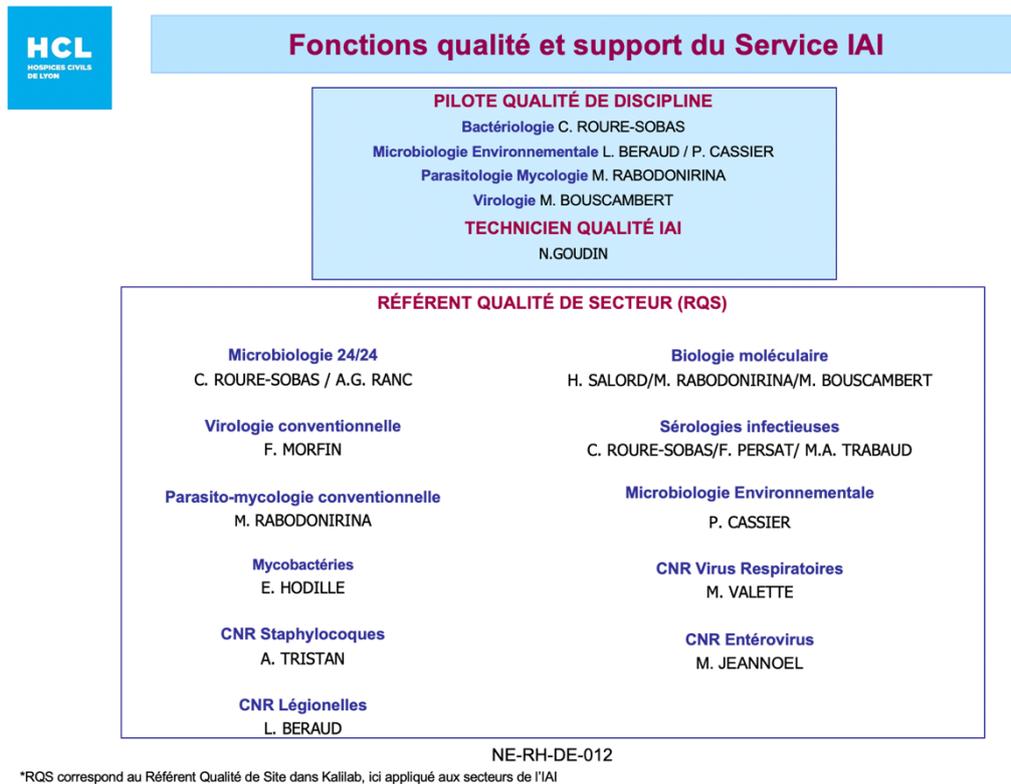


Figure 25- Organigramme qualité de l'IAI

1.5.3 Les audits

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

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

1.5.4 Le logiciel de gestion de la qualité

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

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

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

1.5.5 Avancement de la démarche qualité

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR d'ici 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 a validé son accréditation suite à son déménagement en janvier 2017 sachant que l'audit interne LBMMS effectué en mars 2017 n'a relevé aucun écart et souligné la bonne gestion des risques lors du déménagement.

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

Le dossier de validation de méthode du NGS aurait dû être déposé d'ici fin 2020 mais ne sera déposé qu'au printemps 2021 en raison de la crise sanitaire.

1.5.6 Les contrôles qualité

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

1.5.6.1 CQE Européen de l'ESGS

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

L'objectif de ce CQE est d'évaluer la capacité des laboratoires à effectuer l'identification, la détection de la résistance aux antibiotiques, la détermination du profil toxinique et le typage de 5 ou 6 souches de staphylocoques 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*.

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

Pour la deuxième année consécutive, le CNR français a organisé **le CQE en 2019**. Quatorze laboratoires incluant 11 pays y ont participé : Allemagne (n=2), Angleterre (n =1), Belgique (n=1), Danemark (n=2), Ecosse (n=1), France (n=1), Italie (n=2), Irlande (n=1), Portugal (n=1), République Tchèque (n=1) et Roumanie (n=1).

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

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

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

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

En 2019, nous avons mis en place un contrôle externe avec les laboratoires des HIA de Begin et Toulon qui souhaitaient évaluer ses techniques de détection de la résistance à la méticilline et des gènes codant la leucodidine de Panton Valentine.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Diagnostic/identification

2.1.1.1 *Techniques d'identification*

PCR *agr* (accréditée)

Le système *agr* (accessory gene regulator) est un régulateur global qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Sans être un gène de ménage, ce système n'en est pas moins universel au sein de l'espèce *S. aureus* et le polymorphisme observé, distinguant 4 allèles fortement enracinés dans la phylogénie de l'espèce, a permis de développer une PCR d'espèce qui constitue le test 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 discriminant. L'amplification-séquençage du gène *tuf* s'est substituée aux multiples techniques conventionnelles (tests biochimiques) et moléculaires longues, fastidieuses, et d'interprétation parfois délicate pour l'identification des staphylocoques. Cette technique est maintenant utilisée au CNR pour toutes les identifications non concluantes de souches par la technique du Maldi-Tof (insuffisance de la base de données) ou lors de résultats atypiques ou aberrants obtenus au cours de la caractérisation complète des souches.

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

Depuis 2011, le CNR utilise la technique par spectrométrie de masse MALDI-TOF (VITEK 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*, *condimentii*, *epidermidis*, *haemolyticus*, *hominis*, *hyicus*, *intermedius*, *lugdunensis*, *pettenkoferi*, *pseudintermedius*, *saprophyticus*, *schleiferi*, *sciuri*, *warneri*, et *xylosum*¹⁴.

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

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

¹⁴ 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

cette espèce ; cependant lors de l'alignement de la séquence du gène *tuf* de nos souches de *S. argenteus* dans Genbank, la plus forte homologie est observée avec la séquence correspondant au gène *tuf* de la souche MSHR1132, souche type de *S. argenteus* dont le génome entier a été séquencé. Les puces à ADN reconnaissent également l'espèce *S. schweitzeri*, récemment décrite qui est également proche phylogénétiquement de *S. aureus* et *S. argenteus* mais isolée principalement chez les primates non humains en Afrique. Aucune souche appartenant à cette espèce n'a été reçue au CNR depuis sa description¹⁵.

2.1.1.2 Techniques de caractérisation de la virulence

Recherche globale des entérotoxines A-E directement dans les prélèvements cliniques

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

Puces à ADN (dossier accréditation prêt)

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

Cette technologie 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*, *saerR/S*, *vraR/S*, *sarA*).

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

Cet outil permet aussi d'analyser les gènes de résistance aux antibiotiques (voir ci-après dans le document) et d'assurer un assignement de la souche testée aux clones SASM ou SARM reliés génétiquement (voir ci-après dans le document). Cette technologie devra malheureusement être arrêtée en 2020 en raison de l'interruption de fabrication des réactifs par l'industriel. Le dossier d'accréditation finalisé ne sera donc pas déposé.

PCR toxine simplex (accréditée)

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

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

PCR toxine PVL en urgence sur souche (accréditée)

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

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 (MTSS), chez la femme jeune ne possédant pas d'anticorps neutralisants contre cette toxine, et au choc toxique non menstruel (NMTSS).

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

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

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

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

La sérologie PVL peut présenter un intérêt dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même si la cinétique de séroconversion est encore mal connue. Dans le cas de la sérologie TSST-1, l'absence d'anticorps à la phase aigüe du choc en période menstruelle est en faveur d'un choc toxique staphylococcique ; le suivi sérologique permet d'observer une absence de séroconversion chez la majorité des patientes. Or, la persistance d'un taux négatif à distance de l'épisode de choc est associée à un risque accru de récurrence et conduit donc à conseiller aux femmes concernées de s'abstenir d'utiliser des tampons vaginaux ou des coupes menstruelles.

Une **sérologie alpha-toxine** a également été mise en place : il s'agit d'une sérologie contrôle. L'alpha-toxine est une toxine quasi-constante chez *S. aureus* (codée dans le *core-genome*). Toute la population générale étant exposée à des souches de *S. aureus*, des anticorps anti-alpha-toxine sont présents systématiquement chez tous les patients.

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

2.1.2 Typage (marqueurs épidémiologiques)

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

Identification des groupes *agr* (accréditée)

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

Caractérisation de la Casette SCC*mec*

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

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

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 pénicilline, un outil permettant de caractériser rapidement la nature des cassettes SCC*mec* insérées au sein du gène *orfX* a été implémenté au CNR en 2014. La technique, appelée *dru*-typing (direct repeat units-typing), a pour but d'amplifier une série de séquences répétées de 40 paires de composition variable située à côté de la séquence d'insertion IS431 présente au sein de la cassette SCC*mec*. Le produit d'amplification est ensuite séquencé. La nature (enchaînement de bases) et le nombre des séquences répétées permet de définir une combinaison particulière dénommée *dru*-type et signalée par le préfixe dt, un chiffre différent pour chaque combinaison. Plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir discriminant de cette approche pour différencier les clones de staphylocoques résistant à la pénicilline.

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 pénicilline. Cette technique est surtout utilisée pour le typage de souches de staphylocoques non *aureus*, espèces pour lesquelles les techniques de *spa*-typing, MLST *aureus*, puces à ADN ne sont pas utilisables.

Puces à ADN

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

Ces informations permettent donc un suivi de l'épidémiologie à l'échelle locale, régionale ou nationale et éventuellement une alerte rapide en cas d'apparition de nouveaux clones. Cette technologie devra malheureusement être arrêtée en 2020 en raison de l'interruption de fabrication des réactifs par l'industriel.

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

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

Cette méthode est à présent en phase d'implémentation progressive 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 2.6. du rapport

2.1.4 Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

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

Les gènes *mecA/mecC* sont recherchés par PCR 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

Pour ce qui concerne la détermination de la CMI en milieu liquide selon les recommandation EUCAST/CASFM, le CNR utilise depuis 2017 le test UMIC Vancomycine-Teicoplanine (Biocentric).

A partir de colonies isolées d'une culture bactérienne pure de 24h, un inoculum de 0.5Mcf est réalisé dans du sérum physiologique puis une dilution au 1/100 dans 1:100 dans un bouillon Muller Hinton II. Enfin, 100µl de la suspension diluée sont transférée dans chaque puits pour inoculer la galerie UMIC avant de la recouvrir avec le couvercle de plaque. L'incubation est réalisée à 36°C pendant 18h. La lecture visuelle de la turbidité dans chacune des cupules est reportée sur la feuille de résultats (fourni dans le coffret). Le 1er puits correspond au contrôle de croissance (GC). Du 2^{ème} au 12^{ème} puits, nous disposons d'une concentration croissante d'antibiotiques (de 0.25 à 4 mg/L pour la vancomycine et de 0.25 à 8 mg/L pour la teicoplanine). La CMI correspond à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne (ce qui correspond à la 1ère cupule limpide). Les concentrations critiques en mg/L selon le CASFM 2017 sont :

- *Staphylococcus aureus* : vancomycine et teicoplanine ≥ 2mg /L
- Staphylocoque coagulase négative : vancomycine ≥2mg/L et teicoplanine ≥4mg /L.

En cas de dépistage 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 3). 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 3- 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>	

Comme indiqué plus haut, l'arrêt de commercialisation de ces puces nous a conduit à implémenter la détection de l'ensemble des gènes de résistance connu par séquençage du génome entier

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

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

Détermination des CMI par dilutions en milieu liquide et par dilutions en milieu gélosé (accréditée)

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 techniques recommandées par le CNR

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

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

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

3.1 Permanence du CNR ¹⁶

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

3.2 Autorisations MOT ¹⁷

- *Une personne est-elle autorisée par l'ANSM à effectuer des opérations sur les MOT pour les activités du CNR ? A défaut, une demande d'autorisation a-t-elle été déposée à l'ANSM et à quelle date ?*
- *Si OUI, qui est titulaire ¹⁸ ou demandeur de cette/ces autorisations(s)*

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

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

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

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

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

¹⁶ Ces informations seront conservées exclusivement par Santé publique France aux seules fins de contacter un CNR en cas d'urgence ; elles ne seront pas rendues publiques.

¹⁷ Micro-Organismes et Toxines de la liste prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. La liste des MOT est actuellement fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par les arrêtés du 6 novembre 2014 et par l'arrêté du 2 octobre 2015.

¹⁸ Ne pas indiquer les personnes habilitées mais seulement les personnes titulaires.

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

(A faire en double exemplaire)

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

au Centre National de Référence des Staphylocoques désigné CNR-S.

Le CNRS demande que le Demandeur accepte que :

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

Le Centre National de Référence des Staphylocoques

Nom de la personne autorisée :

En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Staphylocoques,

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

Signature

Le Demandeur :

Nom de la personne :

Organisation :

Adresse :

Signature

Date

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



Manuel qualité

Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de LYON

Hospices Civils de Lyon
Bâtiment A
162 Avenue Lacassagne
69424 LYON Cedex 03

Tel : 04 72 11 51 72
Fax : 04 72 11 51 79



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

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

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

Page 2/38

Sommaire

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

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

Laboratoire de Biologie Médicale Multi sites du CHU de LYON

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

Page 3/38

Version : 01	Date d'application : 01/06/2013
Version : 02	Date d'application : 15/05/2014
Version : 03	Date d'application : 24/06/2015
Version : 04	Date d'application : 01/09/2017
Version : 05	Date d'application : 08/06/2018
Version : 06	Date d'application : 01/11/2019
Motif de révision :	
- Précisions apportées sur les procédures spécifiques pour le SMQ 17025 (biologie environnementale)	
- Mises à jour des documents liés et informations des différents chapitres, particulièrement :	
- Mise à jour de l'organigramme fonctionnel (page 11)	
- Précisions concernant l'organisation des EBMD au LBMMS	
- Ajout de l'Expert Métrologue (nouvelle prestation) au chapitre Métrologie	
- Ajout d'un paragraphe concernant le document unique au chapitre H&S	
- Mise à jour de la Politique Qualité	
Rédaction : PILOTES DE PROCESSUS	
Vérification : Mylène GADOUX et Maud BAUME, RQ LBMMS	
Approbation : Dr Anne MIALON, Biologiste responsable du LBMMS, Chef de Pôle Activité Médicale Biologie et Anatomie et Cytologie Pathologiques et Pr Gérard LINA, Adjoint	

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