

**CNR des Méningocoques et Haemophilus
influenzae**

RAPPORT D'ACTIVITE

Période 2011-2020 (méningocoque)

Période 2017-2020 (*H. influenzae*)

Unité des Infections Bactériennes Invasives

28 rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15

Tel 01 45 68 84 38

Secrétariat 01 40 61 31 08

Télécopie 01 40 61 30 34

Courriel : meningo@pasteur.fr

Site : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante>

Responsable Scientifique : Muhamed-Kheir TAHA

Courriel muhamed-kheir.taha@pasteur.fr

Tel : 01 45 68 84 38

Télécopie 01 45 68 83 38

Responsable Scientifique Adjoint : Ala-Eddine DEGDMANE

Courriel : ala-eddine.deghmane@pasteur.fr

Tel : 01 44 38 95 90

Responsable Administratif :

Isabelle CAILLEAU

Courriel : isabelle.cailleau@pasteur.fr

Tel : 01 40 61 33 90

Plan

RESUME ANALYTIQUE	3
SUMMARY	4
PARTIE 1 NEISSERIA MENINGITIDIS	5
INTRODUCTION	5
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	6
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	6
2.1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2020	6
2.2. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE	6
2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.5.1. <i>Les procédures appliquées au CNR</i>	9
2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE	11
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	12
3.1. SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	12
3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DU MENINGOCOQUE AUX ANTI-INFECTIEUX : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	17
PARTIE 2 HAEMOPHILUS INFLUENZAE	20
INTRODUCTION	20
1^H. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	20
2^H ACTIVITES D'EXPERTISE	21
2 ^H .1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2020	21
2 ^H .2. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	21
2 ^H .3. ACTIVITES D'EXPERTISE	21
2 ^H .4. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE	23
3^H. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	23
3 ^H .1. <i>Caractéristiques des cas d'IH<i>i</i></i>	23
3 ^H .2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE D' <i>H. INFLUENZAE</i> AUX ANTI-INFECTIEUX : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	25
ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	28
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	30

Résumé analytique

Les axes majeurs de la mission du Centre National de Référence des Méningocoques (Nm) et d'*Haemophilus influenzae* (Hi) (CNRMH*i*) impliquent l'expertise microbiologique, la contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec Santé publique France (SpF), les alertes et les expertises auprès des autorités de santé.

En 2020, le CNRMHi a continué à utiliser le séquençage du génome entier en surveillance épidémiologique sur la totalité des souches invasives isolées par culture et envoyées au CNRMHi. Le fait majeur en 2020 a été l'impact de la COVID et les mesures prises pour limiter la pandémie sur les infections invasives à méningocoques (IIM) et à *H. influenzae* (IIHi). Des changements profonds ont été observés au niveau des nombres des cas mais également au niveau des caractéristiques cliniques et bactériologiques des cas. En 2020, le CNRMHi a reçu et a analysé 659 échantillons (souches et prélèvements primaires) correspondant à 128 échantillons primaires (pour PCR et/ou sérologie) et 531 souches.

En 2020, les échantillons reçus au CNRMHi (prélèvements primaires et souches) correspondaient à un total de 202 cas d'IIM (51% de réduction par rapport à 2019) et 132 cas d'infections invasives à *Haemophilus influenzae* (30% de réduction par rapport à 2019). Pour Nm, les sérogroupes B, C, W et Y représentaient respectivement 57,4%, 9,9%, 19,8% et 11,4% de l'ensemble des 202 des cas d'IIM au CNRMHi. Le fait marquant est le dernier rang occupé désormais par les IIMC (en nombre et en proportion) et en particulier chez les nourrissons (un seul cas chez les nourrissons <2 ans, non vacciné). L'impact positif de l'obligation vaccinale sur l'immunité directe chez les nourrissons de <2 ans est confirmé. Les infections invasives à *H. influenzae* sont provoquées en majorité par des souches non-typables (n=71 ; 53,8%) mais cette proportion est en recul par rapport à 2019 (73%). Les souches de sérotype b représentaient 18,2% (n=24) dont 21 (87,5%) cas chez des enfants de <5 ans, parmi lesquels, 16 enfants étaient correctement vaccinés pour leurs âges. L'évolution des infections invasives à Hib n'a pas diminué en 2020 malgré la baisse observée sur l'ensemble des IIHi. La proportion des souches invasives résistantes à l'ampicilline était en baisse en 2020 (19% en 2020 contre 31% en 2019 parmi les souches invasives). La même observation était aussi valable pour la résistance aux céphalosporines de 3ème génération. Le CNR continue d'enrichir la base de données du gène *ftsI* d'*H.influenzae* pour étudier la résistance aux beta-lactamines.

Summary

The main axes of the missions of the National reference Centre for meningococci (Nm) and *Haemophilus influenzae* (Hi) (CNRMHi) involve microbiological expertise, the contribution to epidemiological surveillance in connection with public health France (SpF), alerts and expertise to health authorities. In 2020, the CNRMHi continued the use of whole genome sequencing in epidemiological surveillance on all culture-isolated invasive strains sent to CNRMHi. The most important highlight for 2020 was the impact of the COVID and the implementation of containment measures to limit the pandemic on invasive meningococcal disease (IMD) and invasive *H. influenzae* disease (IHID). Major changes were observed at the level of the number of cases but also at the level of clinical and bacteriological characteristics of cases. In 2020, CNRMHi received and analyzed 659 samples (primary samples and cultured isolates) corresponding to 128 primary samples (for PCR and/or serology) and 531 cultured isolates. In 2020, the samples received at CNRMHi (primary and cultured isolates) corresponded to a total of 202 cases of IMD (51% reduction compared to 2019) and 132 cases of invasive *Haemophilus influenzae* infections (30% reduction compared to 2019). For Nm, serogroups B, C, W, and Y accounted for 57.4%, 9.9%, 19.8%, and 11.4% of all the 202 IMD cases at the CNRMHi. The most relevant aspect is that IMD due serogroup C ranked fourth (and last) in number and proportion in particular among children <2 years of age (only one case in this group in 2020 corresponding to an unvaccinated child). The positive impact of mandatory vaccination on the direct immunity against serogroup C is therefore confirmed. Invasive *H. influenzae* infections are predominantly caused by non-typeable strains (n=71; 53.8%) but in a decreasing proportion compared to 2019 (73%). Serotype b cases represented 18.2% (n=24) among which 21 (87.5%) cases were among children <5 years of age and 16 of these children were correctly vaccinated according to their age. Hib invasive infection did not decrease in 2020 in spite of the global decrease observed for IHID. The proportion of invasive Hi isolates resistant to ampicillin decreased in 2020 (19% in 2020 compared to 31% in 2019). Similar observation was also made for isolates resistant to 3rd generation cephalosporins.

Partie 1 *Neisseria meningitidis*

Introduction

Neisseria meningitidis, ou méningocoque, est une espèce bactérienne étroitement adaptée à l'homme, qui en est le seul réservoir connu et le seul hôte sensible. Elle se présente le plus souvent comme une espèce bactérienne commensale du rhino-oropharynx (portage asymptomatique chez 10% de la population générale). La transmission du méningocoque est aérogène, par les sécrétions rhino-pharyngées, classiquement après une exposition de plus d'une heure et à courte distance (<1 mètre). C'est la distance que peuvent parcourir des gouttelettes de 10 microns avant de s'évaporer ou de tomber. La taille de 10 microns de ces gouttelettes permet une rétention au niveau du rhinopharynx (porte d'entrée du méningocoque). L'acquisition d'un méningocoque conduit le plus souvent à un portage asymptomatique (souches de portage). Rarement, l'acquisition d'une souche est suivie d'une infection invasive sauf s'il s'agit de l'acquisition d'une souche hyper-invasive. La susceptibilité de l'hôte joue également un rôle majeur dans le taux d'attaque d'IIM après acquisition (exemple : les sujets ayant des déficits dans les composants tardifs du complément).

Sur le plan clinique, les IIM sont dominées par les méningites et les méningococcémies (septicémies) qui peuvent se compliquer de *purpura fulminans* et de choc septique mortel. D'autres formes cliniques plus rares sont connues et doivent être recherchées, telles que des arthrites, des péricardites, des endophtalmies ou des pneumonies invasives, confirmées par une bactériémie. Le traitement antibiotique adéquat est efficace lors de la phase précoce de dissémination des bactéries. Une IIM est confirmée biologiquement (par culture et/ou par PCR) par la présence de méningocoques dans des prélèvements qui doivent corroborer les critères de définition des cas d'IIM (isolement ou détection du méningocoque à partir d'un site normalement stérile).

La détermination du sérotype d'un méningocoque isolé chez un patient atteint d'IIM est le complément indispensable de l'identification pour pouvoir instaurer la prophylaxie vaccinale des sujets contacts. Le sérotypage est effectué par agglutination des corps bactériens avec des immun-sérums spécifiques qui sont les anticorps anti-capsulaires des méningocoques. Le Centre national de référence des méningocoques a mis au point une technique de diagnostic direct sur produit pathologique permettant d'établir l'étiologie lorsque la culture a échoué. Cette technique est utilisable par tout laboratoire disposant des compétences et installations pour le diagnostic par PCR. Cette technique permet de détecter la présence de l'ADN du méningocoque et de déterminer les groupes les plus fréquents dans les IIM (A, B, C, Y, W et X). La PCR ne remplace pas la mise en culture qui est indispensable à l'antibiogramme. Toute souche ou tout matériel positif pour le méningocoque (échantillon clinique ou extrait d'ADN) doit être envoyé dans les meilleurs délais au CNR pour typage complet. Le suivi des différents phénotypes et génotypes des souches invasives

est essentiel pour détecter des liens entre différents cas, pour une alerte la plus précoce possible pour le contrôle du risque d'expansion épidémique d'un clone connu ou émergent.

1. Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNR sont mentionnées dans [l'Annexe 1](#).

2. Activités d'expertise

Une grande panoplie de techniques est déjà disponible et utilisée pour le diagnostic/typage du méningocoque. Certaines de ces techniques ont été à l'origine développées au sein de notre laboratoire. Ces techniques sont mentionnées dans [l'Annexe 2](#).

2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2020

Le CNRMHi dispose d'un large portefeuille de techniques diverses permettant une analyse fine de la phylogénie des souches et une exploration de la couverture des souches par les vaccins actuellement disponibles.

La technique de séquençage du génome entier a été utilisée en routine en 2020, comme c'était le cas depuis 2015, pour le typage de l'ensemble des souches invasives reçues au CNR avec une analyse phylogénique dite « gène par gène ». Cependant, le génotypage par MLST (*Multilocus sequence typing*), le séquençage de *porA* et le séquençage de *fetA* ont été maintenus pour répondre à des besoins de typage en urgence ainsi que pour le typage des cas diagnostiqués seulement par PCR. Des marqueurs additionnels (*fhbp* et *penA*) ont été également maintenus pour augmenter le pouvoir résolutif du MLST « classique ».

En plus de la technique phénotypique MATS (Meningococcal Antigen Typing System) qui prédit la couverture des souches du méningocoque B par le vaccin 4CMenB et la technique de l'activité bactéricide du sérum, le CNR a pu développer une nouvelle approche pour mesurer le niveau d'expression du fHbp, composant des vaccins contre le méningocoque B. Cela permet de tester la couverture des souches du séro groupe B par les deux vaccins 4CMenB et le vaccin Bivalent rLP2086. De plus, cette analyse s'est enrichie d'une nouvelle méthode (gMATS pour genetic Meningococcal Antigen Typing System) que le CNRMHi a contribué à développer (Muzzi et. Al., Vaccine 2019, 37, 991-1000). Cette méthode génotypique évalue l'association des séquences des allèles codant pour l'antigène (fHbp et NHBA) et MATS.

2.2. Collections de matériel biologique

Les collections du CNR continuent de s'enrichir ; en 2020. Le CNR disposait d'une collection de souches « *Neisseria* » avec plus de 31792 souches des espèces du genre *Neisseria* (30400) et du genre *Haemophilus* (1370). Le CNR dispose également d'une collection de plus de 5100 liquides cérébrospinaux (LCS) et plus de 2400 sérums.

2.5. Activités d'expertise

En 2020, le CNR a reçu 188 souches du méningocoque (invasives et non invasives) et 125 prélèvements (LCS, sang et autres liquides biologiques) pour identification, typage et test sérologique. Parmi ces souches/prélèvements, l'identification de « *Neisseria meningitidis* » a été confirmée pour 202 cas d'IIM. En plus, 3 cas d'infection invasive ont été identifiés par le CNR comme 1 cas de *Neisseria cinerea*, 1 *Neisseria mucosa* et 1 cas de *Neisseria polysacharea*. Deux de ces souches ont été isolées chez des enfants de 5 ans et moins. Certaines de ces souches ont été identifiées (comme c'était déjà le cas en 2019) comme *Neisseria meningitidis* par les laboratoires hospitaliers (en utilisant la méthode de MALDI-TOF et les bases des données commerciale) d'où la nécessité de correctement identifier le méningocoque.

Tableau 1. Nombres globaux d'échantillons reçus au CNR des méningocoques 2011-2020

Année	N° total d'échantillons	Souches bactériennes isolées*	Prélèvements primaires**	N° cas d'IIM***	Groupes (sérogroupes et génogroupes)						Autres <i>Neisseria</i> (infections invasives)
					A	B	C	Y	W	Autres	
2011	979	525	454	496	1	359	76	43	13	4	
2012	979	520	459	506	0	339	86	32	39	10	
2013	958	540	418	483	0	292	121	49	24	7	
2014	704	390	314	389	0	214	111	40	19	5	
2015	825	505	320	424	0	220	112	56	29	7	
2016	805	505	300	450	0	224	113	61	47	5	
2017	804	519	285	474	0	199	122	75	70	8	
2018	757	533	224	397	0	195	88	55	57	2	
2019	723	494	229	416	0	214	53	52	88	9	10
2020	313	188	122	202	0	116	20	23	40	3	3

* Souches invasives et non invasives

** l'ensemble des prélèvements positifs ou négatifs par PCR

*** cas confirmés par culture et/ou par PCR (certains cas sont confirmés par plusieurs méthodes et/ou dans plusieurs sites d'infection).

L'évolution de la distribution des sérogroupes de souches invasives en 2020 est montrée dans la **Figure 1A**. Le nombre des cas d'IIM est en baisse en 2020 et cela concerne tous les sérogroupes et l'ensemble des tranches d'âge (**Figure 1B**).

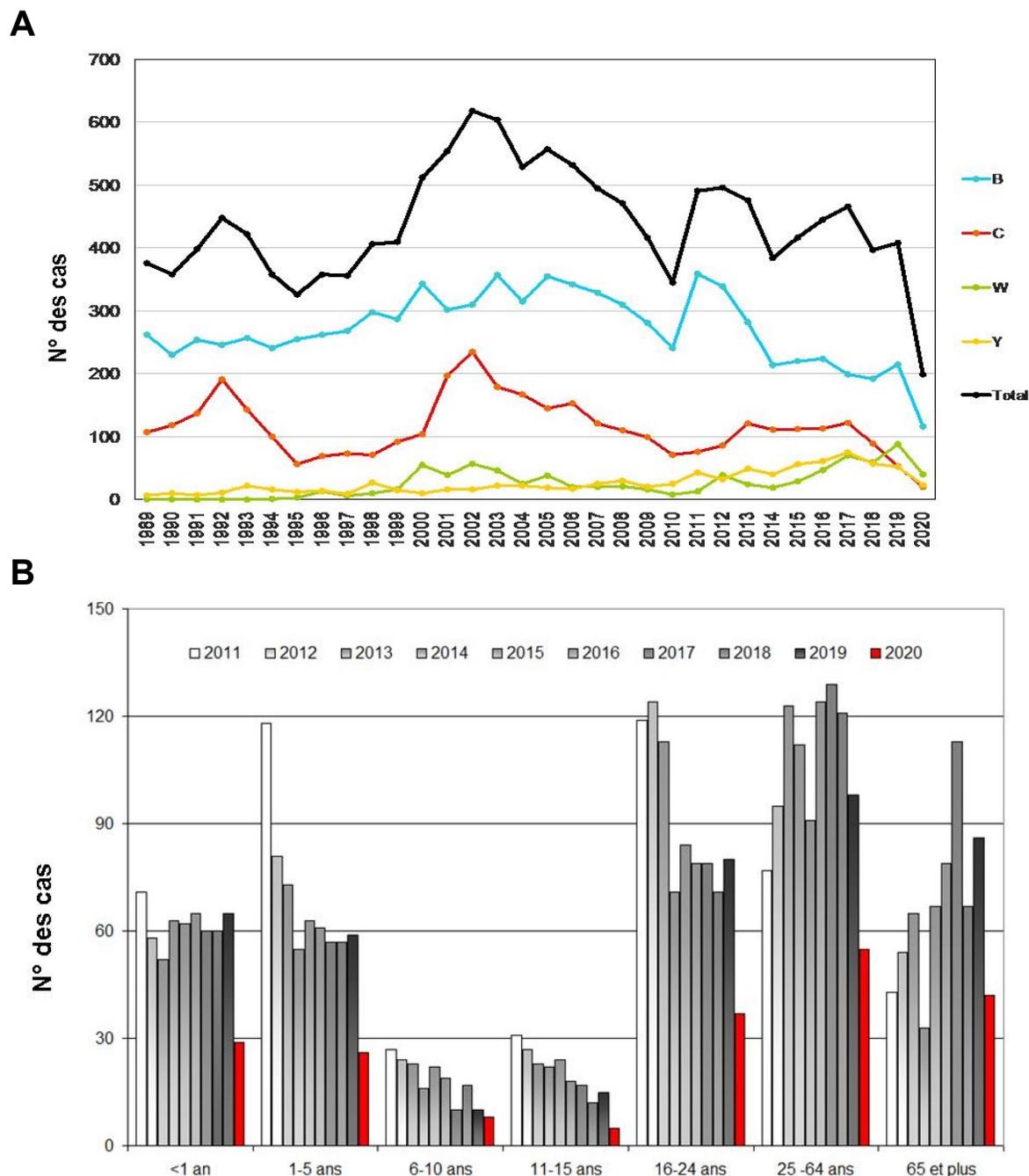


Figure 1 : (A). Évolution de la distribution des sérogroupes des souches de méningocoques responsables d'infections invasives en France (nombre d'isolats cliniques confirmés par culture chaque année et reçus au CNR). (*à partir de 2011 les données correspondent aux cas confirmés par culture et/ou PCR). (B). Évolution de la distribution des cas d'infections invasives en France en fonction de l'âge (nombre d'isolats cliniques confirmés par culture chaque année et reçus au CNR entre 2011-2020).

Le CNR a également reçu 122 échantillons primaires (demande de PCR et de sérologie) dont 98 demandes de PCR du méningocoque pour des cas de suspicion d'IIM. Ces échantillons

ont été testés par PCR pour la détection de l'ADN de *N. meningitidis* et le génogroupage. Le pourcentage de prélèvements reçus au CNR est resté stable sur les 10 dernières années entre 43% et 54% (**Tableau 2**).

La proportion des cas confirmés par PCR seulement était de 13% (26 cas), en recul par rapport à 2019 (19%) mais cela n'était pas significatif. De plus, 6% des cas ont été d'abord détectés par PCR et ensuite confirmés par culture qui reste la méthode la plus fréquente de confirmation des cas (81% par culture seulement et 87% (176 cas) par culture et PCR). Pour 12 cas, la souche bactérienne n'a pas poussé au CNR, mais un typage génétique a pu être réalisé par MLST sur le matériel génétique purifié à partir des boîtes de culture envoyées par nos correspondants. Le CNR a donc récupéré 164 des 176 isolats envoyés. Le CNR continue d'insister auprès des laboratoires hospitaliers pour qu'ils réalisent la culture, car elle permet de disposer de la souche, ce qui facilite le typage phénotypique (antibiogramme et couverture vaccinale) et la réalisation du séquençage du génome entier. En parallèle, le CNR encourage et accompagne ses correspondants dans les centres hospitaliers pour mettre en œuvre la technique de détection par PCR au sein de leurs laboratoires. (**Tableau 2**).

Tableau 2. Infections invasives à méningocoques identifiées par PCR (NG= non génogroupable)

Année	N° négatifs	Génogroupe						Total	n° positifs	% des positifs
		A	B	C	W	Y	NG ou autres			
	négatif									
2006	211	0	59	18	2	1	13	304	93	31%
2007	278	1	114	41	0	4	12	450	172	38%
2008	217	0	100	27	3	3	10	360	143	40%
2009	235	0	127	29	3	2	8	404	169	42%
2010	229	0	165	18	3	5	4	424	195	46%
2011	245	0	165	23	8	8	4	454	209	46%
2012	248	0	151	23	27	7	3	459	211	46%
2013	231	0	114	46	21	3	3	418	187	45%
2014	178	0	90	35	4	6	1	314	136	43%
2015	182	0	94	38	5	2	0	320	138	43%
2016	160	0	96	23	10	9	2	300	140	47%
2017	136	0	81	22	12	18	8	277	141	51%
2018	108	0	65	26	7	17	1	224	116	52%
2019	113	0	74	13	16	5	5	208	95	54%
2020	54	0	29	4	4	5	2	98	44	45%

2.5.1. Les procédures appliquées au CNR

Des approches de phénotypage et génotypage sont réalisées au CNR. Sur les souches reçues, le CNR confirme l'identification et détermine le sérotype. Le CNR réalise en urgence (2h) une détermination du groupe par une approche moléculaire pour les souches invasives qui ne sont pas sérotypées ou lorsqu'un problème est signalé par le laboratoire correspondant.

Le CNR réalise également l'antibiogramme de référence selon les recommandations de l'EMGM (*European Monitoring Group on Meningococci*) pour les antibiotiques utilisés dans le traitement et la chimioprophylaxie. Des études moléculaires complémentaires sont également menées sur les souches résistantes pour identifier les mécanismes moléculaires de cette résistance. La caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques est réalisée par les données de séquence extraites du génome entier (les séquences des gènes *penA*, *rpoB* et *gyrA*).

En accord avec les recommandations de l'EMGM et l'ECDC, le CNR ne réalise plus systématiquement le phénotypage [sérotypage (protéine de membrane externe, PorB) et sous-typage (protéine de membrane externe, PorA) et immunotypage (immunospecificité du lipooligosaccharide, LOS)]. Ces typages sont maintenant extraits à partir des résultats du séquençage du génome entier réalisé sur l'ensemble des souches invasives. Les données génomiques permettent également d'extraire le typage MLST (séquence type et complexe clonal), les séquences des régions variables (VR1, VR2) du *porA* ainsi que la région variable de *fetA*. Les autres marqueurs sont également extraits (les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et les gènes codant pour les antigènes vaccinaux). Les données du génome entier sont disponibles sous 10 à 15 jours. Toute suspicion de cas groupés fait l'objet d'un typage moléculaire urgent par MLST (2 à 4 jours). Ce typage est ensuite complété par le séquençage du génome entier. De plus, le typage par MLST, séquence de *porA* et *fetA* continue d'être réalisé en routine pour les cas diagnostiqués seulement par PCR.

Les données de surveillance nationale sont régulièrement évaluées avec Santé publique France (SpF) à qui la liste des souches invasives est communiquée chaque mois, ou plus fréquemment en cas d'alerte. Ces données sont communiquées sous la forme :

Groupe : région variable VR1 et VR2 de *porA* : région variable de *fetA* : complexe clonal.

Une analyse phylogénique est également réalisée pour différencier les nouveaux variants au sein des complexes clonaux.

Les correspondants qui n'appliquent pas les techniques de diagnostic moléculaire et de génogroupage nous adressent des échantillons pathologiques (sang, LCS et autres fluides biologiques, ainsi que des biopsies de lésions purpuriques) dans lesquels l'ADN de *N. meningitidis* peut être détecté par PCR avec indication du sérotype par amplification des gènes de la capsule (génogroupage).

Une surveillance internationale des souches responsables d'IIM est instaurée en partenariat avec l'EMGM (associant tous les centres de référence européens), l'Organisation Ouest Africaine de la Santé et l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les modalités de recueil des souches et des prélèvements adressés au CNR pour diagnostic et typage moléculaires sont organisées selon des procédures adressées à tous nos correspondants. Les milieux de transport spécifiques pour les souches de *Neisseria* (milieu de Vandekerkove), garantissant la viabilité des cultures bactériennes, sont fournis gratuitement aux

correspondants nationaux du CNR. Des fiches de renseignements sont également fournies ainsi que le dispositif d'étiquetage à l'adresse du CNR. Les fiches de renseignement, pré-identifiées à l'adresse du CNR des méningocoques, comportent les questionnaires concernant les données cliniques, épidémiologiques et bactériologiques, incluant la détermination du sérotype (ce document est téléchargeable à partir du site internet). Compte tenu de l'urgence à instaurer une prophylaxie appropriée à l'entourage de chaque cas d'infection invasive, les expertises concernant le sérotype et la sensibilité aux antibiotiques d'intérêt thérapeutique et prophylactique sont communiquées extemporanément au correspondant par téléphone, télécopie ou par courriel.

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Plusieurs techniques d'exploration de la couverture des souches du méningocoque B par les vaccins protéiques (4CMenB et le vaccin Bivalent rLP2086) en particulier :

- L'activité bactéricide des sérums des sujets vaccinés (en comparant les titres bactéricides avant et après vaccination)
- MATS et test ELISA développé par le CNR pour le fHbp
- gMATS
- MenDeVAR

2.6. Activités de séquençage

L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

Les analyses bio-informatiques sont réalisées par le CNR sur la plateforme BIGsdb hébergée dans le site PUBMLST. Ces analyses utilisent essentiellement un schéma cgMLST en première ligne

mais d'autres schémas sont également utilisés (wgMLST, gènes codants pour les protéines vaccinales). De plus, le CNR participe dans l'évolution de ce site par la gestion des séquences des gènes responsables de la résistance aux antibiotiques chez le méningocoque. Dans les cas d'alerte, le CNR continue à réaliser les analyses par « MLST classique » ce qui permet d'avoir un génotypage en 24 à 48h.

Le CNR utilise le séquençage du génome entier à des fins de santé publique et d'explorations épidémiologiques. Le nombre des souches entièrement séquencées en 2020 était de 160 sur un total de 164 isolats d'IIM disponibles au CNR (98%). Le CNR continue à séquencer ses collections historiques des souches du genre *Neisseria*. A la fin de l'année 2020, le CNR avait séquencé au total 2603 souches du genre *Neisseria* (2525 *N. meningitidis* et 78 souches d'autres espèces du genre *Neisseria*), ces souches ayant été collectées sur la période de 1975 à 2020. Les données fastaq sont stockées sur le serveur du P2M. Les données publiées sont accessibles sous forme fasta/fastaq sur le site PUBMLST et sur le site de (*The European Nucleotide Archive* (ENA)).

3. Activités de surveillance

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

Le nombre total d'IIM en 2020 a baissé de 51% en comparaison à 2019 (202 versus 416 respectivement). Le ratio homme/femme était de 0,9. Parmi les 202 cas confirmés par culture et /ou PCR, la distribution en groupe était : groupe B (n=116 ; 57,4%), groupe C (n=20 ; 9,9%), groupe W (n=40, 19,8%), groupe Y (n=23, 11,4%) et les autres groupes et non groupables (n=3, 1,5%). Le nombre des cas a donc baissé de 51% en comparaison à l'année 2019 et cela concerne l'ensemble des tranches d'âge. (**Figure 1B**). Cette diminution concerne tous les groupes. Les souches NmC dont le nombre de cas était en diminution depuis 2018, est passé de 122 en 2017 à 88 en 2018, à 53 en 2019 et à 20 cas en 2020. Les cas des autres groupes (B, W et Y) qui étaient stables sur les 5 dernières années (B et Y) ou en augmentation (W) ont également baissé. (**Figure 1A et Figure 2**).

Les présentations cliniques des cas sont indiquées dans la (**Figure 3**). La méningite (seule ou associée à d'autres formes) reste la forme la plus fréquente et qui est présente dans 56% (n=114) des 202 cas alors que la septicémie à méningocoque était présente dans 47% (n=95) des cas. Les formes atypiques non-méningées (arthrite, pneumonie invasive ou syndromes abdominaux) étaient présentes dans 25% des cas d'IIM. La distribution de ces formes diffère en fonction des sérogroupes : la méningite et le purpura fulminans sont associés au séro groupe B

alors que la pneumonie et les syndromes abdominaux sont plus fréquemment associés aux sérogroupes Y et W. Il est intéressant de noter que le nombre de certaines formes cliniques (méningites, septicémie et purpura fulminans) a drastiquement baissé pendant le premier semestre de 2020 par rapport à la même période de 2019. Cependant, d'autres formes comme les pneumonies invasives (bactériémiques) ont augmenté sur cette période de 2020 (15 cas versus 7 cas en 2019) en particulier chez les sujets ≥ 65 ans. Une association physiopathologique entre le SARS-CoV-2 et le méningocoque (comme celle entre le virus de grippe A et le méningocoque) reste à étudier. Ces données soulèvent néanmoins le point de la vaccination des sujets ≥ 65 contre les infections bactériennes invasives (comme le méningocoque, pneumocoque et *Haemophilus influenzae*).

La proportion des cas d'IIM chez les < 16 ans est en baisse sur les 10 dernière années (51% en 2011), et elle est de 33% en 2020 (**Figure 2** et **Figure 3**).

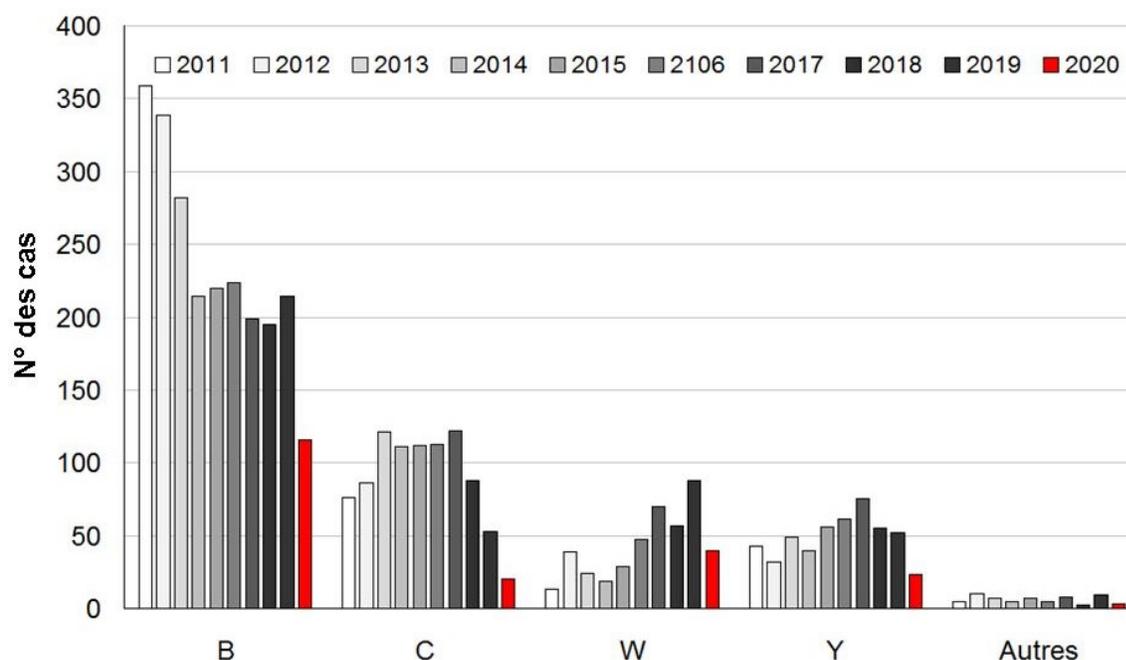


Figure 2. Évolution de la distribution des sérogroupes des méningocoques responsables d'infections invasives en France (nombre des cas confirmés par culture et/ou par PCR reçus au CNR entre 2011-2020).

Les génotypes (Groupe : PorA VR1,VR2 : FetA :cc) ont été extraits des données du génome pour les souches et ont été déterminés par MLST pour les cas diagnostiqués seulement par PCR. Les complexes clonaux ont été obtenus pour 192 cas (95% de l'ensemble des 202 cas reçus au CNR). Ce pourcentage était plus important pour les cas confirmés par culture (99%) que pour les cas confirmés seulement par PCR (69%).

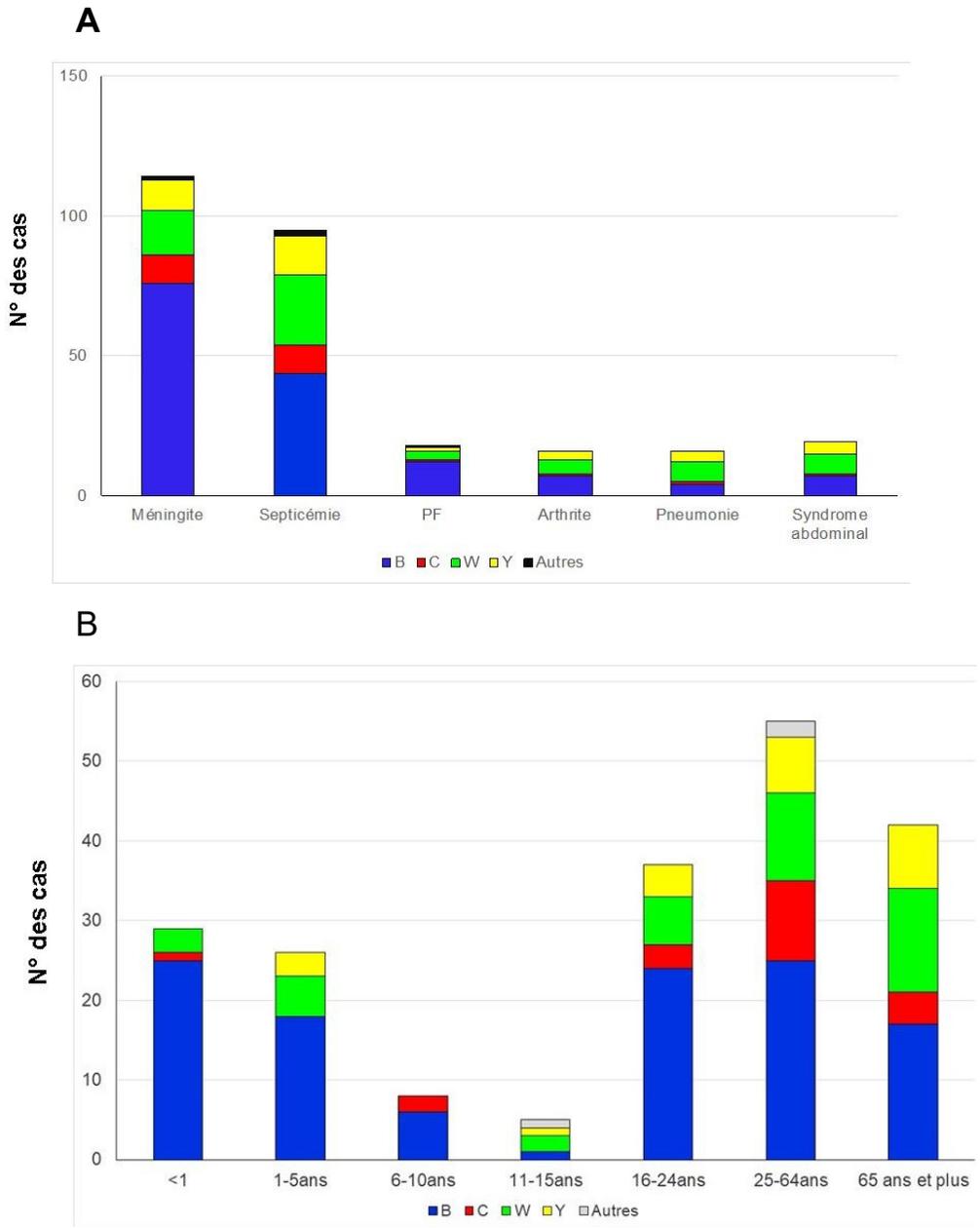


Figure 3. (A) Distribution en nombre de cas des formes cliniques des IIM en 2020 en fonction du sérogroupe **(B)** Distribution en nombre de cas des IIM en 2020 en fonction des sérogroupe et des tranches d'âge.

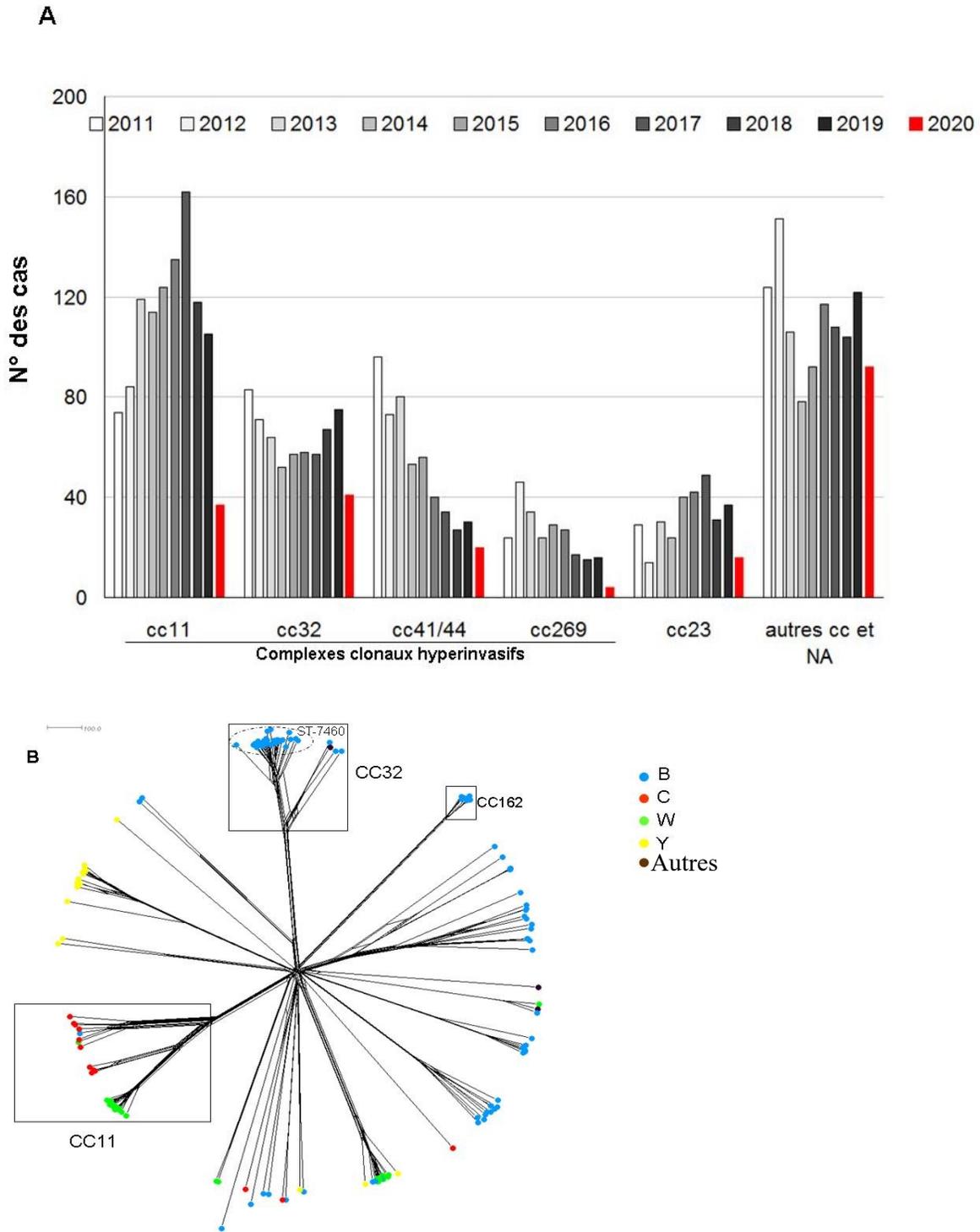


Figure 4. (A) Evolution de la distribution des complexes clonaux majeurs en France entre 2011 et 2020. (B) arbre phylogénétique des souches invasives de l'année 2020 sur la base de 1605 gènes du core génome

La distribution en complexes clonaux (cc) est présentée dans les **Figures 4 et 5**.

Les cc les plus fréquents étaient, par ordre de fréquence décroissante : cc32 (22%), cc11 (20%) cc41/44(11%), cc23 (9%) et cc269 (2%). La proportion des cas dus aux souches appartenant aux cc hyperinvasifs (cc11, cc32, cc41/44 et cc269) continue à reculer de 63% en 2018 à 59% en 2019

et à 53% en 2020. Les cas dus aux souches du cc11 continuent à baisser depuis 2018, ce qui reflète vraisemblablement la réduction des cas d'IIMC (les souches du sérotype C sont en grande majorité du cc11).

L'augmentation des cas dus au sérotype W est sur la base des souches du cc11 mais également sur la base des souches appartenant à un nouveau ST (ST-9316) semblaient continuer en début de l'année 2020. Mais cette tendance s'est arrêtée brusquement à partir de la semaine 11 avec l'instauration du 1^{er} confinement. La réduction des cas en 2020 en comparaison à 2019 semble concerner l'ensemble des sérotypes. Cette réduction concerne en particulier aussi les complexes clonaux hyperinvasifs dont les proportions sont plus réduites que celles des autres cc (Figures 4 et 5).

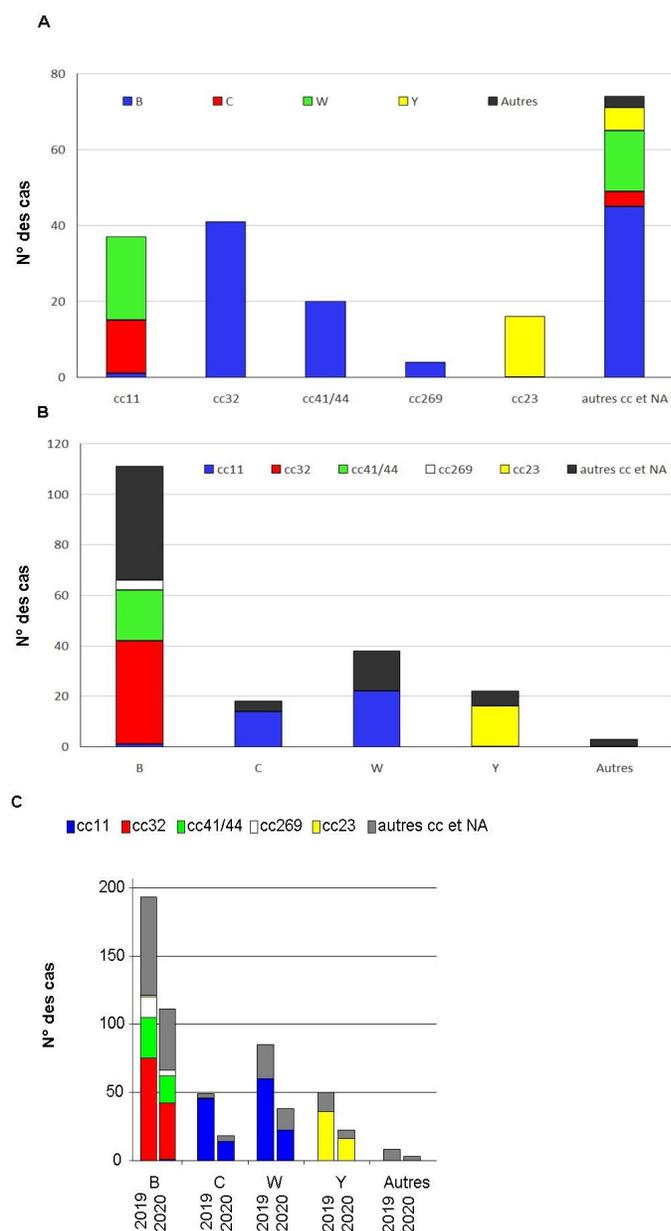


Figure 5. (A) et (B) Distribution des complexes clonaux en fonction des sérotypes des cas d'IIM (souches et/ou PCR) en 2020 avec une comparaison avec 2019 (C). Une comparaison des distributions des cc en fonction des sérotypes entre 2019 et 2020

3.2. Surveillance de la résistance du méningocoque aux anti-infectieux : Sensibilité aux antibiotiques

Le CNR détermine systématiquement les profils de sensibilité des souches de *N. meningitidis* isolées d'infections invasives, à la pénicilline G, aux céphalosporines de troisième génération, à la rifampicine et la ciprofloxacine qui sont actuellement les antibiotiques d'intérêt thérapeutique ou prophylactique, ainsi qu'au chloramphénicol (parfois le seul antibiotique disponible en Afrique) (**Tableau 3**). Toutes les souches sont systématiquement éprouvées par E-test contre les antibiotiques d'intérêt thérapeutique (bêta-lactamines, chloramphénicol) et prophylactique (rifampicine et ciprofloxacine). Des analyses complémentaires par séquençage des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont également réalisées (*penA*, *rpoB* et *gyrA*).

La standardisation des conditions techniques de réalisation de ces déterminations est primordiale car des discordances apparaissent parfois entre laboratoires selon le milieu de culture, la densité de l'inoculum bactérien et les conditions d'incubation. C'est dans le but d'établir et de valider un consensus sur la standardisation de ces paramètres qu'une étude multicentrique a été réalisée au sein de l'EMGM. Elle a conduit à retenir la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E-test, en ensemençant un inoculum standardisé à 0,5 sur l'échelle de Mc Farland sur milieu de Mueller Hinton au sang de mouton (Vazquez *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 2003 ; 47 :3430-4).

Les déterminations des CMI de la pénicilline G montrent que la CMI de 0,125 mg/L, retenue comme valeur-seuil de sensibilité diminuée sur la base des altérations de séquence du gène *penA* codant la protéine de liaison PBP2, est atteinte ou dépassée par 57% des souches en 2020 (48% en 2019, 46% en 2018 et 30% en 2017). Les souches de sensibilité réduite à la pénicilline G étaient également de sensibilité réduite à l'amoxicilline. Ce pourcentage élevé des souches de sensibilité réduite à la pénicilline G est dû aux souches du séro groupe B qui présentent le pourcentage le plus important (78%) en particulier les souches appartenant au ST-7460 du cc32 qui possèdent toutes un allèle modifié du gène *penA* (l'allèle *penA9*). De plus, un pourcentage >50% des souches du cc213 et cc162 (qui se sont maintenus en 2020) sont de sensibilité réduite à la pénicilline G. Nous n'avons pas détecté de souche de *N. meningitidis* positive pour la β -lactamase en 2020.

La distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la pénicilline G est présentée dans la **Figure 6** pour l'année 2020. L'étendue des valeurs des CMI est 0,004-0,75 mg/L. De plus, les valeurs de CMI₅₀ et CMI₉₀ pour l'ensemble des souches est de 0,125 et 0,380 respectivement, très proches des valeurs de 2019 et 2018. Cela suggère que l'augmentation de la proportion des souches ayant une réduction de susceptibilité à la pénicilline n'est pas associée pour l'instant avec l'augmentation de CMI.

Le CNR a déjà décrit l'émergence en France depuis 2013 des souches invasives ayant une

augmentation des CMI aux céphalosporines de troisième génération (C3G). Aucune souche de ce type (hébergeant l'allèle *penA327*) n'a été détectée en 2020.

Toutes les souches étaient sensibles au chloramphénicol et à la rifampicine. Une souche du groupe C était résistante à la ciprofloxacine avec la mutation caractéristique (D95N) dans le gène *gyrA* (Tableau 3).

Tableau 3. Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2019 pour les 324 cas avec au moins une souche isolées par culture.

Antibiotique	Catégorie*	B	C	Y	W	autres	Total
PénicillineG**	S	20	11	15	24	1	71
	I	72	3	5	12	1	93
	R	0	0	0	0	0	0
% des souches penI/R		78%	21%	25%	33%	50%	57%
Céfotaxime	S	92	14	20	36	2	164
	R	0	0	0	0	0	0
Rifampicine	S	92	14	20	36	2	164
	R	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacine†	S	92	13	20	36	2	163
	R	0	1	0	0	0	1†
Chloramphénicol		92	14	20	36	2	164
	I	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0

*S= sensible, I= intermédiaire, R= résistant

**Pen^S, susceptible à la pénicilline G (CMI E-test® < 0,125 mg/L) ; Pen^I, CMI de pénicilline G ≥ 0,125 mg/L et Pen^R ; CMI>1mg/L.

† Une souche (groupe C) résistante à la ciprofloxacine (CMI 0,094 mg/L) avec une mutation (D95N) dans le gène *gyrA*.

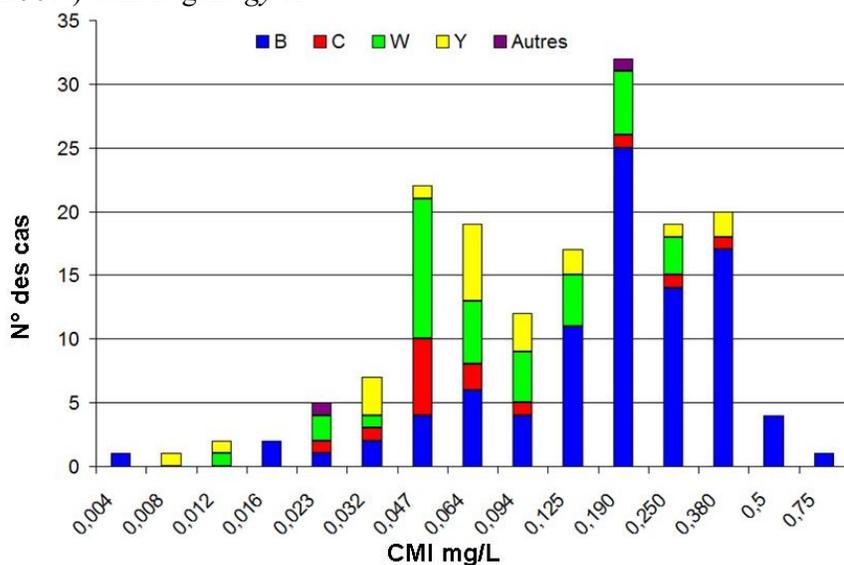


Figure 6 : Distribution des CMI de la pénicilline G parmi les souches invasives de *N. meningitidis* en 2020.

En résumé, Les mesures de distanciation sociale et physique pour lutter contre la pandémie de la COVID-19 ont impacté *N. meningitidis* et les IIM. En effet, la transmission du méningocoque s'effectue essentiellement par voie respiratoire à travers des contacts interhumains directs à moins d'un mètre. L'impact sur les IIM a été rapide et brusque et a touché d'abord les souches hyperinvasives (taux transmission élevé) comme les souches du cc11. Ces mesures ont eu moins d'impact sur des souches moins pathogènes (qui n'appartenaient pas aux cc hyperinvasifs plus réponsives au niveau de portage).

Partie 2 Haemophilus influenzae

Introduction

Haemophilus influenzae (Hi) du genre *Haemophilus*, Famille *Pasteurellaceae*, est une bactérie sous forme de coccobacille à Gram-négatif dont l'homme est le seul hôte naturel connu. Cette bactérie colonise fréquemment les voies respiratoires et s'établit comme constituant de la flore humaine normale. Les espèces du genre *Haemophilus* font partie du groupe HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* et *Kingella*) impliqué dans les endocardites même si l'incidence de cette pathologie à Hi a fortement décliné depuis l'introduction du vaccin anti-*Haemophilus influenzae* du sérotype b. La transmission du Hi est le plus souvent aérogène mais son habitat naturel comme pour les autres espèces du genre *Haemophilus* est la surface des muqueuses. Hi est donc un résident commensal de la muqueuse respiratoire et de la muqueuse génitale. Le portage rhinopharyngé asymptomatique des souches non typables (HiNT) chez les enfants sains de moins de 5 ans est fréquent (25%). Les infections invasives à *H. influenzae* (IIHi) se produisent lorsque la bactérie traverse le rhinopharynx, envahit la circulation sanguine et se propage pour atteindre des sites normalement stériles. Les IIHi peuvent se manifester comme une septicémie, une pneumonie invasive, une épiglottite et une méningite bactérienne aiguë. L'incidence des cas confirmés d'IIHi en Europe était de 0,7 cas par 100.000 en 2016 (0,49 en 2012) avec une incidence qui varie entre 0,0 et 3,6 pour 100,000 en 2016 selon les pays. Cette incidence est en augmentation depuis 2009 (1,1 en 2009 à 1,5 en 2018 ($p < 0,0001$)) (donnée EPIBAC/SPF).

Hi est divisé en deux grandes catégories : souches capsulées et non capsulées. La capsule de nature polysaccharidique, détermine le sérotype et c'est le sérotype b (Hib) qui est le plus pathogène chez l'homme, affectant principalement les nourrissons et les jeunes enfants. Au début des années 1990, le vaccin conjugué contre le sérotype b a été introduit dans la plupart des pays européens, et l'incidence des infections invasives à Hib a considérablement baissé. Les autres sérotypes (a, c, d, e et f) restent rarement associés aux infections invasives et peuvent révéler des co-morbidités sous-jacentes. Les souches non capsulées, également appelées «non typables» (HiNT), causent habituellement des infections non invasives des voies respiratoires supérieures, telles que l'otite moyenne et la sinusite. Cependant, les souches HiNT peuvent être responsables d'infections invasives.

1^H. Missions et organisation du CNR

En 2017 le CNR a été renouvelé comme CNR des Méningocoques avec l'élargissement de son périmètre à *Haemophilus influenzae*. Les missions et l'organisation du CNR sont mentionnées dans [l'Annexe 1](#).

2^H Activités d'expertise

Une grande panoplie de techniques est déjà disponible et utilisée pour le diagnostic/typage de *H. influenzae*. Certaines de ces techniques ont été à l'origine développées au sein de notre laboratoire. Ces techniques sont mentionnées dans [l'Annexe 2](#).

2^H.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2020

Le CNR a utilisé le séquençage du génome entier sur les souches invasives Hi. Le typage MLST est ainsi extrait des données du génome entier. Ce typage est réalisé pour la première fois en France. Les séquences du gène *ftsI* (codant pour la protéine liant la pénicilline PLP3) sont également utilisées pour explorer la résistance aux bêta-lactamines.

De plus, le CNR a mis au point une PCR pour le diagnostic de Hi et le sérotypage sans culture dans les prélèvements primaires (LCS). Cette technique est proposée par le CNR pour accréditation afin de compléter les méthodes de diagnostic par PCR en temps réel accréditées par le CNR. Enfin, le CNR utilise également les dosages des IgG anti-polyribosylribitol phosphate (PRP) composant de la capsule Hib. Ces dosages sont utilisés dans l'exploration d'échecs vaccinaux et dans les études de séroprévalence.

2^H.2. Collections de matériel biologique

En 2020, le CNR a reçu 266 souches et prélèvements primaires. (**Tableau 4**)

Tableau 4 Souches et prélèvements *Haemophilus* depuis 2017

		Total	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	<i>H. parahaemolyticus</i>
2017	Souche	246	235	10	1	0	0
	Prélèvements primaires	2	2	0	0	0	0
2018	Souche	428	399	25	2	0	2
	Prélèvements primaires	8	3	0	0	0	0
2019	Souche	383	357	22	2	2	0
	Prélèvements primaires	7	1	0	0	0	0
2020	Souche	261	246	11	3	0	1
	Prélèvements primaires	6	5	0	0	0	0

2^H.3. Activités d'expertise

En 2020, le CNR a reçu 261 souches bactériennes (invasives et non invasives) et 6 prélèvements (LCS et sinus) pour identification et typage. Le CNR a confirmé ainsi 132 cas d'IIHi dont 4 diagnostiqué seulement par PCR (**Tableau 5**). Trois cas d'infection invasive ont été identifiés comme *H. parainfluenzae* ($n=3$) (bactériémie) et un cas d'*H. Haemolyticus* (bactériémie).

Une baisse de nombre d'IIHi a été également observée (comme pour les IIM) en 2020 en comparaison à 2019 (-30%).

Tableau 5. Nombre de souches et d'échantillons *H. influenzae* reçus au CNR en 2017

Année	Type d'infection	Souches <i>H. influenzae</i>	Prélèvements primaires <i>H.influenzae</i>	N° cas	Sérotypes						
					a	b	c	d	e	f	NT
2017	Invasive	134	2	136	7	10	0	1	5	11	102
	Non Invasive	101	0	101	0	0	0	0	0	1	100
2018	Invasive	174	3	177	6	21	2	0	1	19	128
	Non Invasive	225	0	225	0	0	1	0	0	1	223
2019	Invasive	188	1	189	7	25	0	0	2	17	138
	Non Invasive	169	0	169	0	1	1	0	0	0	167
2020	Invasive	128	4	132	11	24	1	0	2	7	87
	Non Invasive	118	1	119	0	0	0	0	1	0	118

La majorité des souches Hi sont non-typables (66 % des souches invasives et 99% des souches non-invasives). Ces pourcentages sont similaires à ceux de 2019 (73% et 99% respectivement). Une seule souche non-invasive et typable était d'une aspiration bronchique (Hie) chez une femme de 56 ans. Les souches typables étaient des sérotypes a, b, c, e et f mais aucune souche de sérotipe d n'a été détectée en 2020 (comme en 2019). Les souches typables représentaient 34% des souches invasives (proche de 27% en 2019) mais seulement 1% des souches non-invasives ($p < 0,0001$) (**Figure 7**).

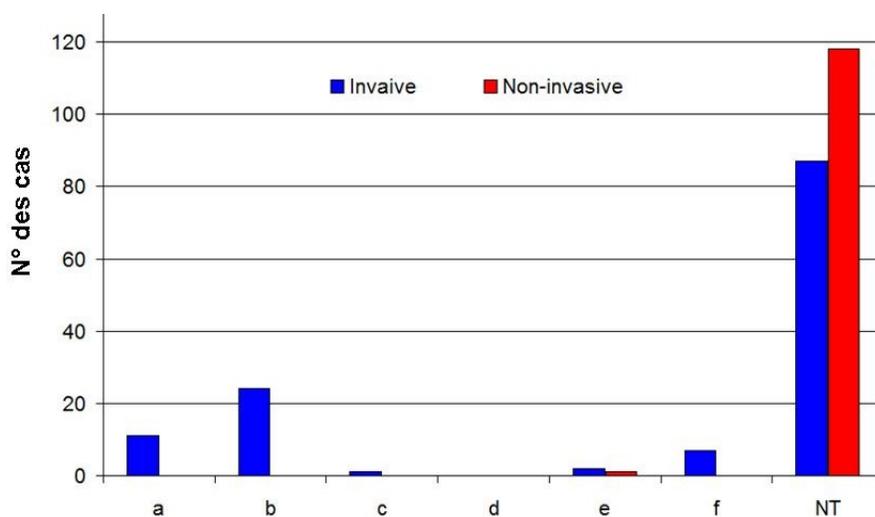


Figure 7. Distribution des sérotypes des souches de Hi responsables d'infections invasives en France (en bleu : nombre d'isolats cliniques confirmés par culture et/ou PCR). Les souches non invasives sont montrées en rouge.

2^H.4. Activités de séquençage

L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production. Les analyses bio-informatiques sont réalisées par le CNR sur la plateforme BIGSdb hébergée dans le site PUBMLST. Ces analyses utilisent essentiellement un schéma wgMLST. Le CNR utilise le séquençage du génome entier à des fins de santé publique et d'explorations épidémiologiques. Le CNR réalise le séquençage sur l'ensemble des souches invasives. Le nombre des souches d'*H. influenzae* entièrement séquencées en 2020 était de 170. Les données fastaq sont stockées sur le serveur sécurisé du P2M. Les données publiées sont accessibles sous forme fasta sur le site PUBMLST ainsi que sur la base des données et sur le site de (*The European Nucleotide Archive* (ENA) pour les souches publiées.

3^H. Activités de surveillance

3^H.1. Caractéristiques des cas d'IHHi

Le ratio homme/femme était de 1,1 parmi les 132 cas d'infection invasive confirmés par culture et /ou PCR (identique à 2019). La distribution des sérotypes de souches invasives en fonction des sites d'isolement est montrée dans le **Tableau 6**.

L'âge moyen et l'âge médian étaient respectivement 32,3 ans et 26 ans.

Tableau 6. Distribution des cas d'infections invasives à Hi en fonction des sites d'isolement et des sérotypes

	Sérotypes							Total	%
	a	b	c	d	e	f	NT		
LCS	6	10	0	0	0	1	25	42	30%
Sang	3	14	1	0	2	6	59	85	64%
Liquide articulaire ou liquide pleural ou autres	2		0	0	0	0	3	5	6%
Total	11	24	1	0	2	7	87	132	
%	8,3 %	18,2 %	0,8 %	0 %	1,5 %	6,8 %	65,9 %		

Les IHI sont en grande majorité provoquées par des souches NT (66%), une proportion en baisse non significative par rapport à 2019 (73%). Le nombre de cas dus à des souches typables est resté très proche entre 2019 et 2020 (51 et 45 respectivement).

Les formes cliniques des cas d'IHI

Les méningites (détection du Hi dans le LCS et /ou dans le sang avec au moins 10 éléments cellulaires dans le LCS) représentaient 48 cas (soit 36% de l'ensemble des cas d'IHI reçus au CNR). Pour 22 de ces 48 cas (46%), l'infection était provoquée par des souches typables, dont 13 (27%) par des souches du sérotype b, qui était le sérotype le plus répandu en France en 2020, comme en 2017, 2018 et 2019 (10 cas Hib en 2017, 21 en 2018 et 25 en 2019 contre 24 en 2020). La distribution des cas en fonction de l'âge est présentée dans la **Figure 8**. Il est à noter que si les cas d'IHI ont globalement diminué en 2020, ce n'était pas le cas pour les cas chez les <1 an qui ont augmenté et en particulier pour les cas d'Hib et Hia. La baisse d'IHI était essentiellement observée chez les adultes de 45 ans et plus.

Les présentations cliniques restaient dominées par la bactériémie, (n=89 ; 67% de l'ensemble d'IHI), isolée ou associée à d'autres formes comme la méningite, les pneumopathies, les arthrites). A noter 4 cas d'épiglottite (3 cas dus au sérotype b et un cas dû au sérotype f). Trois cas pour lesquels les souches ont été isolées dans d'autres sites stériles correspondent à des cas d'arthrite (isolement dans le liquide articulaire) ou de pleurésie (isolement dans le liquide pleural). Il y avait aussi trois cas d'infection fœto-maternelle chez des nouveau-nés déclarée à la naissance (souches NT).

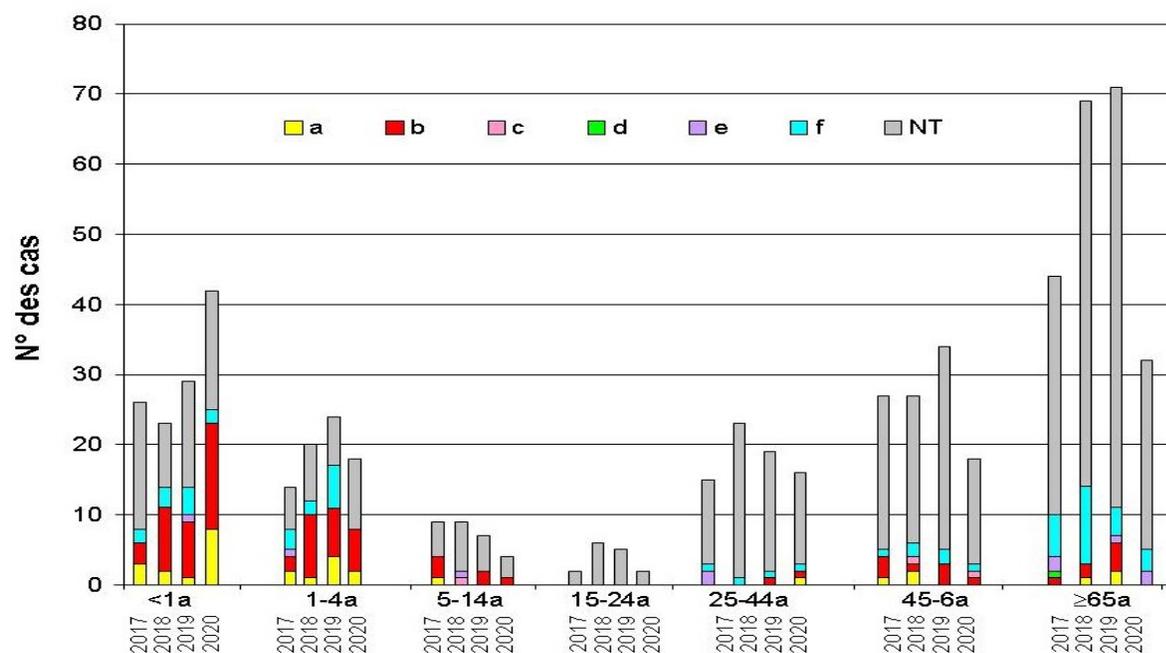


Figure 8. Distribution en fonction de l'âge des sérotypes des souches de Hi responsables d'infections invasives en France 2017-2020.

La baisse en 2020 des IIHi observée en majorité chez les sujets adultes de 45 ans et plus est principalement due à des souches HiNT (n=89 en 2019 versus n=42 en 2020 chez les sujets de 45 ans et plus). En effet, 48% des souches invasives NT sont détectées chez les sujets de 45 ans et plus alors que ce pourcentage était de 62% en 2018). Chez les enfants <5 ans, se sont les souches typables qui dominent avec 55% en 2020 (n=33) et 58% en 2019 (n=31). En 2020, la majorité des souches typables était du sérotype b suivies des souches du sérotype a et puis du sérotype f. Il est important de noter ici que 15 cas d'IIHib ont été diagnostiqués chez les nourrissons de <1 an en 2020 (8 cas en 2019) (soit 36% des cas d'IIHi chez les <1 an en 2020) (**Figure 8**).

3^H.2. Surveillance de la résistance d'*H. influenzae* aux anti-infectieux : Sensibilité aux antibiotiques

Un antibiogramme standardisé est réalisé pour l'ensemble des souches reçues au CNR (invasives et non-invasives) sur milieu MHF selon les recommandations de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). Les valeurs critiques sont également celles recommandées par l'EUCAST.

Les antibiotiques testés sont: l'ampicilline, l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, cefotaxime, ceftriaxone (pour les souches cefotaxime R) et la recherche de la bêta-lactamase, la ciprofloxacine et la rifampicine.

Une bêta-lactamase a été détectée dans 43 souches (18% versus 23% en 2019) de l'ensemble des 241 souches invasives et non-invasives caractérisées au CNR par antibiogramme. Ce pourcentage est donc en baisse non-significative en comparaison aux années précédentes. Cependant, cette baisse est plus importante si seulement les souches invasives sont considérées. En 2020, la proportion était plus élevée parmi les souches invasives que parmi les souches non invasives (25% et 12%, respectivement), mais cette différence n'est pas significative. Cette bêta-lactamase, le plus souvent de type ROB-1, confère la résistance à l'ampicilline et à l'amoxicilline et est inhibée par l'acide clavulanique.

Un autre mécanisme de résistance aux bêta-lactamines est l'altération du gène *ftsI* codant pour la PLP3. Le CNR a documenté les mutations dans ce gène qui confèrent la résistance aux bêta-lactamines y compris les céphalosporines de troisième génération. Le **Tableau 7** est une synthèse des phénotypes observés parmi les souches caractérisées au CNR en 2020.

Tableau 7. Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2020.

maladie/phénotype	a	b	c	d	e	f	NT	Total	% de résistance	p
Ampicilline										
Souches invasives sensibles S	10	19	1	0	2	7	65	104		
Souches invasives résistantes R	0	5	0	0	0	0	19	24		
Total	10	24	1	0	2	7	84	128	19%	
Souches non-invasives sensibles S	0	0	0	0	0	0	36	36		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	1	0	76	77		
Total	0	0	0	0	1	0	112	113	68%	<0,0001
Amoxicilline										
Souches invasives sensibles S	10	19	1	0	2	7	65	104		
Souches invasives résistantes R	0	5	0	0	0	0	19	24		
Total	10	24	1	0	2	7	84	128	19%	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	35	35		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	1	0	77	78		
Total	0	0	0	0	1	0	112	113	69%	<0,0001
Amoxicilline/acide clavulanique										
Souches invasives sensibles S	10	23	1	0	2	7	72	116		
Souches invasives résistantes R	0	1	0	0	0	0	11	12		
Total	10	24	1	0	2	7	84	128	9%	
Souches non-invasives sensibles S	0	0	0	0	1	0	48	49		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	64	64		
Total	0	1	0	0	1	0	163	113	57%	<0,0001
Cefotaxime										
Souches invasives sensibles S	10	23	1	0	2	7	79	122		
Souches invasives résistantes R	0	1	0	0	0	0	5	6		
Total	6	22	0	0	2	17	84	128	5%	
Souches non-invasives sensibles S	0	0	0	0	1	0	63	64		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	49	49		
Total	0	0	1	0	1	0	112	113	43%	<0,0001
Rifampicine										
Souches invasives sensibles S	10	24	1	0	2	7	84	128		
Souches invasive résistantes R	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total	6	23	0	0	0	17	84	128	0%	
Souches non-invasives sensibles S	0	0	0	0	1	0	111	112		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	1	1		
Total	0	0	0	0	1	0	112	113	1%	
Ciprofloxacine										
Souches invasives sensibles S	10	24	1	0	2	7	83	127		
Souches invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	1	1		
Total	10	24	1	0	2	7	84	128	1%	
Souches non-invasives sensibles S	0	0	0	0	1	0	105	106		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	7	7		
Total	0	0	0	0	1	0	112	113	6%	0,022

Ampicilline R>1mg/L ; Amoxicilline et Amoxicilline/acide clavulanique R> 2mg/L ; Cefotaxime R>0,125 mg/L ; Rifampicine R>1mg/L et Ciprofloxacine R>0,06mg/L.

Les souches résistantes à l'amoxicilline et à l'ampicilline (tout mécanisme confondu) représentent toujours une proportion importante même au sein des souches invasives mais leur proportion était en baisse en 2020 en comparaison à 2019 (de 30% à 19%). Cela est également le cas si l'analyse concerne les souches isolées chez les enfants de <16 ans. Cette proportion est significativement plus importante parmi les souches non invasives. Ces résultats soulignent la nécessité de maintenir une surveillance active de ces souches car cela pourrait remettre en question le traitement par amoxicilline en première intention des infections de la sphère ORL chez l'enfant. Une stratégie alternative pour le traitement de ces infections non-invasives serait de proposer le triméthoprime/sulfaméthoxazole (TMP/SMX). Le CNR a testé l'ensemble des souches reçues en 2020 pour le TMP/SMX. En effet, la proportion des souches résistantes au (TMP/SMX) était de 12% pour les souches invasives et de 27% pour les souches non-invasives et donc ces proportions sont moins importantes que celles de la résistance à l'amoxicilline ou à l'ampicilline (**Tableau 7**). Les données obtenues indiquent que la proportion des souches sensibles au TMP/SMX parmi les souches résistantes à l'amoxicilline était de 79% parmi les souches invasives et de 74% parmi les souches non-invasives (**Figure 9**). Ces proportions sont plus élevées que celle de 2019 (75% et 64% respectivement).

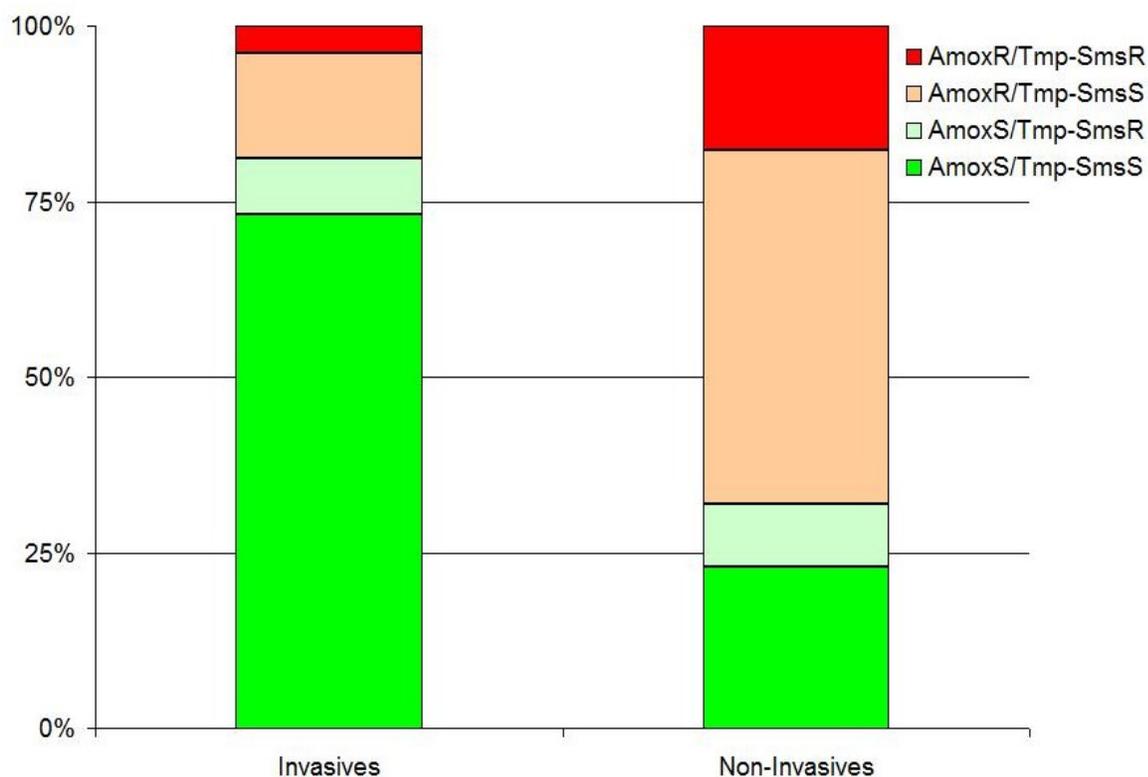


Figure 9. Distribution (en pourcentage) des souches invasives et non-invasives en fonction de leur susceptibilité/résistance à l'amoxicilline et au TMP/SMX

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Contexte épidémiologique global et enjeux de santé publique

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en termes de santé publique,

Le CNR des méningocoques a été reconduit en 2017, avec Muhamed-Kheir TAHA qui en est le responsable et Ala-Eddine DEGHMANE qui est le responsable adjoint, et son périmètre élargi à l'expertise et la surveillance de *Haemophilus influenzae*. Les techniques permettant la surveillance des infections méningococciques potentiellement épidémiques évoluent sans cesse et le travail réalisé au CNR reprend, dans ce but, les différents thèmes énoncés dans la liste du cahier des charges de l'appel d'offre de juin 2016 (définie par l'arrêté du 7 mars 2017) :

Cahier des charges spécifiques du CNR *Méningocoques et Haemophilus influenzae*

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

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

1. Expertise

- en mettant au point ou en évaluant des techniques de confirmation du diagnostic et d'identification des agents pathogènes en particulier lorsque la culture n'est pas possible ou a échoué (exemple des méningites décapitées par l'antibiothérapie) ;
- en caractérisant en routine par des techniques phénotypiques les souches de *Neisseria meningitidis* (sérogroupes, sensibilité aux antibiotiques...) et les souches invasives d'*Haemophilus influenzae* (sérotypes, sensibilité aux antibiotiques...);
- en caractérisant par des techniques génotypiques :
 - les souches de *Neisseria meningitidis* permettant la comparaison fine des souches au niveau national et international ;
 - les souches invasives d'*Haemophilus influenzae* (gène d'encapsulation et génotypes) ;
- en réalisant et en développant des approches moléculaires additionnelles, y compris le séquençage des génomes entiers, pour identifier l'émergence de nouveaux variants ;
- en investiguant sur le plan immunologique les échecs vaccinaux contre les *Neisseria meningitidis* de séro-groupe vaccinal (tous âges) et d'*Haemophilus influenzae* b (enfants 0-15 ans) ;
- en évaluant la couverture de souches de *Neisseria meningitidis* par les vaccins méningococciques B par différentes techniques ;
- en collaborant, avec le CNR Résistance aux antibiotiques à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance ;
- en contribuant au contrôle de qualité des techniques moléculaires utilisées par les laboratoires hospitaliers dans le cadre du diagnostic des infections invasives ;
- en diffusant les techniques de diagnostic biologique aux laboratoires de biologie médicale qui en font la demande ;
- en maintenant et complétant la collection de souches existantes.

2. Conseil

- en contribuant aux réunions d'expertise à l'occasion de situations d'alerte avec les ARS, la DGS et l'agence nationale de santé publique ;
- en participant à la définition des politiques vaccinales et à l'évaluation de leur impact ;
- en contribuant à l'évaluation de l'adéquation des nouveaux vaccins avec les souches circulant en France ou impliquées dans des phénomènes épidémiques locaux ;
- en assurant une activité de conseil auprès des professionnels de santé, cliniciens et biologistes.

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

- en animant un réseau de laboratoires hospitaliers permettant de recueillir :
 - de manière exhaustive les souches et PCR positives de *Neisseria meningitidis* tous âges et d'*Haemophilus influenzae* pour les enfants de 0 à 15 ans ;
 - un échantillon représentatif des souches de toutes les infections invasives à *Haemophilus influenzae* de l'adulte ;
 - les souches d'*Haemophilus influenzae* issues de présentation atypiques telles que lors d'infections materno-fœtales ;

- en transmettant, selon une périodicité à définir en fonction de l'agent, à l'agence nationale de santé publique, les résultats des analyses phénotypiques et génotypiques réalisées sur les souches invasives de *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* ;
- en participant à l'évaluation de la vaccination *Haemophilus influenzae* b en France par :
 - le recueil du statut vaccinal des enfants de 0-15 ans atteints de méningites et autres infections invasives dues à *Haemophilus influenzae* de type b ;
 - l'identification des échecs vaccinaux chez les enfants de 0-15 ans ;
 - la détection de l'émergence d'infections invasives dues à d'autres sérotypes que le sérotype b.
- en décrivant l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques des souches invasives au niveau national pour les antibiotiques à visée curative et préventive, et en fournissant des données sur la sensibilité des souches non invasives d'*Haemophilus influenzae*, en particulier chez les enfants de 0-15 ans ;
- en participant à la surveillance épidémiologique et microbiologique européenne et internationale des infections invasives à *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique les cas groupés liés à une souche commune et tout phénomène inhabituel (augmentation du nombre de cas, souche émergente, ...)

Nous enrichissons nos missions telles que décrites dans le cahier des charges pour notre CNR, par des innovations, en réalisant des recherches expérimentales visant à élucider les déterminants moléculaires qui caractérisent les infections invasives à méningocoques et *H. influenzae* dans le but de trouver de nouveaux marqueurs de virulence et d'identifier de nouveaux vaccins rationnels contre les nouveaux variants génotypiques pathogènes. Nous avons entrepris de qualifier ces souches, non seulement sur la base des données épidémiologiques et cliniques, mais également sur des critères expérimentaux mesurant la virulence et les propriétés pro-apoptotiques, pour mieux préciser les critères d'«hyperinvasivité». Ce type d'étude illustre bien, de notre point de vue, toute la richesse de l'intrication entre la surveillance épidémiologique, les typages moléculaires et l'approche expérimentale fondamentale, dans les activités de CNR. La recherche est indispensable à l'activité de référence.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Techniques	Type	Cadre et délais après réception de la souche/prélèvement
Identification bactériologique	Identification	1-3 j selon la qualité du matériel reçu
Sérogroupage pour l'ensemble des 12 sérogroupe	typage phénotypique	1-2j. 2h par génogroupage si la souche n'est pas sérogroupee par le laboratoire expéditeur et en situation d'alerte.
Séro et sous-typages (<i>N. meningitidis</i>)	typage phénotypique	Pas d'utilisation en routine mais une utilisation ciblée.
Amplification génique (PCR) (pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)*	diagnostic sans culture en première intention	1 à 2 j, selon l'échantillon
MALDI-TOF (pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)	Typage phénotypique	1-3 j selon la qualité du matériel reçu
Multilocus sequence typing MLST ((pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)	typage moléculaire	MLST systématique pour tous les cas d'IIM. Envoi mensuel à SPF. 1-2 jours en cas d'alerte
typage PFGE	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés
Séquence d'autres marqueurs génétiques : <i>penA</i> , <i>fhbp</i> , <i>porB</i>	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés
Antibiogramme et CMI de référence	typage phénotypique	2-3 j. si culture pure
Analyse moléculaire de mécanisme de résistance : séquences de <i>penA</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i> et <i>parE</i> . <i>ftsI</i>	typage moléculaire	Selon études épidémiologiques/cas groupés. 1-2 jours en cas d'alerte
Tests bactéricide et ELISA (pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)	exploration immunologique	Cas d'échec vaccinal, étude d'immunogénicité
MATS (uniquement pour <i>N. meningitidis</i>)	Typage phénotypique et moléculaire	Exploration de la couverture des souches par le vaccin Bexsero®
Séquençage du génome entier ((pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)	typage moléculaire	Exploration approfondie des relations phylogéniques, de l'évolution des souches et de la couverture vaccinale

* Technique accréditée pour *N. meningitidis* et pour *H. influenzae*

2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR

Techniques	Type	Kit commercial disponible
Identification bactériologique	Identification	Api-NH
Sérogroupe pour les sérogroupe A , B, C, Y/W sur souches isolée par culture	typage phénotypique	Pastorex (Kit évalué par le CNR) Technique évalué par la CNR
Amplification génique (PCR) (pour <i>N. meningitidis</i>)	diagnostic sans culture en première intention	Diagenode ((Kit évalué par le CNR) Technique évalué par la CNR
MALDI-TOF (pour <i>N. meningitidis</i> et <i>H. influenzae</i>)	Typage phénotypique	Base des données Brucker Technique évalué par la CNR