



## CNR des Méningocoques et *Haemophilus influenzae*

### **RAPPORT D'ACTIVITE**

Période 2011-2019 (méningocoque)

Période 2017-2019 (*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](mailto:meningo@pasteur.fr)

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

Responsable Scientifique : Muhamed-Kheir TAHA

Courriel [muhamed-kheir.taha@pasteur.fr](mailto:muhamed-kheir.taha@pasteur.fr)

Tel : 01 45 68 84 38

Télécopie 01 45 68 83 38

Responsable Scientifique Adjoint : Ala-Eddine DEGHMANE

Courriel : [ala-eddine.deghmane@pasteur.fr](mailto:ala-eddine.deghmane@pasteur.fr)

Tel : 01 44 38 95 90

Responsable Administratif :

Isabelle CAILLEAU

Courriel : [isabelle.cailleau@pasteur.fr](mailto:isabelle.cailleau@pasteur.fr)

Tel : 01 40 61 33 90

# Plan

<b>RESUME ANALYTIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>PARTIE 1 NEISSERIA MENINGITIDIS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ACTIVITES D'EXPERTISE.....</b>	<b>6</b>
2.1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2019.....	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.....	10
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>11</b>
3.1. SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES IIM .....	11
3.1.1. <i>Caractéristiques des cas d'IIM</i> .....	11
3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DU MENINGOCOQUE AUX ANTI-INFECTIEUX : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	15
<b>PARTIE 2 HAEMOPHILUS INFLUENZAE .....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>18</b>
<b>1<sup>H</sup>. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>18</b>
<b>2<sup>H</sup> ACTIVITES D'EXPERTISE.....</b>	<b>19</b>
2 <sup>H</sup> .1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2018 .....	19
2 <sup>H</sup> .2. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	19
2 <sup>H</sup> .3. ACTIVITES D'EXPERTISE .....	19
2 <sup>H</sup> .4. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	21
<b>3<sup>H</sup>. ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>	<b>21</b>
3 <sup>H</sup> .1. SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	21
3 <sup>H</sup> .1.1. <i>Caractéristiques des cas d'IIHi</i> .....	21
3 <sup>H</sup> .2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE D' <i>H. INFLUENZAE</i> AUX ANTI-INFECTIEUX : SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES .....	23
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR .....</b>	<b>27</b>
4.2. ANALYSE DE L'ÉMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX CEPHALOSPORINES DE TROISIEME GENERATION CHEZ <i>H. INFLUENZAE</i> .....	27
4.3. ÉMERGENCE D'UNE NOUVELLE LIGNEE GENETIQUE (ST-9316) DU MENINGOCOQUE DU SEROGROUPE W EN REGION HAUTS DE FRANCE.....	28
4.4 LES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES EN 2019 EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR .....	29
<b>ANNEXE 1 : MISSIONS &amp; ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>31</b>
<b>ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>33</b>

## Résumé analytique

Les axes majeurs de la mission du Centre National de Référence des Méningocoques (Nm) et d'*Haemophilus influenzae* (Hi) (CNRMHi) 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 2019, le CNRMHi a continué l'utilisation du séquençage du génome entier en surveillance épidémiologique sur la totalité des souches invasives isolées par culture et envoyées au CNRMHi (depuis 2013 pour Nm et 2017 pour Hi). En 2019, le CNRMHi a reçu et a analysé 1126 échantillons (souches et prélèvements primaires) correspondant à 229 échantillons primaires (pour PCR et/ou sérologie) et 897 souches.

Les infections invasives à méningocoque (IIM) sont à déclaration obligatoire. Leur surveillance est un enjeu de santé publique à cause de leur potentiel d'expansion épidémique. En 2019, les échantillons reçus au CNRMHi (prélèvements primaires et souches) correspondaient à un total de 416 cas d'IIM (5% d'augmentation par rapport à 2018) et 189 cas d'infections invasives à *Haemophilus influenzae* (7% d'augmentation par rapport à 2018). Pour Nm, les sérogroupes B, C, W et Y représentaient respectivement 51%, 13%, 13% et 21% de l'ensemble des 416 des cas d'IIM au CNRMHi. Le fait marquant par rapport à 2018 est la baisse importante des IIMC (en nombre et en proportion) et en particulier chez les nourrissons (un seul cas chez les nourrissons <1 an, non vacciné) et l'augmentation des IIMB et des IIMW (en nombre et en proportion). Les infections invasives à *H. influenzae* sont provoquées en majorité par des souches non-typables (n=138 ; 73%). Les souches de sérotype b représentaient 13% (n=25) dont 17 cas chez des enfants de 5 ans ou moins, parmi lesquels, 10 enfants étaient correctement vaccinés pour leur âge. Un aspect important de la surveillance des infections invasives à *H. influenzae* est la progression importante de la proportion des souches résistantes à l'ampicilline (31% en 2019 contre 17% en 2018 parmi les souches invasives) et l'émergence des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. A cette occasion, le CNR continue d'enrichir la base de données du gène *ftsI* d'*H. influenzae* pour étudier ces résistances. Le CNR continue à jouer un rôle important au sein du groupe européen EMGM (European Meningococcal and *Haemophilus* Disease Society) en liaison avec l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Le responsable du CNRMHi a été élu président de l'EMGM en 2019. De plus, l'unité des Infections Bactériennes Invasives (IBI) à l'Institut Pasteur héberge le centre collaborateur OMS pour les méningites bactériennes.

Le CNRMHi a disposé en 2019 de l'expertise et des plateformes nécessaires pour mener une activité de typage, de surveillance et d'aide aux autorités sanitaires.

## 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 2019, the CNRMHi continued the use of whole genome sequencing in epidemiological surveillance on all culture-isolated invasive strains sent to CNRMHi. In 2019, CNRMHi received and analyzed 1126 samples (primary samples and cultured isolates) corresponding to 229 primary samples (for PCR and/or serology) and 897 cultured isolates. Invasive meningococcal infections (IMI) are notifiable in France. Their surveillance is a public health issue because of their potential epidemic expansion. In 2019, the samples received at CNR (primary and cultured isolates) corresponded to a total of 416 cases of IMI (5% increase compared to 2018) and 189 cases of invasive *Haemophilus influenzae* infections (7% increase compared to 2018). For Nm, Serogroups B, C, W, and Y accounted for 51%, 13%, 13%, and 21% of all the 416 IMI cases at the CNRMHi. The highlight in 2019 compared to 2018 is the significant drop (in number and proportion) of IMI due to serogroup C, particularly in infants (only one case in infants <1 year-old in an unvaccinated infant). The IMI due to serogroups B and W increased in 2019 (in number and proportion). Invasive *H. influenzae* infections are predominantly caused by non-typeable strains (n=138; 73%). Serotype b cases represented 13% (n=25) among which 17 cases were among children of 5 years old or younger. Ten of these children were correctly vaccinated according to their age. An important aspect of surveillance of invasive *H. influenzae* infections is the important increase of proportion of strains resistant to ampicillin (31% in 2019 versus 17% in 2018 among the invasive strains) and the emergence of strains resistant to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins. On that occasion, the NRC continues to enrich the *ftsI* gene database of *H. influenzae* to study these resistances. The CNRMHi continues to play an important role within the European Meningococcal and *Haemophilus* disease Society (EMGM) in close link with the ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). In 2019, the responsible of the CNRMHi was elected as the president of the EMGM. In addition, the invasive bacterial Infections (IBI) unit at the Pasteur Institute also hosts the WHO Collaborating Centre for bacterial meningitis. In 2019, the CNRMHi had the expertise and the necessary platforms to conduct typing, monitoring and support activities for health authorities.

## 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 2019**

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 2019, 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 2019. Le CNR disposait d'une collection de souches « *Neisseria* » avec plus de 31280 souches des espèces du genre *Neisseria* et du genre *Haemophilus*. Le CNR dispose également d'une collection de plus de 5000 liquides cérébrospinaux (LCS) et plus de 2400 sérums.

## 2.5. Activités d'expertise

En 2019, le CNR a reçu 494 souches du méningocoque (invasives et non invasives) et 229 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 416 cas d'IIM. En plus, 10 cas d'infection invasive ont été identifiés par le CNR comme *Neisseria polysaccharea*, 2 cas de *Neisseria cinerea* et 2 *Neisseria bergeri*. Six de ces souches ont été isolées chez des enfants de 5 ans et moins. Certaines de ces souches ont été identifiées comme *Neisseria meningitidis* par les laboratoires hospitaliers d'où la nécessité de correctement identifier le méningocoque.

**Tableau 1.** Nombres globaux d'échantillons (tous types invasifs et non-invasifs) reçus au CNR des méningocoques 2011-2019

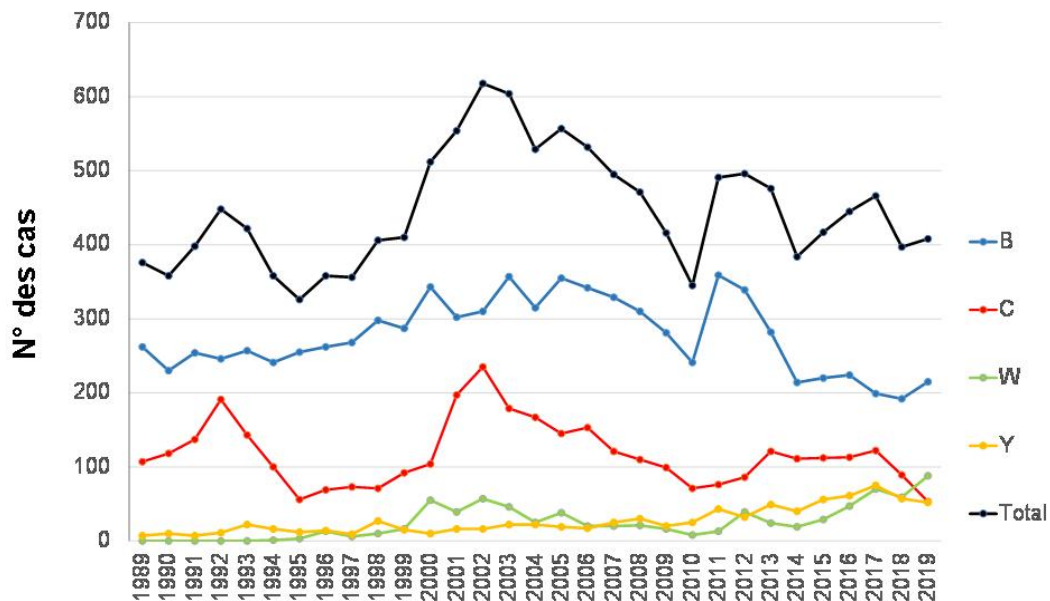
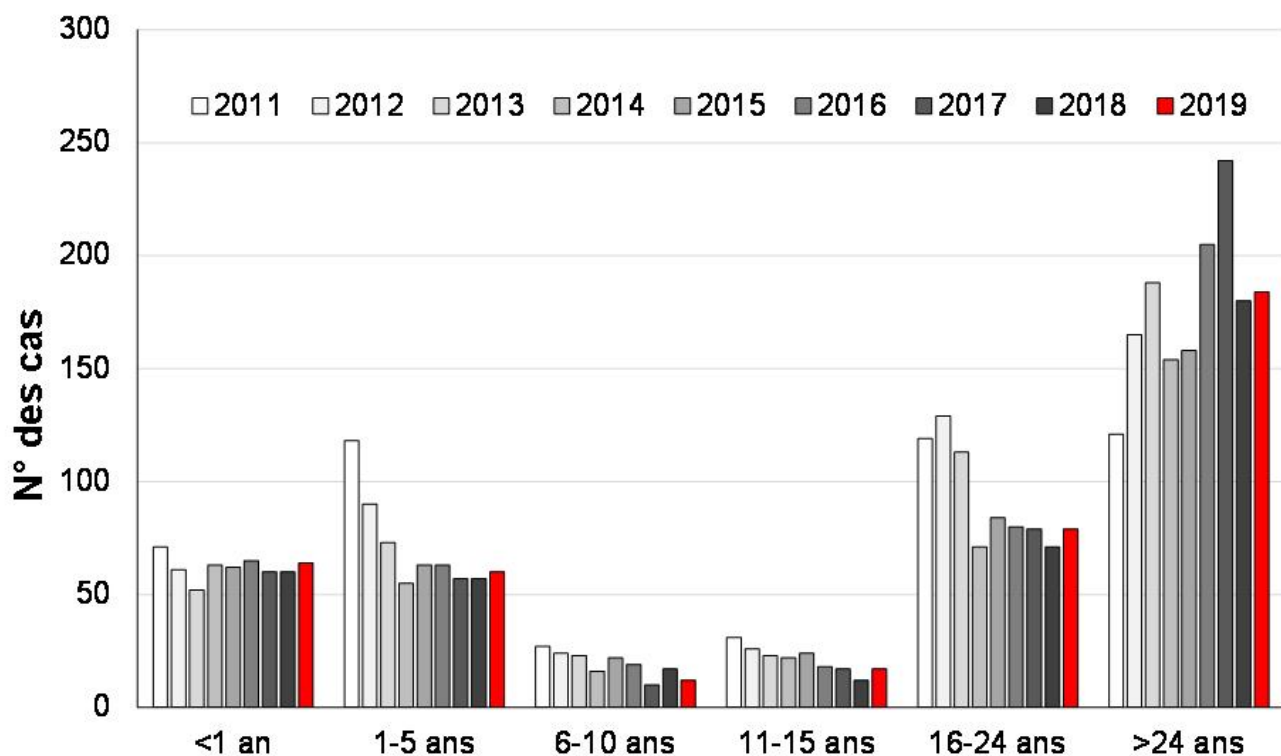
Année	N° total d'échantillons	Souches bactériennes isolées*	Prélèvements primaires**	N° cas d'IIM***	Groupes (sérogroupes et génogroupes)					
					A	B	C	Y	W	Autres
2011	979	525	454	496	1	359	76	43	13	4
2012	979	520	459	506	0	339	86	32	39	10
2013	958	540	418	483	0	292	121	49	24	7
2014	704	390	314	389	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

\* 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 2019 est montrée dans la **Figure 1A**. Le nombre des cas d'IIM est en augmentation en 2019 et cela concerne les sérogroupes B et W alors que le séro groupe C continue à baisser. L'augmentation de 5% du nombre des cas d'IIM en 2019 (tous sérogroupes) par rapport à 2018 semble concerner l'ensemble des tranches d'âge sauf les 6-10 ans (**Figure 1B**).

**A****B**

**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 2011-2019).

La proportion des cas confirmés par PCR seulement est de 19%. De plus, 4% 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 (77%). (**Tableau 2**).



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

Année	N° négatifs	Génogroupe						Total	n° positifs	% des positifs
		négatif	A	B	C	W	Y			
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%

### 2.5.1. Les procédures appliquées au CNR

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 séro groupe (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 séro groupe 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

## **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 2019 était de 319 sur un total de 325 cas d'IIM confirmés par culture et disponibles au CNR (>98%). A la fin de l'année 2019, le CNR avait séquencé au total 2047 souches du genre *Neisseria* (1994 *N. meningitidis* et 55 souches d'autres espèces du genre *Neisseria*), ces souches ayant été collectées sur la période de 1991 à 2019.

Les données fastaq sont stockées sur le serveur du P2M. Les données publiées sont accessibles sous forme fasta/fastaq sur le site PUBMLST.

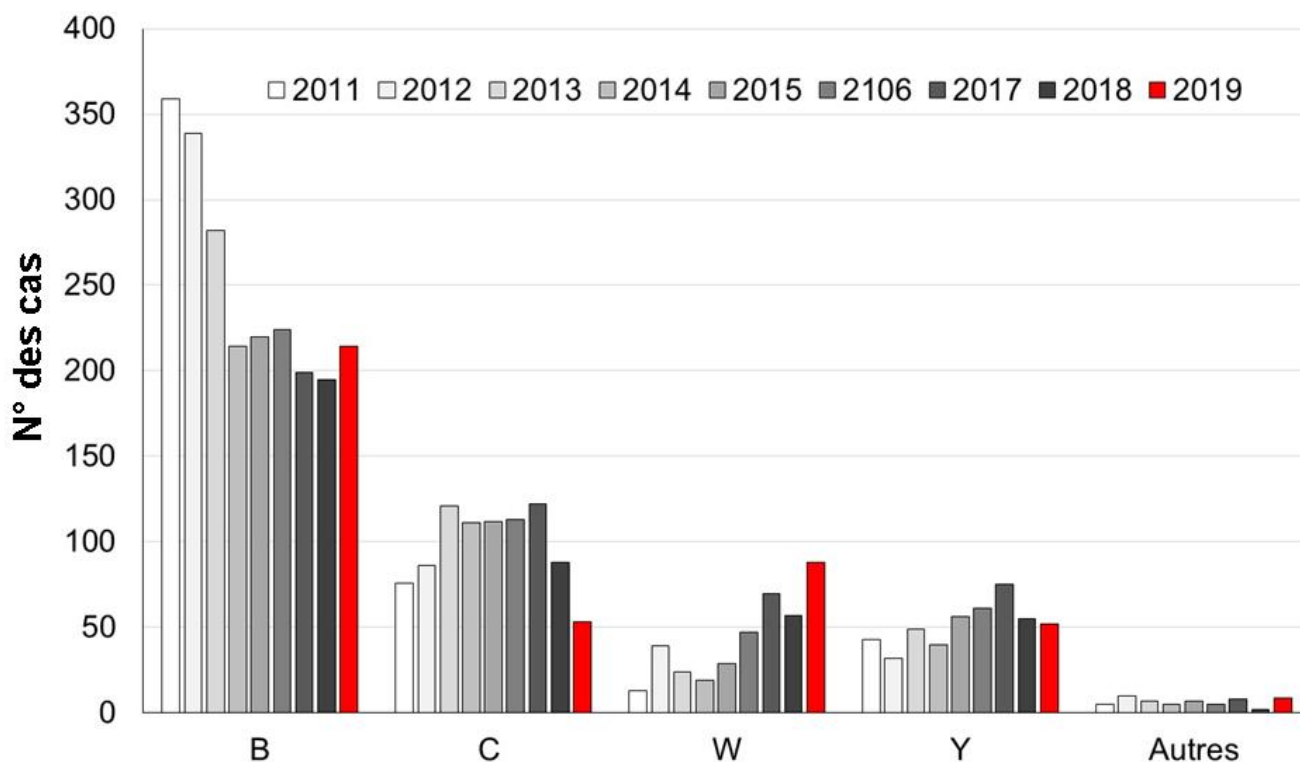
### 3. Activités de surveillance

#### **3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des IIM**

##### **3.1.1. Caractéristiques des cas d'IIM**

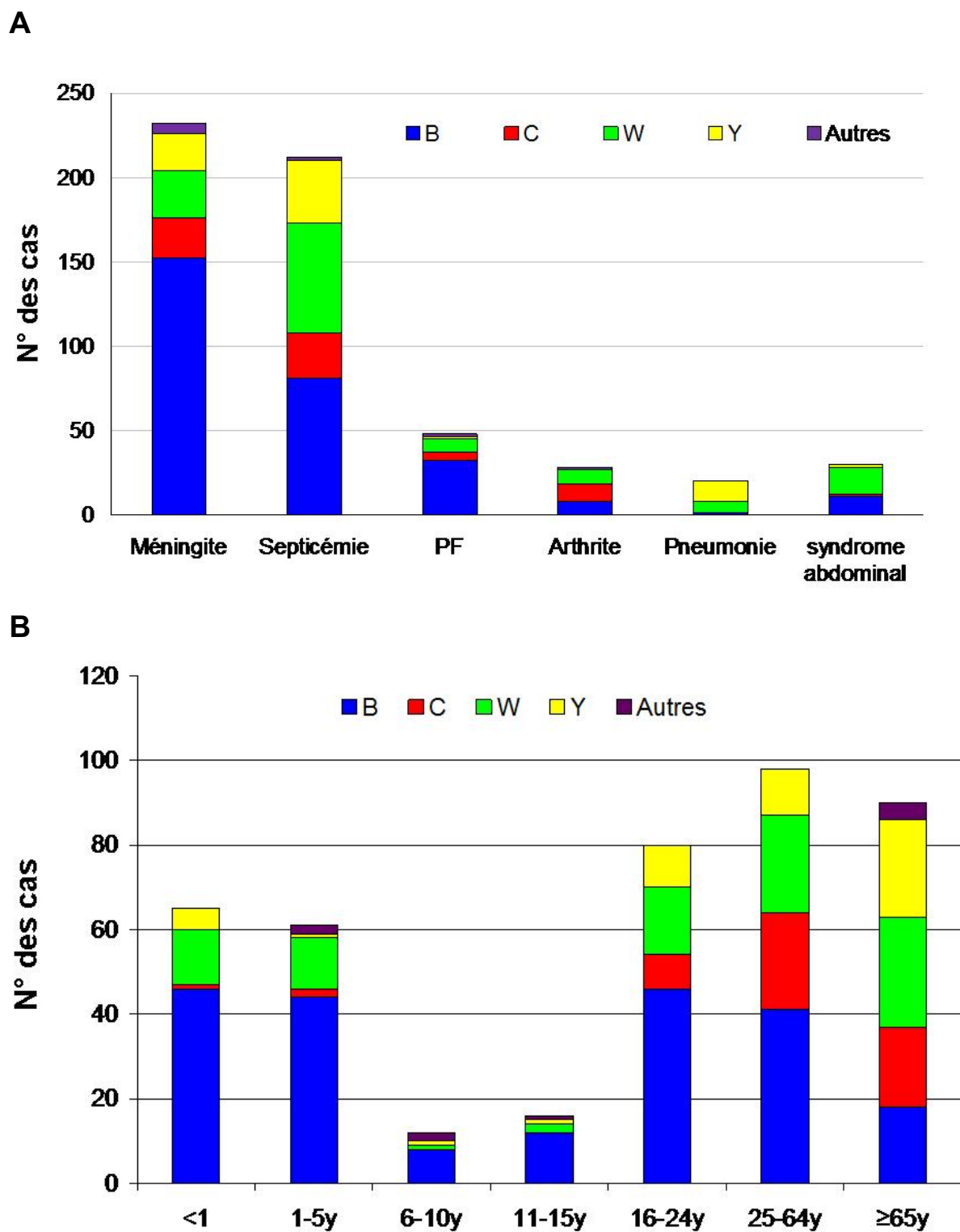
Le ratio homme/femme était de 0,8. Parmi les 416 cas confirmés par culture et /ou PCR, la distribution en groupe était : groupe B (n=214 ; 51%), groupe C (n=53 ; 13%), groupe Y (n=52, 13%), groupe W (n=88, 21%) et les autres groupes et non groupables (n=9, 2%). Le nombre des cas a donc augmenté de 5% en comparaison à l'année 2018 et cela concerne l'ensemble des tranches d'âge (sauf les 6-10 ans). (**Figure 1B**). Cette augmentation globale contraste avec la baisse importante des souches NmC dont le nombre de cas est passé de 122 en 2017 à 88 en 2018 et à 53 en 2019. Les cas dus au séro groupe B (NmB) sont passés de 195 en 2018 à 214 à 2019 et représentent à nouveau plus de 50% de l'ensemble des cas. Ce sont surtout les souches du séro groupe W qui ont augmenté en passant de 57 en 2018 à 88 en 2019. (**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% des cas alors que la septicémie à méningocoque était présente dans 51% des cas. Les formes atypiques non-méningées (arthrite, pneumonie invasive ou syndromes abdominaux) étaient présentes dans presque 20% 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 est plus fréquemment associée aux sérogroupes Y et W et les syndromes abdominaux avec le séro groupe W.

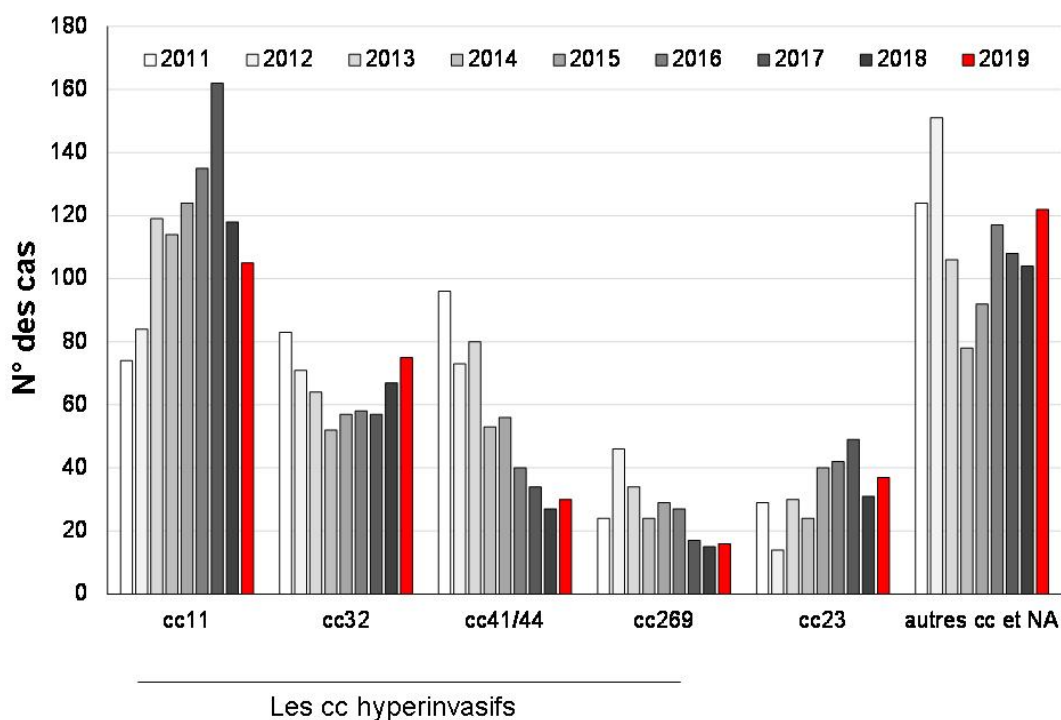


**Figure 2.** Évolution de la distribution des sérogroupes des méningocoques responsables d'infections invasives en France (nombre des cas confirmés par culture et/ou par PCR reçus au CNR entre 2011-2019).

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 385 cas (93% de l'ensemble des 416 cas reçus au CNR). Ce pourcentage était plus important pour les cas confirmés par culture (99%) que pour les cas confirmés seulement par PCR (65%). Ce dernier pourcentage est supérieur à celui de 2018 (53%) grâce à l'amélioration de la technique MLST directement sur prélèvement primaires.



**Figure 3.** (A) Distribution en nombre de cas des formes cliniques des IIM en 2019 en fonction du sérotype (B) Distribution en nombre de cas des IIM en 2019 en fonction des sérotypes et des tranches d'âge.



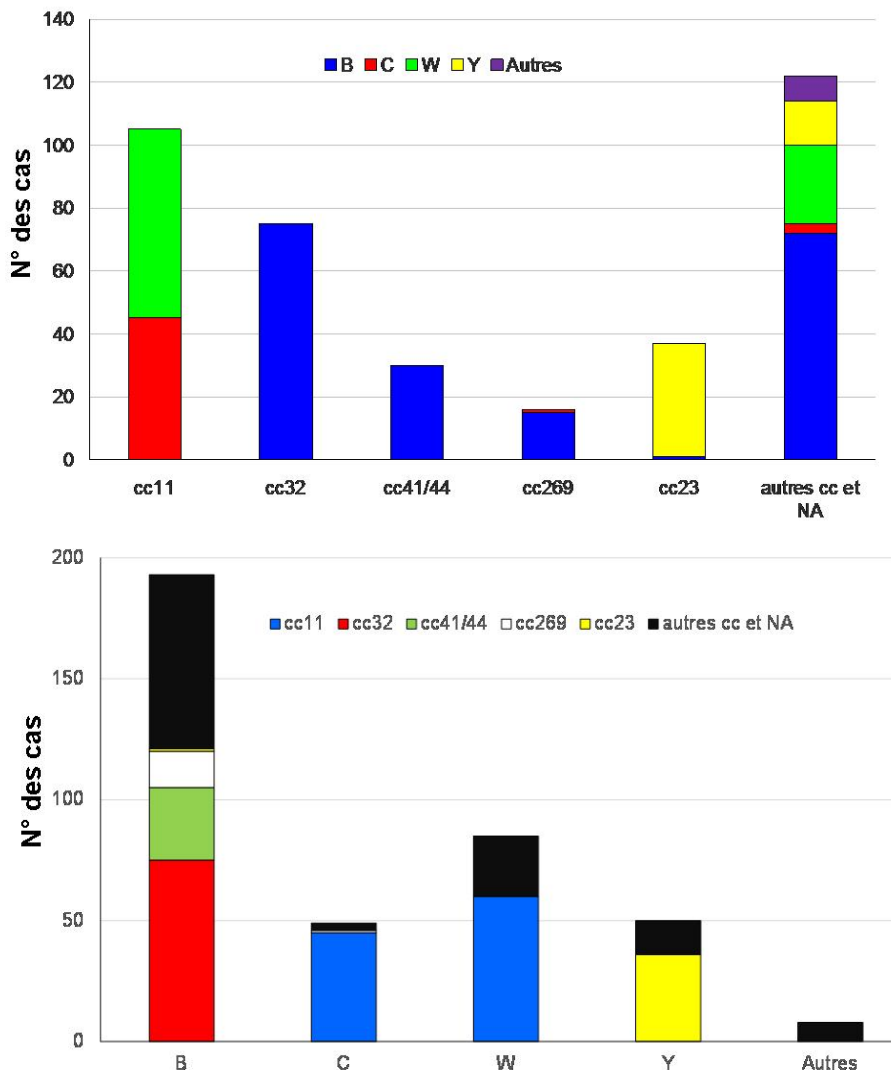
**Figure 4.** Evolution de la distribution des complexes clonaux majeurs en France entre 2011 et 2019.

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 : cc11 (27%), cc32 (20%) cc23 (10%) cc41/44 (8%) et cc269 (4%). La proportion des cas dus aux souches appartenant aux cc hyperinvasifs (cc11, cc32, cc41/44 et cc269) a reculé légèrement (différence non significative) en 2019 (59% versus 63% en 2018). 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). A l'opposé, les cas dus aux souches du cc32 (en grande majorité du sérotype B) ont augmenté pour la deuxième année consécutive. Cela pourrait refléter l'augmentation du ST-7460 du cc32 (voir le suivant paragraphe 3.2.2).

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) qui semble en expansion et en particulier dans les Hauts-de-France (voir le paragraphe 3.2.4).

Enfin, il est à noter que 8 des 9 cas dus aux autres sérotypes que les B, C, W et Y sont provoqués par des souches du sérotype X dont une souche du cc181. Les souches de ce complexe clonal circulent activement en Afrique Subsaharienne. Il est donc important d'identifier les souches du sérotype X et de les typer.



**Figure 5.** Distribution des complexes clonaux en fonction des sérogroupes des cas d'IIM (souches et/ou PCR) en 2019.

### 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 (béta-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 48% des souches 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 (69%) en particulier les souches appartenant au ST-7460 du cc32 qui possèdent toutes un allèle modifié du gène *penA* (l'allèle *penA9*). De plus, 90% des souches du cc461 sont de sensibilité réduite à la pénicilline G. Nous n'avons pas détecté de souche de *N. meningitidis*  $\beta$ -lactamase en 2019.

La distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la pénicilline G est présentée dans la **Figure 6** pour l'année 2019. L'étendue des valeurs des CMI est 0,016-0,75 mg/L. De plus, les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> pour l'ensemble des souches est de 0,094 et 0,380 respectivement, comme en 2018.

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). En effet, 6 souches (2%), dont 4 NmW et 2 NmX, avaient des CMI de C3G >0,032 mg/L et <0,250 mg/L. Ces souches sont donc du séro groupe C, appartiennent au complexe clonal cc11, variant HSH (n=3) et hébergeant l'allèle *penA32*. Une souche NmC qui correspond à un cc non défini. Les deux souches du séro groupe X sont du même ST (ST-10948 d'un cc non défini) hébergent l'allèle *penA906*. Il y a donc une baisse de ces souches liée à la baisse des souches du NmC mais la détection des deux souches NmX d'un même ST ayant le même allèle *penA* doit inciter à surveiller ces souches dans l'avenir.

Toutes les souches étaient sensibles au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et à la rifampicine.



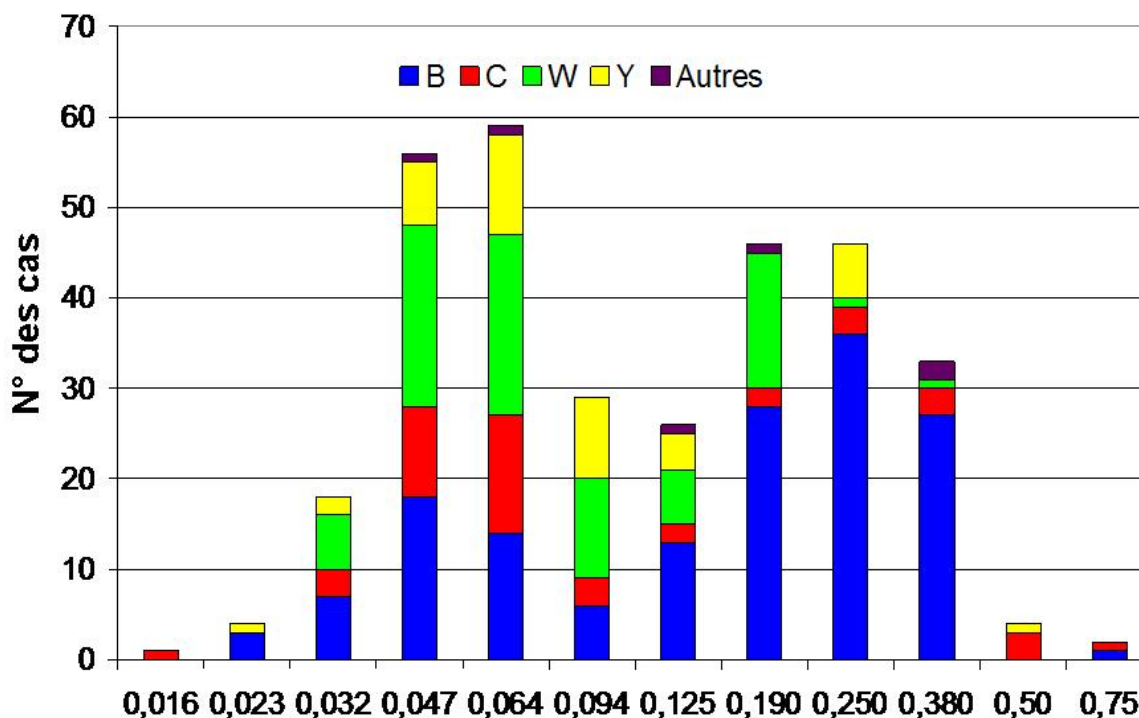
**Tableau 3.** Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2019 pour les 324 cas avec au moins une souche isolées par culture.

Antibiotique	Catégorie*	B	C	Y	W	autres	Total
PénicillineG**	S	48	30	30	57	2	167
	I	105	14	11	23	4	157
	R	0	0	0	0	0	0
% des souches penI/R		69%	32%	27%	29%	67%	48%
Céfotaxime†	S	153	44	41	80	6	324
	R	0	0	0	0	0	0
Rifampicine	S	153	44	41	80	6	324
	R	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacine	S	153	44	41	80	6	324
	R	0	0	0	0	0	0
Chloramphénicol	S	153	44	41	80	6	324
	I	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0

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

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

† 6 souches avaient des CMI >0,032 mg/L et < 0,250mg/L.



**Figure 6 :** Distribution des CMI de la pénicilline G parmi les souches invasives de *N. meningitidis* en 2019.

## 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 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 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<sup>H</sup>. Missions et organisation du CNR

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

## 2<sup>H</sup> 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<sup>H</sup>.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2018

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). 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<sup>H</sup>.2. Collections de matériel biologique

En 2019, le CNR a reçu 390 souches et prélèvements primaires. (**Tableau 5**)

**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
	Prélèvements primaires	2	2	0	0		0
2018	Souche	428	399	25	2		2
	Prélèvements primaires	8	3	0	0		0
2019	Souche	383	357	22	2	2	0
	Prélèvements primaires	7	1	0	0	0	0

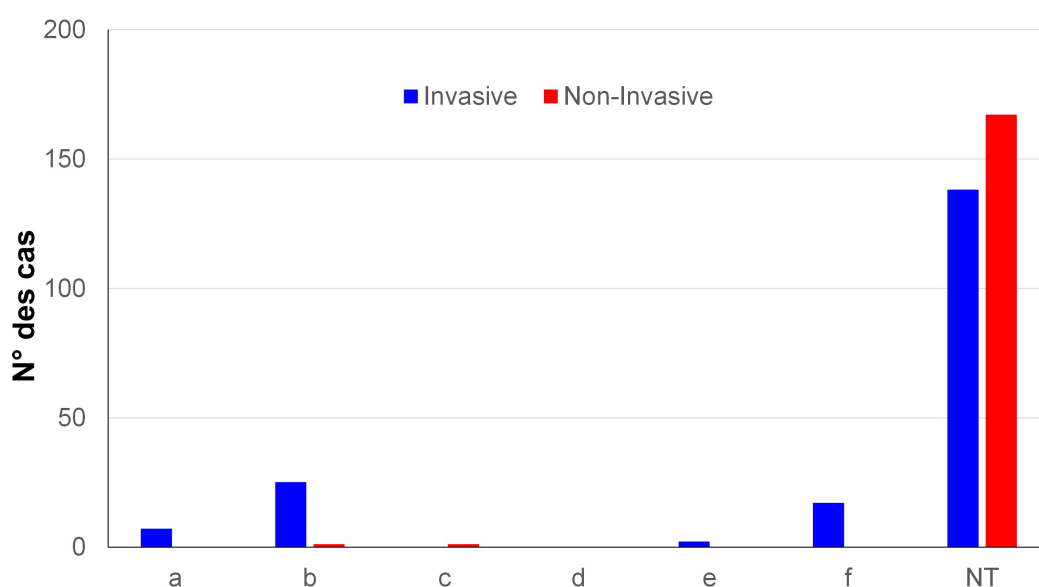
### 2<sup>H</sup>.3. Activités d'expertise

En 2019, le CNR a reçu 383 souches bactériennes (invasives et non invasives) et 7 prélèvements (sang et LCS) pour identification et typage. Le CNR a confirmé ainsi 189 cas d'IIHi dont 1 diagnostiqué seulement par PCR (**Tableau 5**). Neuf cas d'infection invasive ont été identifiés comme *H. parainfluenzae* ( $n=6$ ) (bactériémie), un cas d'*H. Haemolyticus* et 2 cas d'*Aggregatibacter aphrophilus* dont un cas de méningite chez une femme de 54 ans.

**Tableau 6.** 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
	Invasive										
2018	Invasive	174	3	177	6	21	2	0	1	19	128
	Non Invasive	225	0	225	0	0	1	0	0	1	223
	Invasive										
2019	Invasive	188	1	189	7	25	0	0	2	17	138
	Non Invasive	169	0	169	0	1	1	0	0	0	167
	Invasive										

La majorité des souches Hi sont non-typables (73% des souches invasives et 99% des souches non-invasives). Les deux souches non-invasives et typables correspondaient à un cas d'urétrite (Hic) et une souche isolée dans un cas d'expectoration chez une femme atteinte de BPCO qui a consulté pour fièvre et dyspnée (Hib). Les souches typables étaient des sérotypes a, b, c, e et f mais aucune souche de sérotype d n'a été détectée en 2019. Les souches typables représentaient 27% des souches invasives (proche de 28% en 2018) 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<sup>H</sup>.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 2019 était de 190. Les données fastaq sont stockées sur le serveur sécurisé du P2M. Les données publiées sont accessibles sous forme fasta sur le site PUBMLST.

## **3<sup>H</sup>. Activités de surveillance**

### **3<sup>H</sup>.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections**

#### **3<sup>H</sup>.1.1. Caractéristiques des cas d'IIHi**

Le ratio homme/femme était de 1,1 parmi les 189 cas confirmés par culture et /ou PCR. La distribution des sérotypes de souches invasives en fonction des sites d'isolement est montrée dans le **Tableau 6**.

**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	3	8	0	0	0	11	34	56	30%
Sang	3	16	0	0	2	6	94	121	64%
Liquide articulaire ou liquide pleural ou autres	1	1	0	0	0	0	10	12	6%
Total	7	25	0	0	2	17	138	189	
%	2 %	13 %	0 %	0 %	1 %	9 %	73 %		

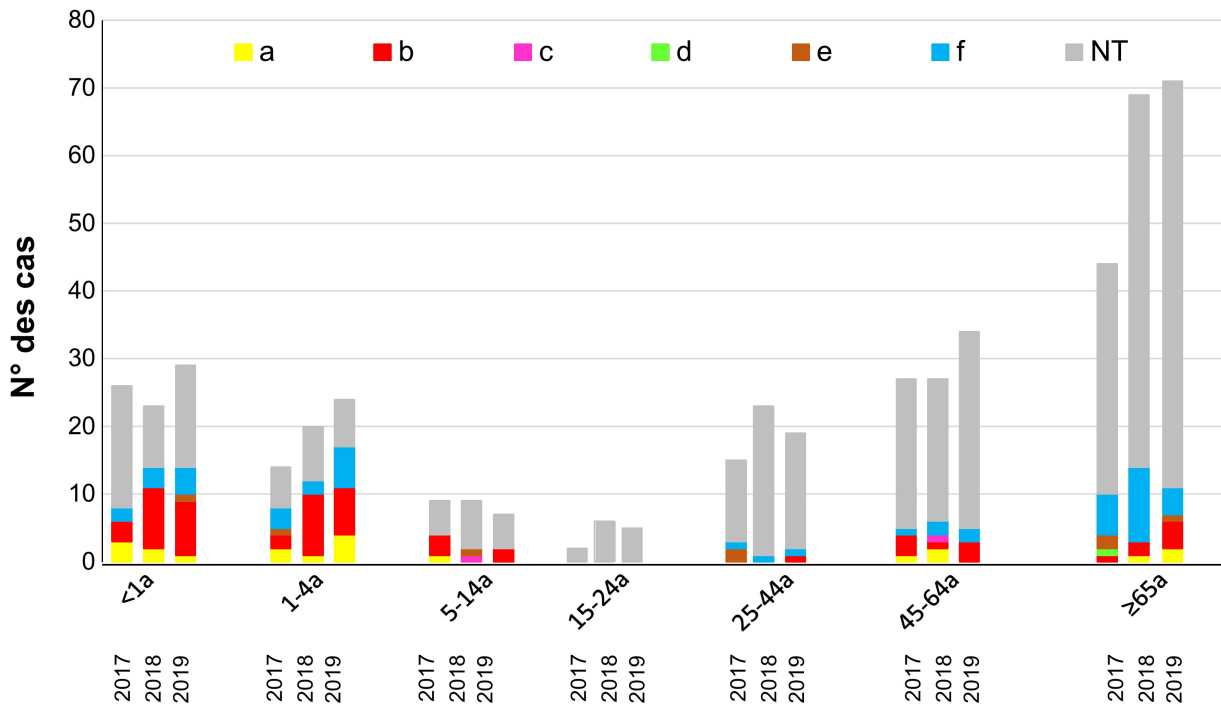
Les IIHi sont en grande majorité provoquées par des souches NT (73%), une proportion stable par rapport à 2018 (72%). Le nombre de cas dus à des souches NT a augmenté de 128 en 2018 à 138 en 2019.

### Les formes cliniques des cas d'IIHi

Les méningites (détection du Hi dans le LCS et /ou dans le sang avec au moins 10 éléments cellulaires dans le LCS) représentaient 61 cas (soit 32% de l'ensemble des cas d'IIHi reçus au CNR). 25 de ces 61 cas (41%) étaient provoqués par des souches typables, dont 10 (16%) par des souches du sérotype b, qui était le sérotype le plus répandu en France en 2019, comme en 2018 et 2017 (10 cas Hib en 2017, 21 en 2018 et 25 en 2019). La distribution des cas en fonction de l'âge est présentée dans la **Figure 8**.

Les présentations cliniques restaient dominées (n=121 ; 64% de l'ensemble d'IIHi) par la bactériémie (isolée ou associée à d'autres formes comme la méningite, les pneumopathies, les arthrites). A noter 3 cas d'épiglottite (2 cas dus au sérotype b et un cas dû au sérotype a). Les 12 cas pour lesquels les souches ont été isolées dans d'autres sites stériles correspondent à des cas d'arthrite (isolement dans le liquide articulaire), de péricardite (isolement dans le liquide péricardique) ou de pleurésie (isolement dans le liquide pleural).

Deux cas d'infection foëto-maternelle (souches NT) avec l'isolement de la même souche dans le sang et le liquide gastrique du nouveau-né et dans le placenta.



**Figure 8.** Distribution en fonction de l'âge des sérotypes des souches de Hi responsables d'infections invasives en France 2017-2019.

L'augmentation en 2019 des IIHi est en majorité chez les sujets adultes de 45 ans et plus et est en majorité due à des souches HiNT (n=89 en 2019 versus n=66 en 2018 chez les sujets de 45 ans et plus. En effet, 62% des souches invasives NT sont détectées chez les sujets de 45 ans et plus alors que ce pourcentage était de 52% en 2018). Chez les enfants <5 ans, se sont les souches typables qui dominent avec 60% en 2018 (n=26) et 58% en 2019 (n=31) avec en majorité les souches du sérotype b suivies des souches de sérotypes f et a. Il est important de noter ici que 8 cas d'IIHib ont été diagnostiqués chez les nourrissons de <1 an en 2019 (9 cas en 2018) (soit 28% des cas d'IIHi chez les <1 an) (**Figure 18**).

### 3<sup>H</sup>.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 83 (23%) souches de l'ensemble des 357 souches caractérisées au CNR par antibiogramme. Ce pourcentage est stable et similaire à celui de 2018 (22%). La proportion était plus élevée parmi les souches invasives que parmi les souches non invasives (27% et 20%, 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 et a détecté une nouvelle mutation qui confère la résistance aux céphalosporines de troisième génération. Le **Tableau 7** est une synthèse des phénotypes observés parmi les souches caractérisées au CNR en 2019.

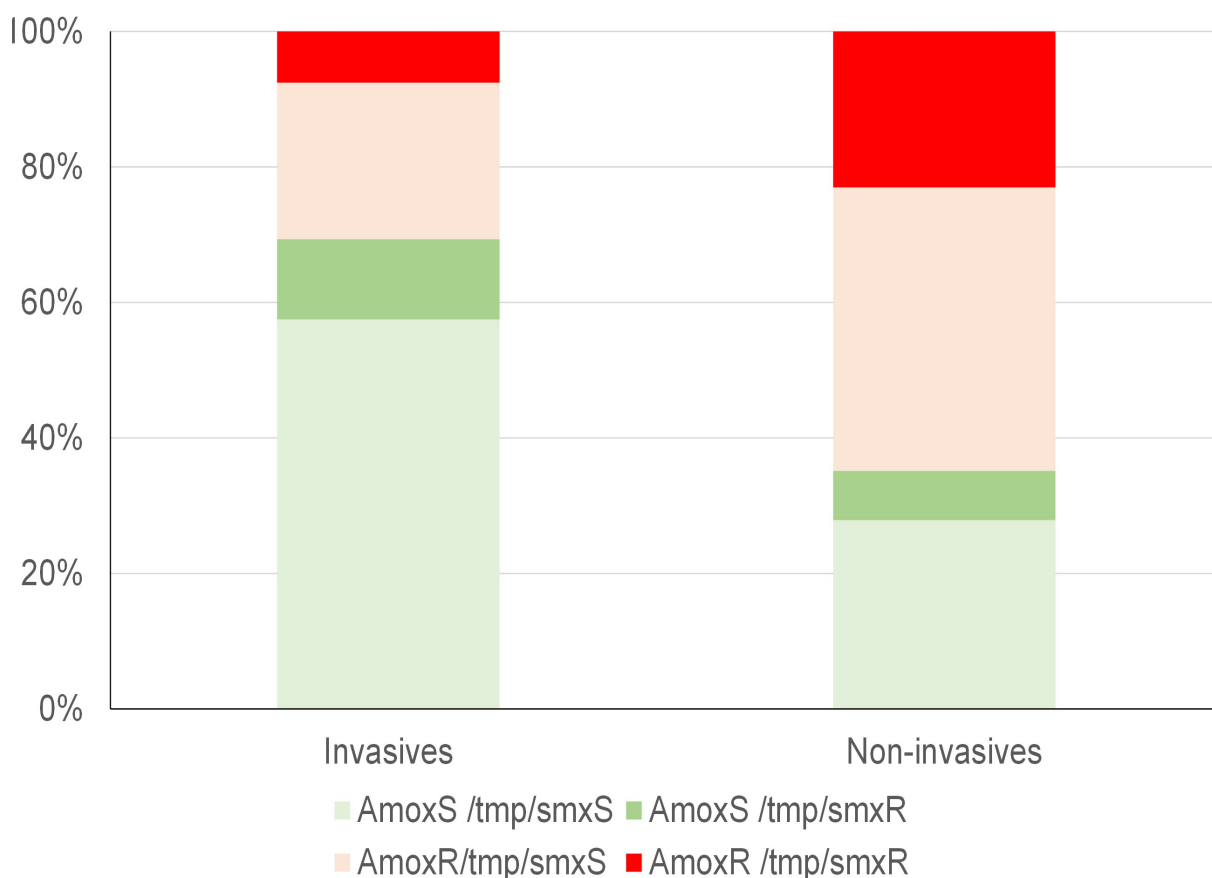


**Tableau 7.** Profils d'antibio-sensibilité des souches d'infections invasives étudiées en 2018.

maladie/phénotype	a	b	c	d	e	f	NT	Total	% de résistance	p
<b>Ampicilline</b>										
Souches invasives sensibles S	6	19	0	0	2	16	88	131		
Souches invasives résistantes R	0	4	0	0	0	1	50	55		
Total	6	23	0	0	2	17	138	186	30	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	54	56		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	109	109		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	66	<0,0001
<b>Amoxicilline</b>										
Souches invasives sensibles S	6	19	0	0	2	16	86	129		
Souches invasives résistantes R	0	4	0	0	0	1	52	57		
Total	6	21	2	0	2	17	138	186	31	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	56	58		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	107	107		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	65	<0,0001
<b>Amoxicilline/acide clavulanique</b>										
Souches invasives sensibles S	6	23	0	0	2	17	112	160		
Souches invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	26	26		
Total	6	21	2			18	126	186	14	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	71	73		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	92	92		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	56	<0,0001
<b>Cefotaxime</b>										
Souches invasives sensibles S	6	22	0	0	2	17	132	179		
Souches invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	7	7		
Total	6	22	0	0	2	17	139	186	4	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	86	88		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	77	77		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	47	<0,0001
<b>Rifampicine</b>										
Souches invasives sensibles S	6	23	0	0	2	17	138	186		
Souches invasive résistantes R	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total	6	23	0	0	0	17	138	186	0	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	163	165		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	0	
<b>Ciprofloxacine</b>										
Souches invasives sensibles S	6	23	0	0	2	17	134	182		
Souches invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	4	4		
Total	6	23	0	0	2	17	126	186	1	
Souches non-invasives sensibles S	0	1	1	0	0	0	153	155		
Souches non-invasives résistantes R	0	0	0	0	0	0	10	10		
Total	0	1	1	0	0	0	163	165	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 représentent donc une proportion importante même au sein des souches invasives où elles sont en augmentation en comparaison à 2018. 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 2019 pour le TMP/SMX. En effet, la proportion des souches résistantes au (TMP/SMX) était de 19% pour les souches invasives et de 30% 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 75% parmi les souches invasives et de 64% parmi les souches non-invasives (**Figure 9**). Ces proportions restent proches de celles de 2018.



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

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

### **4.1. Evaluation de l'utilisation du MALDI-TOF MS pour l'identification bactérienne (appliquée aux *Neisseria* et *Haemophilus*).**

L'utilisation de la technique MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry*) pour l'identification bactérienne est de plus en plus répandue en milieu hospitalier du fait de sa rapidité, sa simplicité d'utilisation et de son faible coût. Cependant l'identification du méningocoque par cette technique et des espèces appartenant au genre *Neisseria* est mise en cause par des erreurs de diagnostic qui sont liées à la qualité des bases des données actuellement disponibles. Nous avons établi une nouvelle base des données enrichie par des souches du genre *Neisseria* que nous avons bien caractérisées par séquençage du génome entier. La nouvelle base des données a amélioré significativement la spécificité de l'identification de *N. meningitidis*. Cette base de données peut être proposée à l'utilisation en bactériologie clinique dans les laboratoires hospitaliers.

### **4.2. Analyse de l'émergence de la résistance aux céphalosporines de troisième génération chez *H. influenzae***

En France comme en Europe, les isolats d'*H. Influenzae* (Hi) non typables sont responsables de la majorité des cas d'infections invasive à Hi. Les données récentes suggèrent une augmentation de la virulence de ces isolats ainsi que l'acquisition des résistances à plusieurs antibiotiques. En particulier, la résistance aux bêta-lactames est due à l'acquisition d'une bêta-lactamase et / ou des mutations dans le gène *ftsI* qui code pour la protéine de liaison à la pénicilline 3 (PLP3).

Nous avons donc décrit les tendances épidémiologiques récentes des infections invasives à *H. influenzae* en France sur la base des isolats invasifs reçus au Centre National de Référence d'*H. influenzae* au cours de l'année 2017. Un résultat important était que les isolats du sérotype b représentait 10% des cas et étaient homogènes génétiquement alors que les isolats non typables étaient les plus fréquents et ont montré une grande hétérogénéité. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont indiqué que 24% des isolats invasifs étaient résistants à l'ampicilline (par au moins l'un de deux mécanismes (bêta-lactamase et / ou des modifications de la PLP3). De plus, les isolats résistants à l'ampicilline mais négatifs à la bêta-lactamase (BLNAR par modification de la PLP3) représentaient 7% des isolats. Nous avons établi une base des données pour les mutations du gène *ftsI*. En particulier, les allèles *ftsI* qui abritaient les mutations D350N, S357N, M377I et S385T étaient résistants à l'ampicilline et aux céphalosporines de troisième génération (C3G). Cette résistance aux C3G est un nouveau phénotype parmi les souches invasives en France et représente une évolution inquiétante de la résistance aux antibiotiques des souches Hi.

Nos données suggèrent aussi que les isolats invasifs de *H. influenzae* diffèrent phénotypiquement et génotypiquement des isolats non invasifs. Le séquençage du génome entier doit être utilisé en routine pour la caractérisation des isolats de *H. influenzae* afin de suivre de manière fiable l'émergence, la propagation et le mécanisme de la résistance aux antibiotiques.

#### **4.3. Emergence d'une nouvelle lignée génétique (ST-9316) du méningocoque du séro groupe W en région Hauts de France.**

L'épidémiologie des IIMW a récemment changé au niveau mondial avec l'émergence d'isolats appartenant au complexe clonal ST-11 (CC11) dérivé de la souche Amérique du Sud-Royaume-Uni. Un changement plus récent a été détecté en France (et en particulier dans la région les Hauts de France) avec l'émergence d'un nouveau génotype distinct du CC11.

Nos données ont montré une augmentation locale des isolats IMDW dans la région les Hauts de France depuis 2013. Les isolats appartenaient en grande majorité au ST-9316. Les données des génomes entiers (WGS) ont permis de regrouper les isolats du ST-9316 qui étaient éloignées des isolats du complexe clonal CC11. Contrairement aux cas dus aux isolats W / CC11, les cas dus aux isolats W / ST-9316 ont été principalement observés chez les nourrissons de moins de 1 an, mais avec une mortalité plus faible par rapport aux cas W/CC11. La comparaison génomique a montré que le W/ST-9316, contrairement aux isolats W/CC11, n'avaient pas le gène *hmbR* codant pour le récepteur de l'hémoglobine qui est un facteur de virulence impliqué dans l'acquisition du fer à partir de l'hémoglobine. Les isolats W/ST-9316 ont en outre montré une virulence plus faible chez les souris par rapport aux isolats W/CC11. La surveillance nécessite des approches puissantes combinant WGS et analyse physiopathologique pour un meilleur contrôle.

#### 4.4 Les publications et communications réalisées en 2019 en lien avec les activités du CNR

##### (i) Publications nationales

1. Deghmane AE, Taha MK. Infections à « Haemophilus influenzae » EM Consulte: Elsevier; 2019. Infections à « Haemophilus influenzae ». [8-017-F-10] - Doi : 10.1016/S1166-8598(19)53273-2

##### (ii) Publications internationales

1. Deghmane AE, Hong E, Chehboub S, Terrade A, Falguières M, Sort M, Harrison O, Jolley KA, Taha MK. High diversity of invasive Haemophilus influenzae isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of ftsI gene. J Infect. 2019;79(1):7-14.S0163-4453(19)30151-3 [pii] 10.1016/j.jinf.2019.05.007.
2. Taha MK, Deghmane AE, Knol M, van der Ende A. Whole genome sequencing reveals Trans-European spread of an epidemic Neisseria meningitidis serogroup W clone. Clin Microbiol Infect. 2019.S1198-743X(18)30841-3 [pii] 10.1016/j.cmi.2018.12.030.
3. 165.Topaz N, Caugant DA, Taha MK, Brynildsrud OB, Debech N, Hong E, Deghmane AE, Ouedraogo R, Ousmane S, Gamougame K, Njanpop-Lafourcade BM, Diarra S, Fox LM, Wang X. Phylogenetic relationships and regional spread of meningococcal strains in the meningitis belt, 2011-2016. EBioMedicine. 2019;41:488-96.S2352-3964(19)30133-1 [pii] 10.1016/j.ebiom.2019.02.054 PMID: 6443582.
4. 164.El Sissy C, Rosain J, Vieira-Martins P, Bordereau P, Gruber A, Devriese M, de Pontual L, Taha MK, Fieschi C, Picard C, Fremeaux-Bacchi V. Clinical and Genetic Spectrum of a Large Cohort With Total and Sub-total Complement Deficiencies. Frontiers in Immunology. 2019;10.Artn 1936 10.3389/Fimmu.2019.01936.
5. 163. Muzzi A, Brozzi A, Serino L, Bodini M, Abad R, Caugant D, Comanducci M, Lemos AP, Gorla MC, Krizova P, Mikula C, Mulhall R, Nissen M, Nohynek H, Simoes MJ, Skoczynska A, Stefanelli P, Taha MK, Toropainen M, Tzanakaki G, Vadivelu-Pechai K, Watson P, Vazquez JA, Rajam G, Rappuoli R, Borrow R, Medini D. Genetic Meningococcal Antigen Typing System (gMATS): A genotyping tool that predicts 4CMenB strain coverage worldwide. Vaccine. 2019;37(7):991-1000.S0264-410X(19)30032-5 [pii] 10.1016/j.vaccine.2018.12.061.
6. Hong E, Bakhalek Y, Taha MK. Identification of Neisseria meningitidis by MALDI-TOF MS may not be reliable. Clin Microbiol Infect. 2019;25(6):717-22. doi:S1198-743X(18)30637-2 [pii] 10.1016/j.cmi.2018.09.015

##### (iii) Communications internationales

- 1- Deghmane AE, Hong E, Harrison O, Jolley K, Taha M-K. High diversity of invasive Haemophilus influenzae isolates in France revealed by whole genome sequencing. EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 2- Hong E, Terrade A, Denizon M, Taha M-K, Deghmane AE. Recent evolution of the epidemiology of Haemophilus influenzae type b and seroprevalence in France; EMGM, Prague, May 2019Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 3- Domenech de Cellès, M, Campbell H, Borro R, Taha M-K, Opatowski, L. Epidemic potential of the emerging meningococcal serogroup W Sequence type-11 clonal complex: a mathematical modeling study EMGM, Prague, May 2019Lisbon, Portugal Présentation orale.

- 4- Guiddir T., Deghmane, A-E., Hog, E, Taha M-K. Persistence reporting of abdominal presentations and nonmeningeal forms of invasive meningococcal disease. EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 5- Biolchi A, De Angelis G, Moschioni M, Tomei S, Brunelli B, Giuliani M, Bambini S, Borrow R, Claus H, Gorla M, Hong E, Lemos A.P, Lucidarme J, Taha M-K, Vogel U, Comanducci M, Budroni S, Giuliani M.M, Rappuoli R, Boucher P, Pizza M. 4CMenB, a multicomponent meningococcal vaccine developed for serogroup b meningococci elicits cross-reactive immunity also against serogroups c, w and y . EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 6- Beggaz M, Hong E, Deghmane AE, Taha, M-K Genomic and functional analysis of neisseria meningitidis isolates from invasive meningococcal disease in neonates. EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 7- Hong E, Deghmane AE, Taha M-K. Emergence of resistance to third generation cephalosporins in haemophilus influenzae by alteration of ftsi gene. EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 8- Dinleyici E, Borrow R, Taha M-K, Safadi M, Vazquez J, Smith V, Acevedo A, Bai X, Carlos J, Ceyhan M, Christensen H, Climent Y, Caugant D.A, de Wals P, Echaniz G, Hakawi A, Harrison, L.H, Kamiya H, Karachaliou A, Lucidarme J, Meiring S, Mironov K, Shao Z, Stephen R, Stenmark B, Trotter C, Zhou B, Global meningococcal initiative 2018: current situation of Meningococcal disease and further recommendations/strategies. EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.
- 9- Deghmane AE, Hong E, Taha M-K. The emergence of a new genetic lineage (st-9316) of Neisseria meningitidis sgroup w in north France. . EMGM, Prague, May 2019 Lisbon, Portugal Présentation orale.

(vi) Conférences sur invitation.

- 1- Taha M-K. The new generation of complement inhibitors and implications for clinical practice and vaccination policy. Meningitis Research Foundation meeting London 06 Nov2019.

# 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 sérotype 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 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 sérogroupes	typage phénotypique	1-2j. 2h par génogroupage si la souche n'est pas sérogoupée 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 et de l'évolution des souches

\* Technique accréditée pour *N. meningitidis* et en cours pour *H. influenzae*

## 2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR

<b>Techniques</b>	<b>Type</b>	<b>Kit commercial disponible</b>
Identification bactériologique	Identification	Api-NH
Sérogroupage pour les sérogroupe A, B, C, Y/W sur souches isolée par culture	typage phénotypique	Pastorex (Kit évaluer par le CNR) Technique évalué par la CNR
Amplification génique (PCR) (pour <i>N. meningitidis</i> )	diagnostic sans culture en première intention	Diagenode ((Kit évaluer 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