

CNR des Staphylocoques

Rapport d'activités annuel 2006

1- Introduction :

1-1- Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation, le cas échéant, la répartition des missions avec son ou ses laboratoires associés et ses principaux partenaires

Le CNR des staphylocoques a pour principales missions de :

- développer et maintenir une collection de souches responsables d'infections nosocomiales et communautaires,
- identifier et typer les souches responsables de formes cliniques inhabituelles, les souches multi-résistantes de diffusion clonale et caractériser les toxines,
- rechercher et caractériser les toxines dans les prélèvements cliniques et alimentaires, dans le cadre de l'investigation de toxi-infections alimentaires ou d'autres cas groupés,
- développer des techniques de typage moléculaire,
- identifier de nouveaux génotypes de résistance aux anti-infectieux et caractériser les mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques,
- évaluer et valider, en lien avec le CNR de la résistance aux antibiotiques, les techniques de détection de résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques (méthodes standardisées et accessibles à tous les laboratoires), en assurer la diffusion et développer une procédure de contrôle qualité,

- contribuer à la surveillance épidémiologique des infections et toxémies staphylococciques en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire, en particulier :
 - en renforçant les collaborations avec les réseaux des laboratoires hospitaliers de microbiologie, notamment pour les souches responsables d'infections nosocomiales,
 - en développant un partenariat avec des réseaux de laboratoires d'analyses de biologie médicale pour la surveillance de l'émergence de clones responsables d'infections en ville,
 - en collaborant aux enquêtes épidémiologiques visant à maîtriser les épidémies et cas groupés d'infections staphylococciques,
- collaborer avec les réseaux de surveillance européens et internationaux,
- contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout événement inhabituel : émergence d'un nouveau phénotype de résistance aux antibiotiques, émergence de souches à la virulence particulière, détection de cas groupés.

1-2- Résumé des activités de l'année N : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte

L'année 2006 a été marquée par :

- la caractérisation du clone majoritaire hospitalier de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et diffusant dans tout le territoire national. Ce clone a un "sequence type" (ST) de type 8, un allèle *agr* de type 1 et une cassette *SCCmec* de type IV ; il a été dénommé le clone Lyon,
- la caractérisation d'un nouveau clone communautaire et hospitalier de SARM contenant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique. Ce clone a un "sequence type" (ST) de type 5, un allèle *agr* de type 2 et une cassette *SCCmec* de type IV,
- une participation aux réseaux de surveillance en particulier français et européens à travers le réseau EARSS. Cette étude débutée le 1^{er} septembre 2006 a permis de collecter 200 souches invasives de *S. aureus* (dont 100 souches résistantes à la méticilline) provenant de 22 laboratoires français. Tous ces laboratoires appartenaient au réseau EARSS. Tous les pays de l'Union Européenne ont également participé à ce protocole.

- la participation à l'alerte et l'investigation de cas groupés notamment à *S. aureus* producteurs de LPV en milieu scolaire
- des avancées marquantes en terme de compréhension des mécanismes physiopathologiques de certaines maladies staphylococciques, notamment celles associées aux souches productrices de LPV et de superantigènes

1- 3- Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR (les adresses indiquées sont celles au 17 avril 2007)

Personnel consacrant une part de leur activité au CNR	
Centre de Biologie Est Faculté de Médecine Laennec Faculté de Médecine Lyon Nord	Fax : 04 72 35 73 35 Fax : 04 78 77 86 58 Fax : 04 78 77 75 50
François Vandenesch – directeur Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 35 72 52 ou 04 78 77 86 57 E-mail : denesch@univ-lyon1.fr
Jérôme Etienne – co-directeur Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Nord	Tél : 04 72 12 96 24 ou 04 78 77 86 57 E-mail : jetienne@univ-lyon1.fr
Gérard Lina (virulence) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférence- Faculté de Médecine Laennec	Tél : 04 72 12 96 67 ou 04 78 77 86 42 E-mail : gerard.lina@chu-lyon.fr
Yves Gillet (infectiologie pédiatrique) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 11 68 43 E-mail : yves.gillet@chu-lyon.fr
Marie-Elisabeth Reverdy (antibiotique) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 66 E-mail : marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr

Michèle Bes (identification) Biologiste contractuel - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 62 E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Muriel Croze Praticien Attaché – Centre de Biologie Est	Tél. : 04 72 12 96 68 E-mail : muriel.croze@chu-lyon.fr
Olivier Dauwalder Assistant hospitalo-universitaire – Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 69 E-mail : olivier.dauwalder@chu-lyon.fr
Hélène Meugnier (lien de clonalité) Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 80 E-mail : helene.meugnier@chu-lyon.fr
Sandrine Boisset (webmaster) Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 64 E-mail : sandrine.boisset@univ-lyon1.fr
Techniciens rattachés à l’Hôpital Edouard Herriot	
Christine Gardon Christine Courtier Martine Rougier Annie Matra Caroline Bouveyron	
Techniciens et Ingénieur crédits InVS	
Florence Couzon (Ingénieur) Cécile Spinelli (Technicienne)	

Le laboratoire hospitalier où se réalisent la plupart des activités du CNR est inscrit dans une démarche qualité avec constitution d’un groupe qualité renforcé à l’occasion du rassemblement sur un même site des laboratoires de Bactériologie de l’hôpital Edouard Herriot, Neuro-Cardiologique et Debrousse. Le nouveau laboratoire qui a ouvert en mars 2007 est situé dans le Centre de Biologie Est. Le laboratoire universitaire (INSERM U851) où se réalise une partie des activités du CNR (en particulier certains aspects plus fondamentaux) et qui héberge une

partie de la biothèque, est engagé dans une démarche qualité appuyée par les tutelles (INSERM et Université)

Locaux et équipements :

Le laboratoire hospitalier, localisé encore en 2006 à l'hôpital Edouard Herriot occupe une surface de 450 m². Les locaux spécifiquement dévolus à l'activité staphylocoque sont d'environ 40 m². Cependant, le CNR utilise de nombreux équipements communs à l'ensemble de l'activité du laboratoire (PCR, pesée, électrophorèse, laverie,..). Depuis mars 2007, le laboratoire du CBE (surface d'environ 900 m²) dispose sur le même principe de locaux spécifiques à l'activité CNR et de locaux communs à l'ensemble du plateau de microbiologie (incluant la virologie).

Sur le site de la faculté Laennec, le laboratoire d'une surface de 400 m² ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR, car le laboratoire est entièrement consacré à l'étude de la physiopathologie des infections staphylococciques.

Les principaux équipements dont dispose le CNR qu'ils aient été acquis sur des crédits InVS ou qu'il en dispose du fait de la mutualisation, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à un cytomètre de flux (utilisé pour étudier la réponse des cellules aux effets des toxines de staphylocoque), deux appareils PCR temps réels (light cycler), de nombreux thermocycleurs conventionnels, un extracteur d'ADN, des hottes à flux et PSM, des centrifugeuses de différentes capacités, un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des toxines de staphylocoque) et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

2- Activités d'expertise :

2-1- Capacités techniques du CNR

2-1-1- Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

2-1-1-1-Techniques disponibles

Identification des souches

Les souches isolées peuvent être envoyées au CNR pour confirmation ou identification spécialisée. Elles sont identifiées :

- sur des caractères morphologiques des colonies (taille et aspect des colonies, hémolyse, pigmentation, etc),
- sur des caractères biochimiques (catalase, coagulase, résistance à la bacitracine, résistance au composé vibriostatique O/129...) et à l'aide de la galerie ID 32 Staph (bioMérieux[®]),
- sur des caractères génotypiques par PCR de la région intergénique ribosomale 16S – 23S (ITS PCR).

Détection des gènes de toxines : la détermination des profils toxiques se fait par PCR multiplex.

Sont recherchés les gènes codant :

- les entérotoxines (SE*, SEI*) : SEA, SEB, SEC, SED, SEH, SEIK, SEIL, SEIM, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR,
- la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1),
- les exfoliatines A, B, D,
- les toxines synergohyménotropes : lukM, et la leucocidine de Panton Valentine (PVL),
- le facteur EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor) (A-C),
- l'hémolysine bêta.

De plus, nous identifions l'allèle du gène régulateur *agr* « *accessory gene regulator* » et détectons systématiquement le gène de résistance à la méticilline (*mecA*).

NB :

*SE : "Staphylococcal enterotoxin"

*SEI : "Staphylococcal enterotoxin-like", toxine pour laquelle le pouvoir émétisant n'est pas démontré.

La détection des gènes codant SEIM et SEIO signale aussi habituellement la présence des gènes codant SEG, SEI et SEIN car ces gènes sont sur un même élément génétique (locus

egc). De même, la détection du gène codant SED signale habituellement la présence du gène codant SEJ (même plasmide)

Test du CD69

La recherche d'activation lymphocytaire T, caractéristique des superantigènes bactériens, est réalisée notamment lorsqu'une souche de patient isolée dans le cadre de manifestations toxiques ne possède aucun des gènes connus d'entérotoxine. Le test du CD69 permet de détecter la présence de superantigènes dans le surnageant de culture de la souche étudiée et donc de suspecter que la souche produit une nouvelle entérotoxine.

Recherche de lien de clonalité

Le lien de clonalité est recherché par détermination du profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé. En cas de besoin, peuvent être réalisés en plus la détermination du « Sequence type » par multilocus sequence typing (MLST), et la recherche du type de répétition du gène codant la protéine A (*spa* typing).

L'ensemble des résultats analysés à l'aide d'outils informatiques permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline.

Recherche des entérotoxines A-E

En cas d'intoxication alimentaire, les entérotoxines A-E sont recherchées dans les vomissements des patients par une méthode immuno-enzymatique ELISA, RIDASCREEN®.

Recherche de résistance aux antibiotiques

- Détection du gène *mecA*. Le gène de résistance à la méticilline (*mecA*) est recherché par PCR pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative.
- Détection de la résistance aux glycopeptides. Elle est effectuée seulement pour *S. aureus*.

Sont réalisées :

- une CMI vancomycine et teicoplanine par E-test,
- un criblage par E-test avec un inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cerveille.

En cas de criblage positif, une analyse de population est réalisée avec et sans induction sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

La détection du gène *vanA* par PCR n'est effectuée qu'après avis des responsables du CNR.

- Détection de la résistance aux macrolides. La recherche des gènes de résistance aux macrolides est effectuée seulement pour *S. aureus*. Pour cette analyse, le délai de réponse est variable selon le nombre d'expertise demandée.

Caractérisation de la cassette SCCmec.

Le gène de résistance à la pénicilline *mecA* est présent sur une cassette dénommée SCCmec pour "staphylococcal chromosomal cassette" dont la taille est variable. Il existe 5 grands types de cassette, SCCmec I-V. Le type de cassette d'une souche de *S. aureus* résistante à la pénicilline peut être recherché par PCR en utilisant un jeu d'amorces.

2-1-1-2- Techniques développées l'année 2006: brève description (principes, validation) : cf chapitre 2-1-1-3 ci-dessous

2-1-1-3- Techniques en développement : principes et état d'avancement :

Détermination du répertoire V β du TCR des lymphocytes T. Ce test a pour objectif de mettre en évidence *in vivo* la cicatrice immunologique d'un contact entre des toxines superantigéniques de *S. aureus* et les lymphocytes T du patient. Les toxines superantigéniques que sont la TSST-1 et les entérotoxines, sont capables d'induire une activation polyclonale de lymphocytes T spécifique en fonction de leur type V β . Comme ces toxines s'attachent de façon spécifique à certaines régions V β des récepteurs des lymphocytes T, il existe une spécificité entre le type de toxine superantigénique et le type V β des récepteurs des lymphocytes qui sont activés et qui prolifèrent. Il est ainsi possible d'identifier indirectement la toxine responsable du choc toxique par déduction à partir du profil d'amplification des récepteurs V β d'un patient. Par exemple, une expansion des lymphocytes T V β 2 évoque une intoxication par la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1).

Développement d'une technique de dosage immunologique de la leucocidine de Panton Valentine (LPV). Ce test a pour objectif de déterminer de façon quantitative la production de LPV dans un échantillon biologique ou dans le surnageant d'une culture bactérienne. L'objectif médical est de déterminer si certaines souches de *S. aureus* contenant les gènes de la LPV, et notamment les souches à potentiel épidémique comme les C-SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline et d'origine communautaire), sont productrices ou non de quantités élevées de LPV. L'hypothèse est l'existence d'un lien entre

virulence et quantité de PVL exprimée. Cette donnée sera particulièrement utile pour les décideurs à qui l'on demande aujourd'hui de se prononcer sur les mesures préventives à adopter devant la diffusion de certains clones de C-MRSA associée dans certains cas à des cas groupés de décès. Nous émettons l'hypothèse que certaines souches sont potentiellement plus virulentes que d'autres et la mise au point de ce dosage devrait nous permettre de le confirmer. Le test est développé sur un principe ELISA en utilisant un anticorps polyclonal de lapin et un anticorps monoclonal produit en collaboration avec bioMérieux. Ce test a fait l'objet d'un dépôt de brevet conjoint avec bioMérieux. Nous sommes en phase de validation du test et d'ors et déjà nous confirmons qu'il existe une variabilité significative de la production de LPV selon les souches à conditions de culture constante. Par ailleurs, testé sur quelques échantillons biologiques, nous confirmons la présence de la LPV dans les échantillons de patients atteints d'infection par des souche contenant les gènes de la LPV.

Développement d'une technique de détection des superantigènes staphylococciques dans différentes matrices par spectrométrie de masse.

Cette technique est développée en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Garin au CEA de Grenoble. D'importantes homologies de séquence et de structure entre les nombreuses entérotoxines et la TSST-1 ont empêché le développement d'outils immunologiques performants pour leur détection. Actuellement, il n'existe pas de test de diagnostic pour le syndrome de choc staphylococcique. Nous avons développé une méthode de détection, d'identification et de quantification de ces toxines par spectrométrie de masse. L'eau, l'urine et le lait ont été choisis comme matrices. Après une étape de digestion trypsique, la détection par chromatographie liquide et spectrométrie de masse de peptides spécifiques (peptides marqueurs) permet une excellente discrimination de 13 toxines superantigéniques staphylococciques hautement homologues. La sensibilité de détection atteint $4 \cdot 10^{-15}$ moles de toxine/ml d'eau et $0,4 \cdot 10^{-12}$ moles de toxine/ml d'urine. Des expériences sont actuellement en cours pour déterminer la sensibilité de détection dans le lait. Pour quantifier les toxines superantigéniques staphylococciques dans les différentes matrices, nous avons développé et comparé trois méthodes basées sur le principe de la dilution isotopique. La première stratégie de quantification est basée sur l'utilisation de peptides synthétisés chimiquement et correspondant à des analogues isotopiquement marqués des peptides marqueurs des toxines superantigéniques (peptides AQUA). Des quantités connues de peptides AQUA sont additionnés aux échantillons juste avant l'analyse nanoLC-MS (chromatographie liquide nanodébit couplée à la spectrométrie de masse). Comme les

peptides AQUA co-éluent avec les peptides natifs correspondants pendant l'étape de chromatographie liquide, il est possible de quantifier les toxines présentes dans l'échantillon en comparant les signaux MS des peptides natifs et des peptides AQUA correspondants dont on connaît précisément la concentration (ces signaux sont décalés sur le spectre de masse du fait du marquage isotopique). La deuxième stratégie de quantification est basée sur la synthèse d'un gène artificiel codant pour un concatémère de peptides marqueurs de 7 toxines superantigéniques. Ce concatémère, qui a été produit et isotopiquement marqué *in vitro*, est additionné aux échantillons avant la digestion (échantillons d'eau) ou avant l'étape de préfractionnement/décomplexification (échantillons d'urine). La quantification est réalisée, selon le même principe de substitution, sur les signaux MS des peptides natifs et des peptides standards isotopiquement alourdis générés par le concatémère. Enfin, nous avons produit *in vitro* des toxines superantigéniques marquées isotopiquement. Des quantités connues de ces protéines marquées sont ajoutées directement aux échantillons à analyser (eau et urine) avant toute étape de préfractionnement ou de décomplexification. Après traitement biochimique de l'échantillon et analyse nanoLC-MS, nous avons déterminé exactement les quantités de toxines initialement présentes dans les échantillons. Cette méthode de quantification s'avère extrêmement puissante pour la quantification absolue des toxines superantigéniques staphylococciques dans des milieux complexes tels que les liquides biologiques. En effet, elle est la seule qui prend en compte les rendements des étapes de préfractionnement, décomplexification et digestion trypsique. De plus, elle offre la possibilité de quantifier les toxines à partir de plusieurs peptides tryptiques spécifiques ce qui accroît la robustesse des analyses.

2-1-2- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

L'antibiotype, la toxinotypie, le *typage agr*, la caractérisation du type de cassette *SSCmec*, le *spa* typing, le MLST et l'analyse des profils de restriction en champs pulsé sont les principaux marqueurs épidémiologiques disponibles (cf chapitre 2-1-1-1-Techniques disponibles).

2-1-3- Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Le CNR conserve la totalité des souches (congélation à -20 °C) qui lui sont adressées. Il est à même de fournir des souches représentatives des différents clones de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilicine SARM diffusant actuellement en milieu hospitalier (H-SARM) et dans la communauté (C-SARM) (France et Pays étrangers), ainsi que des souches représentatives des différentes pathologies (SARM ou SASM) : pneumonies nécrosantes, choc toxique

staphylococcique, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique, etc. (cf tableau 1 et paragraphe 3.1).

Le CNR conserve également des souches de référence représentant les différents clones et les souches types représentant les différentes espèces de staphylocoques.

2-2- Activités d'expertise de l'année 2006

Au cours de l'année 2006, le CNR a reçu 1200 souches de staphylocoques pour expertise. Mille souches provenaient d'une centaine de villes françaises (environ 110 hôpitaux, 14 LAM) et 200 souches provenaient de 11 pays étrangers ou territoires d'outre-mer (Guadeloupe, Guyane, Nouvelle Calédonie, Tahiti, Grèce, Suisse, Tchéquie, Singapour, Tunisie, Maroc).

Le CNR a distribué 214 souches de ses collections, 88 en France et 214 à l'étranger (Allemagne, Belgique, Canada, Danemark, Grèce, Philippines, Pologne, Royaume Uni, Suisse, Tunisie, USA, Vietnam).

3- Activités de surveillance :

3-1- Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines déclarés en France est relativement stable avec 95 cas en 2006 pour 92 cas en 2005 (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines recensées par le CNR des Staphylocoques de Lyon entre 1994 et 2004 en France.

Année	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc toxique staphylococcique	Scarlatine staphylococcique	Total Syndromes/an
1994	6	5	7	7	25
1995	4	8	14	10	36
1996	6	7	7	12	32
1997	6	7	11	11	35
1998	19	10	20	17	66
1999	20	14	29	15	78
2000	12	23	43	19	97
2001	12	16	25	16	69
2002	25	19	35	29	108
2003	27	18	48	21	114
2004	22	8	32	13	75
2005	21	28	32	11	92
2006	32	20	32	11	95
Total	159	135	271	170	922

L'étude des corrélations clinico-biologiques entre le profil toxinique et la présentation clinique a permis de dégager des informations importantes pour les différents syndromes toxiniques :

Chocs toxiques staphylococciques (TSS) et formes incomplètes.

- 32 cas de TSS ont été rapportés, dont 12 cas de TSS menstruels ce qui est inhabituellement élevé, car 11 cas avaient été recensé entre 2002 et 2004. L'âge des patientes s'étend de 16 à 48 ans avec une moyenne de 26 ans. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. 11 souches possédaient le gène codant la TSST-1 et une seule le gène codant SEB. Aucune des souches responsables des cas menstruelles n'était résistante à la méticilline.

Dans les 20 autres cas, les chocs sont survenus dans les suites de suppurations diverses à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit

d'infections communautaires. L'âge des patientes s'étend de 11 à 86 ans avec une moyenne de 28 ans tandis que le sexe ratio de ces patients est 7/19. Neuf souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 10 autres souches possédaient au moins un gène codant pour une entérotoxines. La dernière souche ne possède pas les gènes codant la TSST-1 ou ceux des entérotoxines actuellement décrites. Cette souche est en cours d'expertise à la recherche d'une nouvelle toxine superantigénique. Ces souches étaient le plus souvent sensibles à la méticilline avec uniquement 4 souches résistantes aux pénicillines M.

- 11 cas de scarlatine staphylococcique (SS) ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 1 à 47 ans avec une moyenne de 11 ans tandis que le sexe ratio est de 7/19. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infection cutanée, pneumonie, pharyngite), communautaires ou nosocomiales. Les autres cas sont survenus à la suite d'infections suppuratives. Six souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 4 autres possédaient au moins un gène codant une entérotoxines. La dernière souche ne possède pas les gènes codant la TSST-1 ou ceux des entérotoxines actuellement décrites. Cette souche est en cours d'expertise à la recherche d'une nouvelle toxine superantigénique. Une seule souche possédait le gène *mecA* codant la résistance à la méticilline dont les caractéristiques génétiques correspondent au clone MRSA nosocomiale prédominant actuellement en France.

Intoxications alimentaires individuelles et collectives.

Le CNR n'a été contacté que pour un cas d'intoxication alimentaire collective en 2006 par la DDASS du Rhône. L'entérotoxine C a été détectée dans le vomi du patient.

Entérocrites à *S. aureus*.

Cinq cas d'entérocrites staphylococciques ont été signalés au CNR en 2006. L'âge des patients s'étend de quelques jours de vie à 56 ans. Seules 4 souches possédaient au moins un gène codant une entérotoxines et deux souches étaient résistantes à la méticilline.

Syndromes d'exfoliation staphylococcique.

Le CNR a analysé les souches provenant de 52 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 32 cas d'exfoliation généralisée (25 en 2002, 27 en 2003, 22 en 2004) et 20 cas d'impétigo bulleux (19 en 2002, 18 en 2003, 8 en 2004). Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

L'âge des patientes ayant présenté une exfoliation généralisée staphylococcique s'étend de quelques jours à 1 à 3 ans et demi avec une moyenne de 1 an et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 14/32. Dix huit souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 7 souches l'ETA seule et 3 souches l'ETB seule. Pour 5 souches, aucun gène codant les exfoliatines n'a été retrouvé. Aucune de ces souches n'était résistante à la méticilline. L'âge des patientes ayant présenté un impétigo bulleux s'étend de quelques jours à 1 à 17 ans avec une moyenne de 3 an et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 11/20. Huit souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 7 souches l'ETA seule et 3 souches l'ETB seule. Pour 2 souches, aucun gène codant les exfoliatines n'a été retrouvé. Aucune des ces souches n'était résistante à la méticilline.

Pneumonies staphylococciques nécrosantes.

Six nouveaux cas de pneumonie nécrosante PVL+ dont 1 cas dus à une souche résistante à la méticilline, ont été diagnostiqués en 2006.

Furonculoses et relation avec la diffusion de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline.

Quarante cinq cas de furonculose chronique ou de cellulites extensives (66 en 2002, 55 en 2003, 48 en 2004) ont été rapportés au CNR.

Tous les autres cas étaient communautaires et se répartissent en deux épidémies intra-familiales, une épidémie au sein des militaires revenant d'une mission en Afrique, l'épidémie du Val d'Oise, et des cas sporadiques. L'âge des patientes s'étale de 3 mois à 56 ans et demi avec une moyenne de 17 ans et demi tandis que le sexe ratio de ces patients est 23/45.

Sur les 45 souches productrices de leucocidine de Panton Valentine, 17 étaient résistantes à la méticilline. Parmi ces 17 souches 10 correspondent

clone européen décrit par le CNR (*agr3*, PVL+ *mecA*+) de CA-MRSA et 7 au clone de « CA-MRSA » décrits aux Etats-Unis (*agr1*, PVL+, *mecA*+).

3-2- Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Soixante dix souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise (Tableau 2). Il s'agit de 63 souches de *S. aureus* et de 6 souches de staphylocoques coagulase négative, une souche de *Klebsiella* identifiée par erreur *S aureus*.

Tableau 2. Origine géographique et nombre de souches de staphylocoques adressés à Lyon en 2006 pour expertises concernant la résistance aux antibiotiques.

Provenance	Nb de Souches	<i>S. aureus</i>	SCN
Angoulême	8	7	1
Annecy	2	2	
Annonay	1	1	
Antibes	8	8	
Arles	3	3	
Belley	1	1	
Briançon	1	1	
Chartres	1	1	
Creil	1	1	
Paris	1	1	
Dreux	1	1	
Giens	5	5	
Grenoble	3	3	
Laval	1	1	
Lyon Autres Hôpitaux	6	5	1
Macon	2	1	1
Metz	1	1	
Montpellier	4	4	
Paris Croix St Simon	1	1	
Perpignan	1	Erreur ident	

Poissy	1	1	
Privas	3	3	
St Claude	1	1	
Selestat	1	1	
Tahiti	2	2	
Thonon	1		1
Toulon	1	1	
Ussel	1		1
Valence	4	4	
Valenciennes	1		1
Vernon	1	1	
Villiers St Denis	2	2	
TOTAL	70	63	6

Le gène de résistance à la méticilline a été recherché par PCR pour 43 de ces souches : 42 *S. aureus* et 1 *S. lugdunensis*

Un résultat a été rendu positif dans 14 cas. Il s'agissait de souches exprimant de façon très hétérogène la résistance à l'oxacilline ou présentant un phénotype de résistance associé incomplet.

Un résultat négatif a été rendu dans 29 cas (1 *S. lugdunensis*). Il s'agissait de souches sensibles à tous les antibiotiques mais pour lesquelles la demande de vérification était faite conformément aux recommandations du CA-SFM, car le diamètre de la cefoxitine était compris entre 24 et 26 mm, de souches multirésistantes aux antibiotiques, de souches résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones ou macrolides. Ces profils de résistance inhabituels faisaient demander une confirmation de l'absence de gène de résistance à la méticilline.

Pour l'hôpital associé au CNR (HEH) , 28 demandes de recherche du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été faites pour des phénotypes associés inhabituels : 12 se sont avérées positives et 16 négatives.

Détection de souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

L'étude a été demandée pour 22 souches de laboratoires extérieurs, qui avaient un screening positif,

Pour chaque souche ont été réalisés :

- un screening avec des bandelettes E-Test (vancomycine et teicoplanine) et un inoculum lourd,
- une analyse de population sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine, après induction par 2 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population en cascade sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

Pour les laboratoires extérieurs 11 souches ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides, il s'agissait principalement de souches hétérogènes, inductibles en présence de glycopeptides (souches hGISA), 5 souches étaient sensibles aux glycopeptides.

L'étude n'a pu être effectuée pour 6 souches : 3 souches cultivant seulement sur gélose chocolat+PVX incubée sous CO₂, conditions qui ne permettent pas d'utiliser la technique de détection, 3 souches faussement identifiées *S. aureus* : 2 staphylocoques à coagulase négative et la souche de *Klebsiella*.

Etudes de CMI. Les CMI de la teicoplanine ont été demandées pour 3 souches de staphylocoques à coagulase négative.

Protocoles. A la demande des laboratoires Aguettant le CNR a étudié l'activité *in vitro* de génériques de teicoplanine sur 96 souches de *S. aureus*, de staphylocoques à coagulase négative de streptocoques et d'entérocoques en comparaison avec la teicoplanine *princeps*. Les CMI ont été déterminées par dilution en milieu gélosé de Mueller Hinton.

3-3- Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Brève description des événements détectés et investigués notamment nosocomiaux en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise...)

Au cours de l'année 2006 le CNR a investigué 12 cas groupés d'infection ou épidémies. L'analyse des profils de restriction de l'ADN des souches après électrophorèse en champ

pulsé associés ou non au toxinotype, au type d'allèle *agr* et à l'antibiogramme a permis de mettre d'évaluer le lien de clonalité des souches isolées dans les contextes suivants :

- une épidémie de furonculoses chez des militaires revenant de missions en Afrique (et parfois les membres de leur famille). Vingt trois souches (20 prélèvements de nez et 3 de lésions) ont été expertisées. Ces souches productrices de LPV et résistantes à la pénicilline et à la tétracycline appartenaient aux deux clones principaux déjà détectés en 2005 (début épidémie). 18 souches étaient du clone *agr2*, PVL+ et *egc+*, 1 souche était *agr3*, positive pour LPV et les entérotoxines A, H, et K. Quatre souches ne produisaient pas de LPV.
- une épidémie de furonculoses chez des enfants d'une école du Val d'oise. Le CNR a analysé 32 souches (24 souches issues d'un dépistage chez les enfants, leur famille et personnel de l'école et 8 souches de lésions). Quatorze souches (6 lésions et 8 nez) étaient productrices de PVL et résistantes à la pénicilline et à la lincomycine. Ces souches présentaient un allèle *agr* de type 3 et produisaient l'*egc*. Par la suite, le phénotype PeniR, LincoR, aisément reconnaissable a été assimilé à la souche LPV+ sans recherche systématique du gène *luk-PV*
- 9 cas groupés survenus dans différents hôpitaux
- 3 cas familiaux
- 7 expertises d'isolats provenant de patient unique (plusieurs isolats dans un temps < 3 mois ou plusieurs épisodes à > 3 mois d'intervalle)

3-4- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches...)

Protocole EARSS : Protocole d'identification des clones de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections invasives en Europe.

Cette étude s'insère dans le cadre de surveillance européenne EARSS, qui associe, depuis 2001, pour les SARM, les laboratoires de l'ONERBA, l'InVS et le Centre National de Référence (CNR) des Staphylocoques. Vingt deux laboratoires (Centres Hospitaliers) répartis sur les différentes régions de France ont été sélectionnés de manière aléatoire par l'InVS. L'étude est limitée au niveau européen à 200 souches par pays.

Il était demandé aux laboratoires de sélectionner et d'envoyer au CNR 5 souches consécutives de *S. aureus* sensibles à la méticilline et 5 souches consécutives de *S. aureus* résistantes à la méticilline, isolées d'infections invasives entre le 1^{er} septembre 2006 et le 28 février 2007.

Les analyses effectuées par le CNR sur les souches étaient :

- le typage par séquençage du gène de la protéine A (*spa* typing). Les résultats du typage de la protéine A seront centralisés quant à eux, au niveau européen (EARSS / SeqNet.org).
- le profil toxinique,
- la détection de la présence du gène *mecA*,
- le fond génétique de la souche (Type *agr*).

Les premiers résultats ont permis de montrer que 68% des SARM français correspondaient au clone décrit par le CNR et dénommé le clone Lyon. Ce clone est résistant à la kanamycine, tobramycine et aux fluoroquinolones. Un clone minoritaire de SARM a été identifié qui représente 21% des souches. Ce clone *agr 2* s'apparente au clone pédiatrique et inclut les souches de SARM contenant les gènes du choc toxique staphylococcique (clone décrit par notre équipe). Ce clone a une diffusion au sud-est et au nord de la France. Cinq singletons de SARM ont été identifiés, dont 3 souches contenant les gènes de la leucocidine de Panton Valentine. Les fonds génétiques des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline différaient de ceux des souches de SARM, sauf pour le clone SARM *agr2*.

3-5- Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3-5-1- Etude des facteurs associés à la mortalité des pneumonies nécrosantes à *S.aureus* producteurs de la leucocidine de Panton Valentine.

L'analyse de la première série de cas de pneumonie nécrosante publiée en 2002 (16 cas et 36 contrôles) montrait que la leucopénie et l'hémoptysie étaient des facteurs significativement associés aux cas. En revanche, la petitesse de l'échantillon ne permettait pas de reconnaître les facteurs significativement associés à la mortalité. Depuis 2002, Yves Gillet a continué de colliger les observations de pneumonies nécrosantes et la base de données comporte actuellement plus de 50 observations complètes. Un travail d'analyse de cette base de données a été réalisé en collaboration avec des épidémiologistes et des statisticiens (Ph Vanhems, Hôpital Edouard Herriot, Lyon). Les résultats confirment que l'hémoptysie et la leucopénie sont significativement associées aux décès ; l'analyse multivariée révèle que le facteur majeur associé à la mortalité est la leucopénie avec un risque relatif de décès augmenté d'un facteur 7 chez les sujets dont le taux de leucocytes à l'admission est compris entre 0 et 3 Giga/L. Ainsi, à l'avenir, le seuil de 3 Giga/L pourrait être retenu pour administrer aux patients des traitements adjuvants utilisant de nouvelles voies

thérapeutiques (anticorps,..). Ces résultats sont en cours de publication dans la revue Clin. Infect. Dis.

3-5-2- Protocole Dermatologie (Pascal del Giudice, Alexis de Rougemont, Frejus/Antibes)
Protocole en cours depuis 2001. Etude prospective des cas d'infections cutanées et des tissus mous dues aux SARM et SASM en lien avec le Dr. P Del Giudice (service de dermatologie de l'Hôpital de Fréjus). Cent neuf de souches ont été reçues entre 2003 et 2006 et expertisées par le CNR. La moyenne d'âge des patients était de 35 ans, avec un sex ratio de 1.94. Vingt six pour cent des souches étaient résistantes à la méticilline, la majorité de souches contenant les gènes de la leucocidine de Panton Valentine ; dans de rares cas il s'agissait du clone de SARM hospitalier. Une publication est prévue pour 2007.

4- Alerte :

Des rapports très fluides et très directs avec nos partenaires de l'InVS rendent les procédures d'alerte simples, rapides et efficaces. Le téléphone et le courrier électronique sont utilisés en priorité. La dernière alerte directe auprès de l'InVS concerne une épidémie de furunculoses chez des enfants d'une école du Val d'oise, épidémie qui a pu être ensuite prise en charge par les équipes de terrain, la DDASS et l'InVS

5- Activités d'information, de formation et de conseil :

- Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires,

Ont été accueillis les stagiaires suivants : Mouna Ben Noujma de Tunisie pendant 3 mois, Vassiliki Chini de Grèce pendant un mois (cette stagiaire avait reçu une bourse de l'ESCMID).

- Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)
- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :
 - o Rétro-information aux partenaires
 - o Diffusion aux professionnels : conférences, Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR%5Fstaphylocoques/>)

qui présente notamment les activités du CNR, le mode de fonctionnement, les modalités d'envois, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter.

- Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...). Les demandes sont gérées à travers un staff hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce staff permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel. En cas d'urgence des réunions de concertation sont organisées sans délais.
- Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...). J. Etienne a été contacté par Peet Tüll de l'ECDC pour participer à une réunion européenne sur les SARM communautaires. J. Etienne a été élu au niveau européen avec 4 autres microbiologistes du réseau EARSS pour orienter les projets portant sur les staphylocoques.

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

Les personnels du CNR appartiennent pour la plupart à l'équipe de recherche INSERM thématisée sur les staphylocoques. Il existe donc un continuum entre la recherche fondamentale, la recherche clinique et la recherche transitionnelle, l'activité de CNR étant située plutôt sur le versant clinique, finalisé, de ces recherches.

L'équipe INSERM est dirigée par F. Vandenesch et J. Etienne. Formation mono-thématique jusqu'en 2006 (INSERM E0230, Dir F. Vandenesch), l'équipe est intégrée depuis le 1 janvier 2007 dans une formation de 9 équipes (INSERM U851, Dir J. Marvel) qui réunit des équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes. Notre objectif général de recherche est une approche globale des maladies staphylococciques et nos recherches relèvent :

A- de la microbiologie clinique, de l'épidémiologie moléculaire des staphylocoques et des caractéristiques cliniques des infections, en s'appuyant très fortement sur le CNR des Staphylocoques (notamment grace aux réseaux de collaborations et aux bibliothèques du CNR).

B- de la physiopathologie des maladies staphylococciques et des perspectives thérapeutiques : (a) physiopathologie des lésions observées dans les maladies associées à la leucocidine de Panton Valentine, en particulier la pneumonie nécrosante pour laquelle nous avons démontré le rôle pro-apoptotique de la LPV, le rôle dysrégulateur global de cette toxine sur l'expression des autres facteurs de virulence de *S. aureus* et le rôle causal dans la constitution des lésions chez l'animal ; (b) physiopathologie des maladies associées aux superantigènes staphylococciques (SAG), incluant : (b1) l'étude des capacités immunomodulatrices des SAG dans les maladies non toxiques (suppurations superficielles et profondes, bactériémies) ainsi que dans l'induction de la tolérance immunitaire (étude de l'action des SAG sur les Treg) ; (b2) le rôle potentiel de certains SAG (codés par l'enterotoxin gene cluster) dans la stimulation de l'immunité anti-tumorale.

C- d'une recherche plus fondamentale sur l'étude des relations structure-fonction de l'ARNIII (ARN régulateur de l'expression de la virulence), par l'identification des différents domaines régulateurs de cette molécule ainsi que des co-facteurs protéiques (Hfq, ribonucléase,..) qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes cibles (gènes de virulence et gènes métaboliques).

7- Liste des publications et communications

7-1- Livres et éditions scientifiques

Ferry T., Perpoint T., Mohammedi I., Descloux E., Vandenesch F., Etienne J. Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* et pronostic des infections staphylococciques sévères. Actualités en réanimation et urgences en 2006. Ed. Elsevier (ISSN 1297-4749-ARU2) :193-208.

Lina G., Vandenesch F., and Etienne J. 2006. A brief history of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leucocidin, In : V. L. Yu Ed. <http://www.antimicrobe.org>. ESun Technologies, LLC, Pittsburgh, PA.

7-2- Publications internationales (entre le 1^{er} janvier 2006 et avril 2007)

Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Apr;51(4):1515-9. Epub 2007 Jan 22.

Chiquet C, Pechinot A, Creuzot-Garcher C, Benito Y, Croize J, Boisset S, Romanet JP, Lina G, Vandenesch F. Acute postoperative endophthalmitis caused by *Staphylococcus lugdunensis*. J Clin Microbiol. 2007 Mar 28; [Epub ahead of print]

Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, Fattom AI, Etienne J. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):725-9. Epub 2007 Jan 3.

Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Hook M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science. 2007 Feb 23;315(5815):1130-3. Epub 2007 Jan 18.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jan;51(1):264-74. Epub 2006 Oct 16.

Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy. 2007;93:24-41.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J Infect Dis. 2006 Dec 15;194(12):1761-70. Epub 2006 Nov 2.

Lina G, Durand G, Berchiche C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Enright MC. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from ccr gene complex sequence typing analysis. Clin Microbiol Infect. 2006 Dec;12(12):1175-84.

Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Hook M, Recker M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? Nat Rev Microbiol. 2006 Dec;4(12):953-8. Review.

Regev-Yochay G, Carmeli Y, Raz M, Pinco E, Etienne J, Leavitt A, Rubinstein E, Navon-Venezia S. Prevalence and genetic relatedness of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Israel. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006 Nov;25(11):719-22.

Lescure FX, Locher G, Eveillard M, Biendo M, Van Agt S, Le Loup G, Douadi Y, Ganry O, Vandenesch F, Eb F, Schmit JL, Etienne J. community-acquired infection with healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of home nursing care. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006 Nov;27(11):1213-8. Epub 2006 Oct 20.

Huber F, Leaute-Labreze C, Lina G, Sarlangue J, Taieb A, Boralevi F. Multiple neonatal staphylococcal cold abscesses of the large folds. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2006 Nov;20(10):1197-200.

Mohammedi I, Malhiere S, Robert D, Charveriat MA, Etienne J. Linezolid therapy of bloodborne teicoplanin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Infection. 2006 Oct;34(5):292-3.

Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, Debard AL, Badiou C, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. J Leukoc Biol. 2006 Oct;80(4):753-8. Epub 2006 Aug 2.

Moumile K, Cadilhac C, Lina G, Berche P, Glorion C, Ferroni A. Severe osteoarticular infection associated with Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Sep;56(1):95-7. Epub 2006 May 4.

Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun. 2006 Aug;74(8):4724-34. Erratum in: Infect Immun. 2007 Apr;75(4):2088.

Batissou M, Strazielle N, Hejmadi M, Thomas D, Gherzi-Egea JF, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Toxic shock syndrome toxin-1 challenges the neuroprotective functions of the choroidal epithelium and induces neurotoxicity. J Infect Dis. 2006 Aug 1;194(3):341-9. Epub 2006 Jun 30.

Ferry T, Bes M, Dauwalder O, Meugnier H, Lina G, Forey F, Vandenesch F, Etienne J. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2642-4.

Terman DS, Bohach G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Sahn SA. Staphylococcal superantigens of the enterotoxin gene cluster (egc) for treatment of stage IIIb non-small cell lung cancer with pleural effusion. Clin Chest Med. 2006 Jun;27(2):321-34. Review.

Yamasaki O, Tristan A, Yamaguchi T, Sugai M, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of the exfoliative toxin D gene in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in France. Clin Microbiol Infect. 2006 Jun;12(6):585-8.

Francois P, Koessler T, Huyghe A, Harbarth S, Bento M, Lew D, Etienne J, Pittet D, Schrenzel J. Rapid *Staphylococcus aureus* agr type determination by a novel multiplex real-time quantitative PCR assay. J Clin Microbiol. 2006 May;44(5):1892-5.

van Belkum A, Melles DC, Snijders SV, van Leeuwen WB, Wertheim HF, Nouwen JL, Verbrugh HA, Etienne J. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, egc, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1555-7.

Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Mar;50(3):1083-5.

Garnier F, Tristan A, Francois B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, Liassine N, Wannet W, Denis F, Ploy MC. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. Emerg Infect Dis. 2006 Mar;12(3):498-500.

Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, Wenger A, Kikuchi K, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):847-53. Erratum in: J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):3053.

Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FC, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. J Clin Microbiol. 2006 Feb;44(2):619-21.

Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, Bes M, Martinez JP, Counillon E, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. Br J Dermatol. 2006 Jan;154(1):118-24.

Salliot C, Zeller V, Puechal X, Manceron V, Sire S, Varache N, Etienne J, Desplaces N, Ziza JM. Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: report of 4 French cases. Scand J Infect Dis. 2006;38(3):192-5.

7-3- Communications nationales

Liassine N., Etienne J., Decosterd F. Evaluation du kit IDI-MRSA sur une collection de souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline d'acquisition communautaire et sur des prélèvements de portage 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 7-8 décembre 2006 à Paris.

Mayor L., Ortellado J., Menacho C., Lird G., Courtier C., Gardon C., Meugnier H., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Hospital de Clinicas in Asuncion (Paraguay) 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 7-8 décembre 2006 à Paris.

Meugnier H., Reverdy M.E., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. Perte de la résistance aux macrolides du clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline majoritaire diffusant à Lyon (clone Lyon) 26ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse RICAI 7-8 décembre 2006 à Paris.

7-4- Communications internationales

Hocqueloux K., Niang M., Martin L., Aumaitre J-F., Vaur J-L, Etienne J., Poisson D-M. Eradication in one patient, by rifamycin-linezolid, of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin, responsible for 7 relapses over 18 months, and decolonisation of her family by mupirocin. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice – France, 1-4 Avril 2006.

Thomas D., Perpoint T., Ferry T., Cozon G., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. Diagnosis of menstrual and nonmenstrual Staphylococcal toxin shock syndrome by early analysis of the Vbeta repertoire of T cells 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Karauezuem H., Ferry T., Etienne J., Landmann R. Comparison of virulence of MRSA Lyon Clone and MSSA isolates from patients with bloodstream infection in a local and systemic murine infection 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Mayor L., Ortellado J., Menacho C., Lird G., Courtier C., Gardon C., Meugnier H., Bes M., Vandenesch F., Etienne J. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Hospital de Clinicas in Asuncion (Paraguay). 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Ferry T., Thomas D., Lina G., G. Monneret, F. Vandenesch, J. Etienne In vitro analysis by flow cytometry of the production of superantigenic toxins *S. aureus* isolates responsible for septic shock. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Couzon F., Labandeira-Rey M., Boisset S., Benito Y., Badiou C., Bes M., Höök M., Etienne J., Bowden M.G., Vandenesch F. Regulation of protein synthesis by the *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Tristan A., Benito Y., De Bentzmann S., Lina G., Höök M., Etienne J., Bowden M.G., Vandenesch F. The signal peptide of Panton Valentine leucocidine *LukS* component induces increased adhesion to collagen I and IV laminin and elastin in *Staphylococcus aureus*. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

Batissou M., Strazielle N., Hejmadi M., Thomas D., Ghersi-Egea F., Etienne J., Vandenesch F., Lina G. Toxic shock syndrome toxin 1 challenges the neuroprotective functions of the choroidal epithelium and induces neurotoxicity. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections Maastricht – The Netherlands 3-6 September 2006

7-5- Conférences sur invitation

Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: Evidence for the role of Panton Valentine leukocidin. Seventh Annual NARSA Meeting , March 6-7, 2006, Bethesda, Maryland, Etats-Unis.

The biology of Panton Valentine leukocidin. Conférence invité le 22 juin 2006. Inst. f. Med. Mikrobiologie, Domagkstr. Münster, Allemagne.

Clinic and physiopathology of PVL associated diseases: The perils of PVL - more than just a pore. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, 3 - 6 September 2006, Maastricht, The Netherlands

Etienne J. The current situation of community-acquired MRSA in Europe. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice – France, 1-4 Avril 2006.

Etienne J. Community-acquired MRSA: Hands-on prevention and treatment. Meet the expert session. 12th International Congress on Infectious Diseases. Lisbonne, 15-18 Juin 2006.

Etienne J., Tristan A., Durand G., Bes M., Meugnier H., Forey F., Lina G, Vandenesch F., Beyond institutions: MRSA in the community. Clonal epidemiology worldwide. 12th International Congress on Infectious Diseases Lisbonne, 15-18 Juin 2006,

Etienne J., Epidemiology of toxin-producing MRSA strains, an emerging threat. 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Maastricht – The Netherlands 3-6 Septembre 2006

Etienne J. Virulence of CA-MRSA Versus HA-MRSA Versus MSSA. Sixth International Conference of the Hospital Infection Society. 15th-18th October 2006 Amsterdam – the Netherlands.

Etienne J. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. 28th Annual Infectious Diseases Symposium. Zurich – Suisse, le 16 mars 2006.

Etienne J. Le staphylocoque en 2006 : facteurs de virulence et pronostic. 34^{ème} Congrès de la Société de Réanimation de la Langue Française, Paris le 18-20 janvier 2006.

Etienne J. Le développement des SARM en ville a-t-il un impact sur l'épidémiologie hospitalière ? 34^{ème} Congrès de la Société de Réanimation de la Langue Française, Paris le 18-20 janvier 2006.

Etienne J. Toxines et chocs à Staphylocoques Actualités en Réanimation Sepsis sévère – choc septique (21-22 novembre 2006 – Lyon).

7-6- Brevets

Badiou C, Battail-Poirot N, Etienne J., Lina G, Ratat C. Procédé de diagnostic *in vitro* des *Staphylococcus aureus* producteurs de PVL anticorps monoclonaux et kits de diagnostic. Brevet n° FR0654336 déposée le 28 octobre 2006.

8- Programme d'activité N+1 et N+2

Fournir les perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N+1 sur la base du présent rapport et du programme quadriennal proposé en 2005 pour les années 2006-2009.

Le programme d'activité pour l'année 2007 est dans la lignée des travaux 2006 et en accord

avec le programme d'activité 2006-2009. L'accent sera mis sur la communication avec un enrichissement de notre site internet, l'optimisation du fonctionnement permise par le regroupement sur le nouveau site du Centre de Biologie Est de l'ensemble des personnels du CNR, le renforcement des réseaux en particulier européens, la poursuite du développement des capacités techniques du CNR, la poursuite des activités de recherche situées à l'interface de la clinique et du fondamental.

Les études épidémiologiques amorcées en 2006 seront terminées, comme par exemple celle menée au sein du réseau EARSS. Les souches de SARM collectées seront plus extensivement caractérisées pour décrire complètement les clones diffusant en France. Cette étude pourra être répétée dans quelques années de façon identique, pour connaître l'évolution de cette diffusion des clones dans le temps. Le but de ce travail est d'avoir une épidémiologie descriptive des SARM français qui soit dynamique dans le temps.

Il est important de mettre en place d'autres études surveillant l'incidence des SARM communautaires contenant les gènes de la leucocidine de Panton Valentine. Une approche intéressante est de choisir comme dénominateur les abcès des infections communautaires des services d'urgence des hôpitaux et de détecter dans cette population les souches de SARM contenant les gènes de cette toxine. Il est apparu que les abcès sont la pathologie la plus fréquemment associée aux SARM communautaires. Ces souches sont rarement invasives et sont rarement isolées des hémocultures.

Un travail sera terminé en 2007 sur la réponse sérologique des cas infectés par des souches de *Staphylococcus aureus* sécrétrices de la leucocidine de Panton Valentine. Il existe une importante controverse dans la littérature sur le rôle de cette toxine dans la physiopathologie des infections. Les anticorps développés contre la leucocidine de Panton Valentine sont recherchés par une technique Elisa. Les résultats des cas seront comparés à ceux des témoins constitués de patients infectés par *S. aureus* non sécréteur de cette toxine et de patients infectés par d'autres bactéries. De même, nous avons commencé en 2007 une étude quantifiant directement la leucocidine de Panton Valentine dans les pus, pour démontrer sa production lors des infections cliniques. A terme toutes ces études ont pour finalité de proposer de nouveaux outils thérapeutiques pour bloquer l'expression de la leucocidine de Panton Valentine si celle-ci a un rôle démontré dans la physiopathologie des infections.

Un intérêt particulier va être développé pour les surinfections de varicelle par *Staphylococcus aureus*. En effet, les souches de *S. aureus* associées à cette pathologie nous sont fréquemment adressées. Elles contiennent fréquemment des gènes de toxines (leucocidine de Panton Valentine, exfoliatines, toxine du choc toxique staphylococcique, etc.) et la

fréquence de la résistance à la méticilline est d'environ 20%. Il nous est nécessaire de compléter l'analyse de 50 cas sélectionnés en précisant les données cliniques de ces surinfections de varicelle. Dans ce sens, un groupe de travail a été établi avec les pédiatres (Prof. Floret et Dr Y. Gillet).

Une collaboration étroite continuera d'être développée avec nos collègues de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger (Prof. Tazir, Dr. Ramdani). La fréquence des SARM communautaires est considérable en Algérie. Nous avons reçu plus de 120 souches de *S. aureus* en 2007 en deux personnes algériennes doivent être formées par le CNR pour leur apprendre à caractériser les fonds génétiques des souches et déterminer leur profil toxinique.
