



**INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE**

Rapport d'activité du CNR des staphylocoques 2011

**Pr François Vandenesch
Dr Frédéric Laurent
Dr Anne Tristan**

Table des matières

1. Introduction	3
11. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation	3
12. Résumé des activités de l'année 2011 : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte	4
13. Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR	5
131. Fonction, ETP, qualification organisme payeur	5
132. Organigramme	7
133. Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programme, accréditation, certification	7
1331. L'enjeu de l'accréditation	7
1332. Structure qualité du laboratoire	8
1333. Manuel qualité	8
1334. Audit et formation qualité.....	9
1335. Contrôles qualité	9
14. Locaux et équipements	10
141. Surface, plan	10
142. Principaux équipements.....	11
2. Activité d'expertise	12
21. Capacités techniques du CNR	12
211. Liste des techniques de référence : diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux	12
2111. Techniques disponibles :	12
2112. Techniques développées en 2011	22
2113. Techniques en développement : principes et état d'avancement.....	30
212. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles	31
213. Collections de matériels biologiques :	31
214. Activités portant sur des agents de la menace et dans le cadre du réseau national des laboratoires Biotox	32
215. Liste des techniques :	33
2151. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses :	33
22. Activité d'expertise de l'année 2011	34
221. Décrire le nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...)	34
222. Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	35
223. Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués	35
3. Activités de surveillance	35
31. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	35
311. Réseau de partenaires :	35
312. Evaluation et caractéristiques des infections	35
3121. Données générales	35
3122. Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique	37
3123. Syndromes d'exfoliation staphylococcique.....	41
3124. Infections cutanées à <i>S. aureus</i>	42
3125. Furunculoses Familiales	44
3126. Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Pantón Valentine	44
3127. Intoxications alimentaires individuelles et collectives	46

3128. Ostéites et infections ostéo-articulaires	46
313. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS	47
314. Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement	48
32. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	49
321. Données globales	49
322. Recherche ou confirmation du gène <i>mecA</i>	51
323. Détection de souches de <i>S. aureus</i> de sensibilité diminuée aux glycopeptides.....	52
324. Recherche de résistance à d'autres antibiotiques	53
325. Résistance au linézolide	53
326. Recherche du variant du gène <i>mecA</i>	53
33. Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux.....	56
331. Investigation d'épidémies.....	56
332. Recherche de liens de clonalité	57
333. Caractérisation de nouveaux clones et formes cliniques spécifiques.....	60
3331. Caractérisation de nouveaux clones.....	60
3332. Caractérisation de souches responsables de formes cliniques spécifiques.....	61
334. Alerte variant du gène <i>mecA</i>	64
34. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (lister les réseaux auxquels le CNR et ses labo associés participent et leur contribution (expertise, envoi de souches, de données...))	65
35. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	70
4. Alerte.....	78
5. Activités d'information, de formation et de conseil :.....	79
51. Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires, ...	79
52. Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	80
53. Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :	80
54. Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)	82
55. Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...).....	83
6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR	84
7. Liste des publications et communications.....	91
71. Publications nationales	91
72. Publications internationales.....	91
73. Revues pour site internet.....	94
74. Communications nationales	94
741. Communications orales nationales	94
742. Communications affichées nationales	95
75. Communications internationales.....	97
751. Communications orales internationales.....	97
752. Communications affichées internationales	97
76. Conférences sur invitation	99
761. Conférences orales sur invitation nationales	99
762. Conférences orales sur invitation internationales.....	100
8. Programme d'activité N+1 et N+2.....	100
Annexes	103

1. Introduction

11. 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

111. Apporter une expertise microbiologique :

- développer et diffuser des techniques de typage moléculaire,
- identifier et typer les souches responsables de formes cliniques inhabituelles et les souches multi-résistantes de diffusion clonale et caractériser leurs toxines,
- rechercher et caractériser les toxines dans les prélèvements cliniques, dans le cadre de l'investigation de toxi-infections alimentaires ou d'autres cas groupés,
- identifier de nouveaux génotypes de résistance aux anti-infectieux et caractériser les mécanismes de résistance en lien 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 la résistance aux glycopeptides chez les staphylocoques (méthodes standardisées et accessibles à tous les laboratoires), en assurer la diffusion et développer un contrôle de qualité.

112. Contribuer à la surveillance épidémiologique des infections et toxémies staphylococciques en lien avec l'Institut de veille sanitaire :

- en renforçant les collaborations avec les réseaux des laboratoires hospitaliers de microbiologie, notamment pour les souches responsables d'infections nosocomiales,
- en développant un partenariat avec des réseaux de laboratoires de biologie médicale pour la surveillance de l'émergence de clones responsables d'infections en ville,
- en participant à l'investigation des cas groupés d'infections staphylococciques,
- en collaborant avec les réseaux de surveillance européens et internationaux.

113. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : émergence d'un nouveau phénotype de résistance aux antibiotiques ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), émergence de souches à virulence particulière, détection de cas groupés, etc.

114. Contribuer aux travaux du réseau national des laboratoires Biotox :

- apporter son expertise spécifique au service des instances concernées de santé publique, de défense et de sécurité nationale ;
- contribuer avec les instances chargées de leur pilotage, à l'animation du réseau des laboratoires Biotox ;
- contribuer à la mise en place d'une collection nationale de souches des agents de la menace pour les besoins de la biodéfense.

12. Résumé des activités de l'année 2011 : faits marquants, points clefs, contexte, principaux résultats de contribution à la surveillance et à l'alerte.

L'année 2011 a été marquée par :

- Une expertise par le CNR de 3022 souches de staphylocoques, activité en augmentation constante par rapport aux années antérieures ; 1359 pour expertise toxinique et recherche de résistance aux antibiotiques provenant principalement d'une centaine de villes françaises et 1663 dans le cadre de protocoles provenant de France et de différents pays étrangers,
- La distribution de 268 souches de staphylocoques de collection dont 146 souches à des laboratoires français et 122 souches à des laboratoires étrangers.

Le CNR a continué à caractériser les grands syndromes toxiques staphylococciques et prouvé sa réactivité face aux phénomènes émergents :

- l'apparition du nouveau variant du gène *mecA* de résistance à la méticilline (*mecA_{LGA251}*, maintenant désigné *mecC*) pour lequel le CNR a immédiatement lancé une enquête nationale visant à identifier l'ampleur de la diffusion en France de cette résistance et la performance des outils de diagnostic microbiologique pour détecter correctement cette résistance

- une photographie précise de l'épidémiologie des *S. aureus* responsables d'infections invasives en France, en référence à l'épidémiologie européenne, à travers la participation du CNR à l'enquête européenne EARSS. Cette photographie révèle que depuis 2006 le clone Lyon, ST8-IV reste majoritaire parmi les SARM.

- une meilleure appréhension de la prévalence des SARM communautaires dans les infections sévères de type pneumonie nécrosante à travers les premiers chiffres de l'enquête nationale portée par un PHRC. Cette enquête révèle une prévalence d'environ 26% des

SARM communautaires PVL positifs dans cette maladie, chiffre très au dessus de la prévalence rapportée des souches PVL+ dans les souches communautaires tout venant. Ce résultat suggère de prendre en compte le risque de résistance à la méticilline dans le traitement probabiliste des pneumonies communautaires sévères à *S. aureus*.

Le CNR a poursuivi ses activités de participation à de nombreux réseaux, y compris en lien avec le monde vétérinaire ; il a mis au point ou évalué plusieurs outils de diagnostic microbiologique conventionnel, moléculaire ou protéomique ; enfin, ses activités de recherche fondamentale, translationnelle et clinique ont donné lieu à de nombreuses communications et publications nationales et internationales.

13. Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

Sur le plan humain, le laboratoire de Bactériologie du CBPE emploie 81 personnes (16 biologistes, 4 ingénieurs, 4 secrétaires, 2 cadres, 51 techniciens, 3 OP bio) réparties dans les 3 secteurs du laboratoire : la bactériologie conventionnelle, le diagnostic moléculaire et les CNR. Comme l'indique l'organigramme fonctionnel ci-dessous, nombre de personnels émargent à plusieurs domaines fonctionnels du laboratoire ; c'est le cas de la majorité des biologistes qui consacrent une partie de leur temps aux activités des CNR.

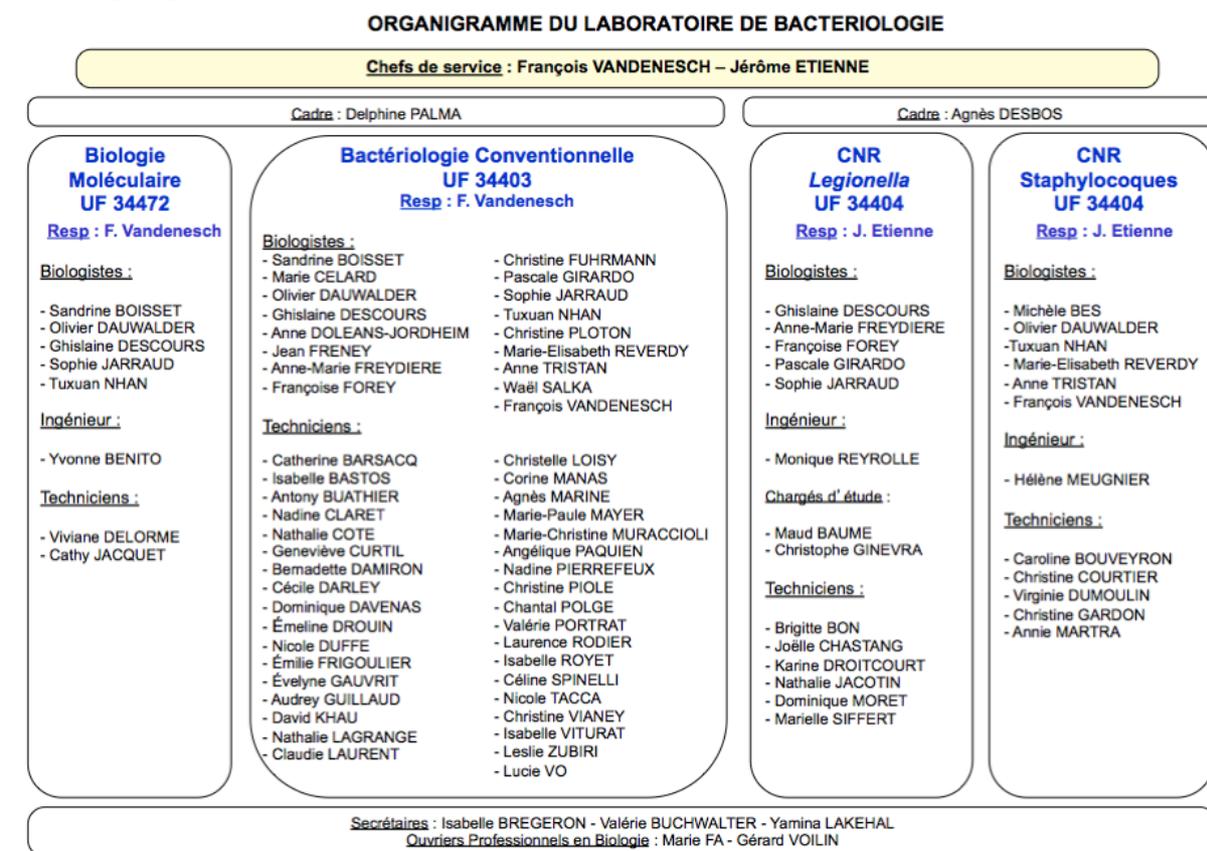
131. Fonction, ETP, qualification organisme payeur

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

Personnels consacrant une part de leur activité au CNR	
François Vandenesch – directeur Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 35 72 52 ou 04 78 77 86 57 E-mail : francois.vandenesch@univ-lyon1.fr
Frédéric Laurent – directeur adjoint Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Nord Maître de Conférence- Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 18 39 E-mail : frederic.laurent@univ-lyon1.fr
Anne Tristan – directrice adjointe Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférence- Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 35 76 39 E-mail : anne.tristan@univ-lyon1.fr
Jérôme Etienne (épidémiologie)	Tél : 04 72 12 96 24 ou 04 78 77 86 57

Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Lyon Est	E-mail : jerome.tienne@univ-lyon1.fr
Gérard Lina (virulence) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Sud Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	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 – Hôpital Femme Mère Enfant	Tél : 04 27 85 56 07 E-mail : yves.gillet@chu-lyon.fr
Marie-Elisabeth Reverdy (antibiotiques) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 66 E-mail : marie-elisabeth.reverdy@chu-lyon.fr
Michèle Bes (identification - marqueurs) Biologiste contractuel - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 62 E-mail : michele.bes@chu-lyon.fr
Sandrine Boisset (webmaster) Praticien attaché - Centre de Biologie Est Chercheur INSERM contractuel	Tél : 04 72 12 96 64 E-mail : sandrine.boisset@univ-lyon1.fr
Olivier Dauwalder (réponse immune) Praticien Hospitalier Contractuel– Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 69 E-mail : olivier.dauwalder@chu-lyon.fr
Oana Dumitrescu (virulence) Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Sud	Tél : 04 72 12 96 25 E-mail : oana.dumitrescu@chu-lyon.fr
Tuxuan Nhan Assistante hospitalo-universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 25 E-mail : tuxuan.nhan@chu-lyon.fr
Hélène Meugnier (typage) Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 80 E-mail : helene.meugnier@chu-lyon.fr
Florence Couzon (physiopathologie) Ingénieur – U851, Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 78 77 86 57 E-mail : florence.couzon@univ-lyon1.fr
Cédric Badiou (physiopathologie) Ingénieur – U851, Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 78 77 86 57 E-mail : cedric.badiou@univ-lyon1.fr
Techniciennes	
Christine Gardon Christine Courtier Annie Martra Caroline Bouveyron Virginie Dumoulin	

132. Organigramme



133. Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programme, accréditation, certification...

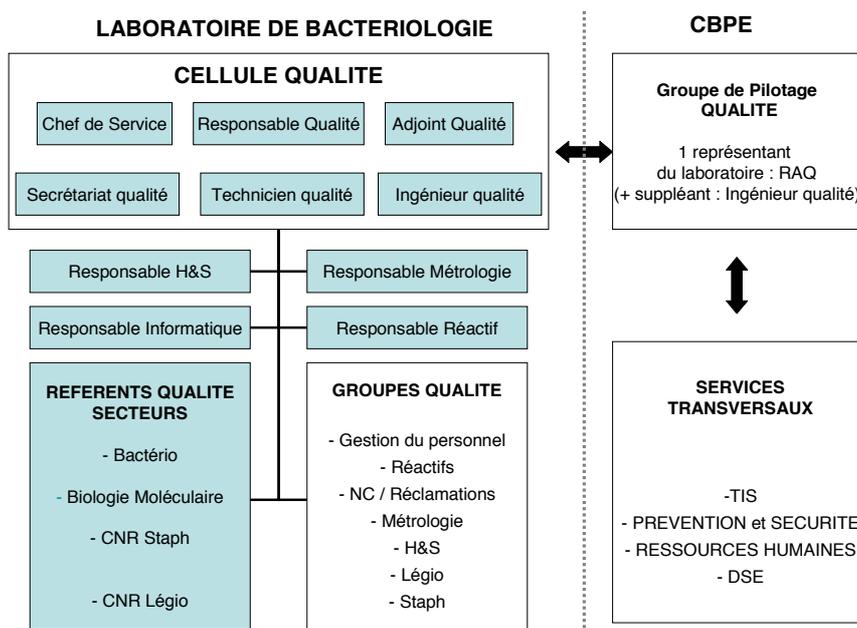
1331. L'enjeu de l'accréditation

Comme tous les autres laboratoires de biologie, le laboratoire du CBPE est confronté aux enjeux de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. De plus, comme le laboratoire réalise les analyses bactériologiques des eaux en vue de la recherche des légionelles, nous devons répondre aux normes de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 17025 qui s'impose aux laboratoires pratiquant les analyses bactériologiques des eaux en vue de la recherche des légionelles. Cette deuxième norme, bien que très proche de la 15189, doit cependant s'appliquer dès 2012, soit pratiquement un an avant la norme 15189. Bien évidemment cette obligation de la norme 17025 est beaucoup plus critique pour le CNR des légionelles que pour le CNR des staphylocoques. Cependant, dans la mesure où il est impossible d'isoler la partie analyse des eaux du reste du laboratoire, nous avons décidé d'entraîner l'ensemble du laboratoire dans le processus d'accréditation en imposant le calendrier de la norme 17025.

Le laboratoire de bactériologie a donc mis en place et maintient un Système de Management de la Qualité adapté à ses activités qui sont d'une part des analyses de biologie médicale (régies par la norme NF EN ISO 15189) et d'autre part des analyses environnementales de qualité de l'eau (régies par la norme NF EN ISO 17025). Le CNR des staphylocoques ainsi que celui des légionelles, sont de fait inclus dans cette démarche globale.

Les Hospices Civils de Lyon se sont engagés à soutenir les CNR et le laboratoire de bactériologie dans cette démarche qualité. Dans le cadre de la démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale, les HCL sont actuellement accompagnés par des consultants extérieurs pour mettre en place un système commun de management de la qualité dans tous les laboratoires. Cet accompagnement passe par la mise en place d'un COPIL pour la démarche qualité et de groupes de travail thématiques pour l'harmonisation de la démarche. A terme, ce système remplacera le système actuel du laboratoire de bactériologie.

1332. Structure qualité du laboratoire



1333. Manuel qualité

Le manuel qualité (MQ) que nous avons rédigé est applicable à l'ensemble des activités du laboratoire de bactériologie comprenant les étapes pré-, per-, et post-analytiques (des activités CNR et hors CNR). Il a pour objet de décrire l'organisation mise en place au laboratoire de bactériologie conformément aux exigences réglementaires, normatives et à celles de l'organisme d'accréditation; il contient les références des documents clés du système

documentaire pour chaque paragraphe et les responsabilités techniques et de management. Il est géré par le responsable qualité, sa revue est faite annuellement afin de le mettre à jour, néanmoins des révisions peuvent être effectuées à tout moment si nécessaire.

1334. Audit et formation qualité.

Un audit a été réalisé en août 2011 sur le SMQ et la technique du laboratoire de bactériologie conformément à la norme ISO 15189. Le rapport a souligné l'implication du personnel et la bonne gestion des équipements.

L'audit d'évaluation initiale par le COFRAC pour l'accréditation des analyses environnementales selon la norme ISO 17025 a eu lieu les 26 et 27 avril 2012. La décision du COFRAC n'est pas encore rendue mais les évaluateurs ont conclu sur les mêmes points forts ainsi qu'une grande maîtrise et expérience des personnels concernant les techniques évaluées.

Par ailleurs, les biologistes du CNR des Staphylocoques ont suivi diverses formations:

- DU Assurance Qualité de l'Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de Lyon (Olivier Dauwalder)
- Formation à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale : la norme NF EN ISO 15189, formation médicale continue des médecins, organisée par les HCL (5 des biologistes du CNR)
- Formations à la validation de méthodes, au contrôle de qualité, habilitation du personnel dans le cadre d'un accompagnement à la démarche d'accréditation par le groupe Else
- Formation technique (Métrologie)

1335. Contrôles qualité

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

Contrôle qualité *spa*-type SeqNet-RIDOM

Le réseau européen SeqNet et le RIDOM SpaServer organise annuellement depuis 2005, un contrôle qualité du séquençage du gène *spa* utilisé pour le typage des souches de *S. aureus* auprès de l'ensemble des laboratoires du réseau SeqNet afin de maintenir le niveau de qualité des séquences déposées dans la base de données SeqNet-Ridom SpaServer. Le CNR des Staphylocoques participe à ce contrôle depuis sa création et a obtenu à chaque contrôle depuis cette date, le niveau maximum « excellent » pour les séquençages réalisés dans le cadre des contrôles. Ceux-ci consistent en l'envoi aux laboratoires participants de 3 ADN anonymes

pour lesquels les laboratoires doivent réaliser l'amplification, le séquençage et l'analyse sur le site Ridom SpaServer. L'ensemble des résultats est alors automatiquement colligé directement sur le site Ridom et analysé par le coordinateur du contrôle qui assure une rétroinformation individuelle en direction de chaque laboratoire participant¹.

Contrôle qualité « European SRL »

Le CNR fait parti des 5 laboratoires européens « fondateurs » à l'initiative de ce contrôle. Il est né de la volonté des laboratoires européens de référence des Staphylocoques (SRL) d'assurer un niveau de qualité exemplaire pour les analyses de base réalisées. Chaque CQ annuel est constitué de 15 souches envoyées à l'ensemble des laboratoires participants qui en retour doivent transmettre au minimum pour chaque souche au centre coordinateur (Scottish MRSA Reference Laboratory, Bonnie Cosgrove) les résultats obtenus pour les techniques suivantes :

- . l'antibiogramme standard
- . le typage *spa* selon la nomenclature Ridom
- . la PCR *mecA* et PCR PVL
- . le typage de la cassette SCC*mec*

Les résultats saisis sur une fiche standardisée sont accompagnés d'un descriptif des techniques utilisées.

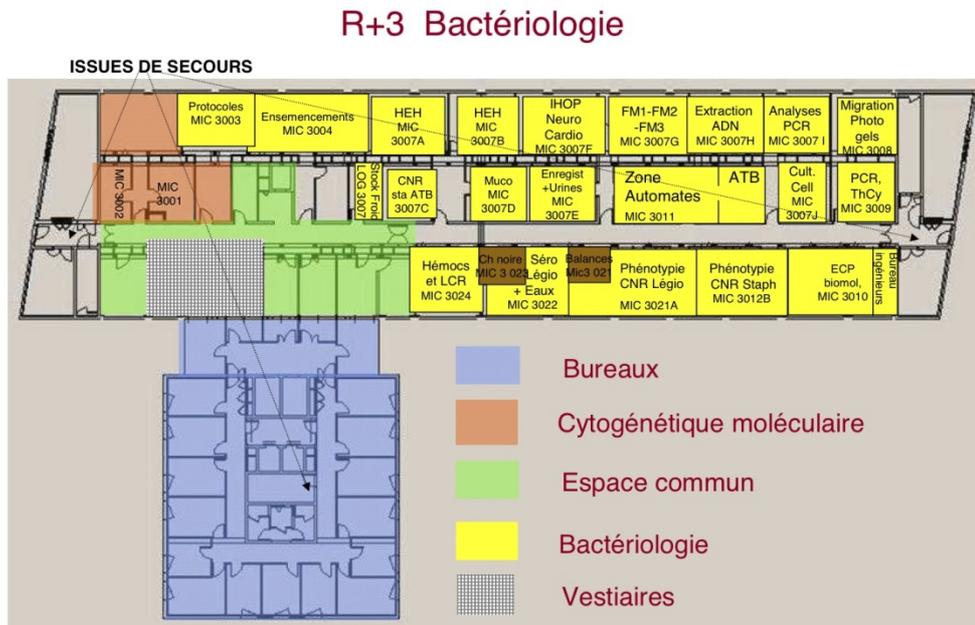
14. Locaux et équipements

141. Surface, plan

Le laboratoire de Bactériologie du CBPE occupe pratiquement la totalité d'un étage soit environ 1000 m² (plan), auxquels il faut ajouter les surfaces de la laverie-stérilisation commune partagée avec la virologie au 2^{ème} étage. Au 3^{ème} étage, des espaces spécifiques sont dévolus aux activités des deux CNR (cf. pièces portant la mention CNR sur le plan ci-dessous) et les CNR bénéficient par ailleurs d'espaces partagés comme ceux dévolus à la biologie moléculaire (MIC 3008, 3009 et 3010), aux antibiogrammes (MIC 3011), à l'enregistrement (MIC 3007^E), ou aux espaces de secrétariat (zones vertes) et de bureaux (zones bleues). Les CNR bénéficient par ailleurs des infrastructures communes (laverie-stérilisation, informatique commune, secrétariat, plateau de biologie moléculaire, gros équipements techniques comme la MALDI-TOF).

¹Aires-de-Sousa M et al. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. J Clin Microbiol. 2006 Feb;44(2):619-21

Sur le site Laennec de la faculté de Médecine Lyon Est, le laboratoire INSERM 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.



142. Principaux équipements

Sur le plan des équipements, 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), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimatsu couplé à la base de données Saramis) et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Les moyens informatiques. Outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie, incluant celles du CNR, le laboratoire a acquis un outil de gestion de base de données spécifique pour les CNR sur une base du logiciel BioNumerics® hébergé sur un serveur sécurisé à la direction de

l'informatique des hospices civils de Lyon. Ce logiciel est en cours de déploiement au sein du laboratoire.

2. Activité d'expertise

21. Capacités techniques du CNR

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

2111. Techniques disponibles :

21111. Techniques d'identification :

PCR *agr* : Le système *agr* (*accessory gene regulator*) est une voie de signalisation à deux composants qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Sans être un gène de ménage, ce système n'en est pas moins universel au sein de l'espèce *S. aureus* et le polymorphisme observé, distinguant 4 allèles fortement enracinés dans la phylogénie de l'espèce, a permis de développer une PCR d'espèce qui constitue le test diagnostique de base pour toute souche arrivant au CNR².

PCR-séquençage du gène *tuf* pour l'identification d'espèce sur souche : Les souches de staphylocoques isolées peuvent être envoyées au CNR pour identification spécialisée. Elles étaient jusqu'à présent identifiées sur des caractères morphologiques, biochimiques voire sur des caractères génotypiques par PCR de la région intergénique ribosomale 16S – 23S (ITS PCR). Le séquençage du gène *tuf* a été retenu comme méthode d'identification pour son bon pouvoir discriminant et pour des raisons techniques (échecs d'amplification et longueur de séquence du gène *gap*). Son utilisation a été validée à partir d'une collection de 186 souches de staphylocoques du CNR³. Cette technique est maintenant utilisée au CNR pour toutes les identifications de souches.

Identification à l'espèce des staphylocoques par spectrométrie de masse MALDI-TOF :

Cf chapitre 2112. Techniques développées en 2011

21112. Techniques de caractérisation de la virulence :

² Lina G et al. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):18-23.

³ Bergeron M et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Mar;30(3):343-54

Recherche des entérotoxines A-E dans les prélèvements cliniques : Le CNR dispose du kit RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E qui permet la détection par technique immunoenzymatique de type sandwich des entérotoxines SEA, SEB, SEC, SED et SEE de *S. aureus*. En cas d'intoxication alimentaire, ces entérotoxines sont recherchées par le CNR dans les produits de vomissements des patients ou les liquides gastriques et digestifs autopsiques. Ce système n'est pas considéré comme optimum en raison des interférences possibles sur le test ELISA par les matrices biologiques complexes que sont les liquides gastriques et les vomis. Des méthodes alternatives sont actuellement étudiées en collaboration avec le CEA de Grenoble.

Puces à ADN: Le principe des puces à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il se retrouve en présence d'un brin complémentaire. Les puces à ADN se présentent sous la forme de surfaces solides (lame de verre, membrane, ...) sur lesquelles sont disposées, sous forme de spots alignés et ordonnés, de courtes séquences cibles d'ADN simple brin qui attendent de s'hybrider avec les produits PCR complémentaires. Chaque spot est spécifique d'un gène. Après extraction des ADN ou des ARN des souches bactériennes, et amplification des cibles avec des amorces marquées, les produits d'amplification sont mis en contact avec la puce pour permettre une ou des éventuelles hybridations amplifiat/cible qui seront ensuite détectées par technique fluorescente ou chromogénique. Longtemps réservés au laboratoire de recherche et à l'analyse des profils d'expression (ARNm), ces outils ont connu un essor important et ont bénéficié des progrès technologiques qui ont facilité leur conception, leur préparation et abaissé leur coût. La société Alere propose depuis peu une version simplifiée et adaptée de cette technologie permettant une analyse génomique des souches de *S. aureus*. Il s'agit de puces placées au fond de cupules au format d'une barrette de type ELISA à 8 puits (ArrayStrip, 8 puces/barrette). Son utilisation repose sur l'amplification de 185 gènes de *S. aureus* grâce à une réaction d'amplification linéaire multi-multiplex dans un tube unique. Les gènes ciblés sont des gènes codant des facteurs de virulence, des déterminants des mécanismes de résistance aux antibiotiques ainsi que des marqueurs épidémiologiques permettant de rattacher les souches testées aux clones épidémiques et pandémiques de SASM et SARM présents dans une base de données dédiée. Après amplification/marquage, les fragments amplifiés sont hybridés sur une puce comportant plus de 600 spots représentant 332 gènes ou allèles de gènes. Après lavage, l'hybridation spécifique entre les sondes immobilisées de la puce et les fragments amplifiés marqués est détectée par un lecteur dédié (ArrayMate®, Alere).

L'ensemble du protocole permet de disposer en moins de 3 heures d'une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée. Ces kits (Identibac *S. aureus* Genotyping®) sont distribués en France par la société Alere et devraient disposer prochainement d'un marquage CE.

Cette technologie remplace aujourd'hui au CNR l'ensemble des techniques de PCR uniplex, duplex ou triplex utilisées auparavant pour la caractérisation de certains facteurs de virulence, certains gènes de résistance ainsi que pour certaines approches pour le typage des souches (*agr*, *SCCmec*, ...). Cette technologie permet à la fois de faciliter l'analyse des données et d'élargir le panel des données recueillies.

Dans le domaine des facteurs de virulence, la puce Identibac *S. aureus* Genotyping® assure la détection : (i) de l'ensemble de toxines staphylococciques connues à ce jour ainsi que de certains variants ; (ii) de 62 adhésines ou variants d'adhésines, (iii) de gènes impliqués dans la formation de la capsule et du biofilm, (iv) de gènes codant les protéases et autres facteurs de virulence (auréolysine, exfoliatine, ACME,...), (v) de gènes régulateurs (*agr*, *saeR/S*, *vraR/S*, *sarA*). L'utilisation de cet outil moléculaire innovant assure une caractérisation extensive des facteurs de virulence des différents clones circulants en France et une exploration des supports moléculaires des différentes formes cliniques d'infection staphylococcique.

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

Le CNR des Staphylocoques a été le premier à se doter de cet outil moléculaire et est actuellement le seul en Europe à l'utiliser en routine pour toutes les souches reçues. Le CNR participe d'ailleurs à son développement technologique et informatique (database et outils bioinformatique) en lien avec la société Alere.

PCR toxine simplex : en cas de résultat douteux avec la puce à ADN pour un des gènes codant les toxines staphylococciques, le CNR conserve en technique de recours des PCR simplex avec révélation en gel pour les toxines suivantes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sel*, *sem*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *eta*, *etb*, *etd*, *tst*, *pvl*)

PCR toxine PVL en urgence sur souche: voir développement de technique : (Cf chapitre 2112. Techniques développées en 2011)

21113. Techniques immunologiques :

Sérologies PVL et TSST-1 (Cf chapitre 2112. Techniques développées en 2011)

Détermination des 24 principaux « répertoires V β » du récepteur T des lymphocytes T pour le diagnostic des chocs toxiques staphylococciques et l'identification de la toxine superantigénique staphylococcique impliquée dans le tableau clinique.

Contrairement à un antigène classique qui active $1/10^6$ lymphocytes T, les toxines superantigéniques staphylococciques stimulent jusqu'à $1/5$ de la population lymphocytaire totale, provoquant une réponse immuno-inflammatoire exagérée, responsable du tableau de choc toxique⁴. Cette prolifération des lymphocytes T est dépendante des répertoires V β ciblés par l'exotoxine staphylococcique impliquée. Le CNR a établi une correspondance entre les superantigènes et leurs principaux répertoires V β cibles introduisant la notion de « signature V β »⁵. Au plan clinique, ces toxines sont responsables d'intoxications alimentaires, de la scarlatine staphylococcique et des chocs toxiques staphylococciques (CTS), pathologie nécessitant une prise en charge en réanimation et où le pronostic vital peut être mis en jeu. Leur diagnostic repose sur l'association de critères cliniques standardisés. Les outils de diagnostic biologiques restent limités essentiellement à la toxinotypie des gènes codant les toxines staphylococciques sur les souches, lorsque ces dernières ont pu être isolées. Depuis fin 2006, le CNR a développé un **test immunologique de diagnostic indirect** par cytométrie de flux mettant en évidence l'activation des 24 principales sous populations lymphocytaires T (CD3⁺) exprimant des répertoires V β différents⁶. Ainsi, grâce à la connaissance des « signatures V β » induites par les superantigènes, il est possible de mettre en évidence une participation superantigénique dans le tableau clinique observé et, dans la majorité des cas, de savoir quelle est la toxine suspectée. Il est à noter que *Streptococcus pyogenes* produit également des toxines superantigéniques : « *Streptococcal pyrogenic exotoxin A, C* », etc. (SPEA, SPEC) douées de propriétés immunologiques identiques mais dont les cibles V β diffèrent.

A partir d'un prélèvement sanguin datant de moins de 24h, l'isolement des cellules mononuclées du sang périphérique permet la détermination des « signatures V β » par cytométrie de flux après marquage par une combinaison d'anticorps monoclonaux. L'analyse dure \approx 4 heures et le délai moyen de rendu est de 24 à 48 heures.

La détermination des répertoires V β du TCR des lymphocytes T par cytométrie de flux est le **seul outil de diagnostic biologique** des chocs toxiques staphylococciques (menstruels ou non

⁴ Thomas D et al. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy, 2007. **93**: p. 24-41.

⁵ Thomas D et al. *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 2043-50.

⁶ Ferry T et al. Early diagnosis of staphylococcal toxic shock syndrome by detection of the TSST-1 Vbeta signature in peripheral blood of a 12-year-old boy. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(3): p. 274-7.

menstruels) et des chocs streptococciques objectivant l'action des toxines superantigéniques - et non seulement la présence du gène codant la toxine - motivant et justifiant l'administration des thérapeutiques anti-toxiniques.

21114. Techniques de typage

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

Identification des groupes *agr*

Le système *agr* (*accessory gene regulator*) est une voie de signalisation à deux composants qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus*. Un polymorphisme dans la séquence protéique du récepteur (AgrC) et de l'autoinducteur (AIP dérivé d'AgrD) permet de définir quatre allèles *agr* sur la base d'une PCR multiplex emboîtée⁷ développée par le CNR. La divergence des allèles *agr* est un événement évolutif ancien qui permet de séparer l'espèce *S. aureus* en quatre fonds génétiques distincts : *agr 1*, *agr 2*, *agr 3* et *agr 4*. Cette PCR qui permet en outre de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *S. aureus* représente le test de base (avec la PCR *mecA*) pour toutes les souches lors de leur arrivée au CNR.

Caractérisation de la Cassette SCC*mec*

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

⁷ Lina G et al. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):18-23.

différents types de jonction J1 (région entre *ccr* et la partie droite du chromosome), J2 (entre *mec* et *ccr*) et J3 (entre *orfX* et *mec*, contenant de nombreux gènes et pseudogènes) permet de définir à ce jour 11 cassettes SCC*mec* différentes, chaque clone de MRSA portant une cassette spécifique unique.

Le CNR dispose d'outils de PCR assurant la détection rapide des différents complexes *mec* et *ccr* (PCR-M1 et PCR-M2 de Kondo) (voir ci-dessous). Cette approche est complétée par les données provenant des puces à ADN.

Technique de *spa*-type

Cette technique est basée sur le séquençage de la région polymorphique de la protéine A qui est le reflet du fond génétique d'un isolat. Des délétions, des insertions, des duplications ou des mutations ponctuelles peuvent ainsi intervenir.

A chaque variation tant de la séquence que du nombre de répétitions de cette région variable de la protéine A, un numéro arbitraire est attribué à l'aide du logiciel « *RidomStaph Type Software* » (<http://www.spaserver.ridom.de/>). L'utilisation d'un tel outil permet de collecter et d'harmoniser l'ensemble des données. De plus, les séquences saisies sont automatiquement contrôlées permettant un haut niveau de qualité. Cette technique génère alors des « types *spa* » (par exemple t004), que le logiciel regroupera au sein de « *spa-CC* » ou complexes clonaux « *spa* », contenant des « types *spa* » proches. Cette technique apparaît comme plus discriminante que la MLST et de réalisation plus facile ou moins coûteuse, car ne nécessitant le séquençage que d'un seul gène. Cependant, cette méthode est moins discriminante que le PFGE mais présente une meilleure reproductibilité et une plus grande facilité d'échange des résultats inter laboratoire. Ainsi, le typage *spa* est un outil épidémiologique permettant l'étude de l'écologie locale des SARM à l'échelon hospitalier comme l'atteste son utilisation lors d'études épidémiologiques prospectives centrées sur un hôpital. Enfin, un algorithme a été mis au point permettant de faire de l'épidémiologie à long terme grâce à la détermination de complexes clonaux. Ce logiciel : « *BasedUponRepeat Pattern* » (BURP) utilise une approche heuristique. Une récente étude comparative avec la MLST et le PFGE a montré une excellente concordance entre ces trois techniques épidémiologiques.

Technique de MLST

Elle consiste en un séquençage de 7 gènes d'environ 500 pb impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de l'espèce *S. aureus* (gènes de ménage). Chaque séquence différente représente un allèle auquel un numéro arbitraire est attribué par la base de données MLST (*multilocus sequence type*) (<http://www.mlst.net>) quelle que soit l'origine de la différence, mutation ponctuelle ou large recombinaison. Ainsi, chaque isolat est désigné par

la combinaison de sept chiffres formant ainsi le « *Sequence Type* » ou ST ou profil allélique. Deux isolats présentant au moins 5 allèles identiques sont considérés comme génétiquement relié entre eux et peuvent être alors regroupés au sein d'une même unité : le complexe clonal (CC). Chaque CC est désigné par le numéro du ST considéré comme l'ancêtre à l'aide du logiciel eBURST® permettant de définir des familles. Cette technique, appliquée à partir de 2000 à *S. aureus* présente de nombreux avantages : une excellente corrélation avec le PFGE, une excellente reproductibilité et un échange aisé des données grâce à une base de données accessible par internet et continuellement actualisée. Enfin, cette technique permet la réalisation de modèles d'évolution, permettant de comprendre l'apparition temporelle des clones de *S. aureus*.

PFGE

Technique très répandue, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est utilisée lors de l'investigation d'épidémies locales.

Bien qu'ayant un pouvoir très discriminant, elle possède une grande variabilité inter laboratoires ne permettant pas l'échange de données entre les laboratoires et limitant son utilisation dans l'investigation de la dissémination d'un clone de SARM. Le développement de la MLST au CNR a peu à peu remplacé la PFGE. Cette dernière reste d'intérêt uniquement dans les études épidémiologiques comparant la dispersion des souches épidémiques sur une période limitée. L'ensemble des résultats analysés à l'aide du logiciel GelCompar® permet de grouper les populations bactériennes selon leurs caractéristiques et de les rattacher aux grands groupes évolutifs notamment pour les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline.

Puces à ADN

Cette technologie apporte aussi une solution innovante au problème de la détection, de l'identification et du typage des clones de *Staphylococcus aureus*. En effet la comparaison de l'ensemble des informations génétiques recueillies grâce à la puce pour une souche clinique donnée avec la base de données implémentées sur l'automate (et mise à jour régulièrement), permet d'assigner chaque souche testée à un clone de SARM ou SASM. Les puces à ADN permettent donc à la fois de connaître rapidement et en temps réel :

- . à l'échelle individuelle : la nature du clone impliqué dans la forme clinique rapportée par le prescripteur pour le patient concerné,
- . à l'échelle collective : la nature des clones circulants en France qui sont adressés au laboratoire.

Ces informations permettent donc un suivi de l'épidémiologie à l'échelle locale, régionale ou nationale et éventuellement une alerte rapide en cas d'apparition de nouveaux clones. Elles

nous ont ainsi permis de facilement identifier l'introduction en France au cours des 3 dernières années de souches appartenant au clone épidémique américain USA300 ou au clone animal ST398.

PCR CC398 : (Cf chapitre 2112. Techniques développées en 2011)

21115. Techniques d'analyse de la résistance aux antibiotiques

Détection du gène *mecA* de résistance à la méticilline

Le gène *mecA* est recherché par PCR pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative.

Détection du gène *mecC* de résistance à la méticilline (*mecA* LGA251 variant du *mecA* (Lancet 2011, vol 11, 8)

En l'absence de gène *mecA*, le gène *mecC* est recherché par PCR pour les souches de *S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative présentant une résistance isolée à la méticilline.

Détection PLP2a

Le test Clearview Exact PBP2a® (Alere) est disponible au CNR pour la recherche sur souche de l'expression de la PLP2a chez *S. aureus*. Ce test donne des résultats plus performants que la détection de PLP2a sur particules de latex. Pour les souches de staphylocoques à coagulase négative il est préférable d'effectuer le test Clearview Exact PBP2a® après induction par la cefoxitine.

Détection de la résistance aux glycopeptides

Elle est effectuée seulement pour *S. aureus*^{1,2}. Sont réalisés :

* les CMI vancomycine et teicoplanine par E-test® avec inoculum classique sur gélose Mueller Hinton,

* un criblage par E-test® vancomycine et teicoplanine, avec un inoculum lourd (2 McFarland) sur gélose cœur-cervelle.

En cas de criblage positif, CMI \geq 8mg/L pour la vancomycine et la teicoplanine, une analyse de population est effectuée selon la technique d'Hiramatsu modifiée:

- sans induction sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.
- après induction 48h en bouillon cœur-cervelle contenant 2 mg/L de vancomycine puis inoculation sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine. Le dépôt sur

les géloses cœur cervelle s'effectue un même jour (induction simple) et toutes les 48 h (induction en cascade).

La nature des courbes obtenues permet de confirmer ou d'infirmier la résistance.

Détection du gène *vanA/B* par PCR

Ce mécanisme de résistance a été décrit chez moins d'une dizaine de souches de *S. aureus* à travers le monde mais son apparition et sa dissémination en France constituent une source d'inquiétude majeure. Le CNR dans le cadre de son rôle d'alerte dispose donc des outils de PCR spécifiques permettant la détection des gènes *vanA*, *vanB* et *vanC*. Ils ne sont utilisés que sur les souches adressées pour sensibilité diminuée aux antibiotiques après confirmation par les méthodes phénotypiques décrites ci-dessus et après avis des responsables du CNR.

Par ailleurs, dans le cadre de son rôle de surveillance continue des résistances, le CNR assure un criblage de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui sont adressées grâce à la puce à ADN qui comporte des spots dédiés à la détection des gènes *vanA*, *vanB*, et *vanZ*.

Détermination de la résistance aux antibiotiques par puces à ADN

La puce à ADN StaphyType® comme décrit plus haut permet en une seule réaction de PCR et d'hybridation d'avoir accès à un large panel de gènes. Quarante neuf gènes ou variants de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et antiseptiques chez *S. aureus* sont criblés avec la puce à ADN. Les gènes codant la PLP2a, les méthylases (*erm*), pompes (*msrA*) et enzymes (*linA*) conférant la résistance aux macrolides, les enzymes altérant les aminosides, mais aussi les gènes *mup* (résistance à la mupirocine) ou *qac* (résistance aux ammoniums quaternaires), les résistances aux glycopeptides des entérocoques de type *van* (*vanA*, *vanB*, *vanZ*, potentiellement transférables chez *S. aureus* comme cela a été décrit sporadiquement) sont notamment inclus. Au total, la caractérisation moléculaire de la cassette SCC*mec* est aussi possible grâce à cet outil.

Tableau 1 : Ensemble des gènes de résistance détectés avec la puce à ADN StaphyType® 96 (Alere)

<i>blaZ</i>	<i>mpbBM</i>	<i>sat</i>	<i>fexA</i>
<i>blaI</i>	<i>vatA</i>	<i>dfrA</i>	<i>fosB</i>
<i>blaR</i>	<i>vatB</i>	<i>far1</i>	<i>qacA</i>
<i>ermA</i>	<i>vga</i>	<i>mupR</i>	<i>qacC</i>
<i>ermB</i>	<i>vgaA</i>	<i>tetK</i>	<i>vanA</i>
<i>ermC</i>	<i>vgb</i>	<i>tetM</i>	<i>vanB</i>
<i>linA</i>	<i>aacA-aphD</i>	<i>tetEfflux</i>	<i>vanZ</i>
<i>msrA</i>	<i>aadD</i>	<i>cat</i>	
<i>mefA</i>	<i>aphA-3</i>	<i>cfr</i>	

Détermination de la résistance au linézolide :

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

. une PCR spécifique ciblant le locus *cfr* qui code une méthylase qui modifie l'ARN 23S⁸ à la position 2503 a été développée. Les souches que le CNR a été amené à expertiser étaient jusqu'à ce jour des staphylocoques à coagulase négative adressés pour recherche spécifique du mécanisme associé à une résistance au linézolide détectée phénotypiquement par le laboratoire demandeur. Cette modification confère la résistance aux Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones (Linézolide), Pleuromutilins et Streptogramine A. Ce mécanisme conduit à des hauts niveaux de résistance au linézolide (CMI > 256 mg/L). Le CNR assure par ailleurs un criblage systématique de l'ensemble des souches de *S. aureus* qui lui est adressé (ou sont adressées), puisque la puce à ADN utilisée dispose d'un spot spécifique pour la détection du gène *cfr*.

La résistance au linézolide pouvant aussi être associée à des mutations dans la séquence de l'ARN 23S (une vingtaine sont décrites jusqu'à présent), le CNR a développé une approche par PCR-séquençage des régions d'intérêt. Les valeurs des CMIs au linézolide sont corrélées avec le nombre des copies du gène ARN 23S mutées.

⁸ Morales G et al. Resistance to linezolid is mediated by the cfr gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2010 Mar 15;50(6):821-5.

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

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

2112. Techniques développées en 2011

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

La spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF est une technologie permettant l'identification rapide des bactéries pathogènes. Elle a connu un essor et un intérêt important au cours des trois dernières années et devrait connaître un succès rapide en microbiologie clinique. Nous avons cherché à évaluer l'utilisation de cette technique pour l'identification à l'espèce des staphylocoques à partir d'une collection de souches de référence et d'une collection de souches isolées en clinique humaine et vétérinaire parfaitement caractérisées par le CNR des Staphylocoques en combinant différentes méthodes biochimiques et moléculaires.

La collection des souches de référence comprenait une souche de *Staphylococcus aureus* et 43 souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN). La collection de souches cliniques comprenait 9 souches de *S. aureus* et 177 souches de SCN appartenant à 32 espèces différentes. Toutes les souches ont été identifiées par MALDI-TOF (Axima[®] Shimadzu) couplée à la base de données spectrales SARAMIS (AnagnosTec[®]) et intégrée au sein du logiciel SIRWEB-MALDITOF (I2A). Les souches ont été testées sur quatre dépôts dans une matrice d' α -cyano-4-hydroxy-cinnamique. Les spectres obtenus ont été comparés à ceux de la base de données permettant d'obtenir un résultat sous forme de score exprimé en pourcentage. Un score supérieur à 30% permet d'obtenir une identification fiable. Les identifications par SM ont été comparées : (i) à l'identification de référence réalisée par le CNR qui associe techniques biochimiques d'identification conventionnelle et moléculaires : sondes, ITS-PCR, PCR spécifiques, séquençage, hybridation ADN/ADN ; (ii) et pour la collection CNR, aux identifications conventionnelles obtenues avec la galerie ID32 Staph (bioMérieux).

Les résultats obtenus montrent que parmi les 44 souches de référence, 6 souches appartenant à des espèces non incluses dans la base de données, n'ont conduit à aucune identification. Sur les 38 souches restantes, 30 (79%) ont été parfaitement identifiées à l'espèce par SM, une a

été identifiée comme appartenant au groupe *hominis/warneri* et 7 sont restées sans identification. Sur les 186 souches cliniques provenant de la collection du CNR, 16 souches ont été exclues, l'espèce correspondante n'appartenant pas aux bases de données des techniques d'identification conventionnelle et/ou de SM. Parmi les 170 souches restantes, 121 souches ont été identifiées au niveau de l'espèce (71%). Une identification au groupe (*intermedius*, *hominis/warneri* ou *warneri/pasteuri*) a été obtenue pour 18 souches, 1 souche a été identifiée au niveau du genre *Staphylococcus* et 46 sont restées sans identification. Si l'on exclut les espèces absentes des bases de données, au total, 81.5% des souches de la collection du CNR ont été correctement identifiées par MALDI-TOF. Ce résultat est tout à fait comparable à celui obtenu avec la galerie ID32 STAPH® (75% d'identifications correctes). Ces scores légèrement inférieurs à ceux obtenus dans la littérature (93 à 99.3% d'identification par MADLI-TOF selon les études) sont liés au fait que la collection de souches testées comprenait les espèces courantes mais aussi beaucoup d'autres plus rarement isolées en clinique humaine. La technique est très performante sur les espèces classiquement retrouvées en routine.

Cette évaluation démontre que la SM est un outil adapté pour l'identification des staphylocoques classiquement rencontrés en clinique par rapport à l'identification conventionnelle. De plus, de par sa rapidité et son coût moindre, elle pourrait être utilisée en première intention pour l'identification des staphylocoques en réservant l'identification moléculaire de référence, longue et coûteuse, à un nombre limité de souches non identifiées par SM⁹.

Détection de l'hémolysine delta (δ) par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'hémolysine delta (δ) de *S. aureus* est également appelée δ -toxine ou δ -lysine. Elle est codée par le gène *hld* qui appartient au système *agr*. L'ARNm du gène *hld*, aussi appelé ARNIII est l'effecteur du système *agr* qui régule l'expression de nombreux gènes tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. La traduction de l'ARN III en hémolysine δ est retardée (\approx 1 heure) et intervient en fin de phase exponentielle de croissance^{10, 11}. L'hémolysine δ est ainsi le reflet de la transcription de l'ARN III, donc de la fonctionnalité du

⁹ Bergeron M et al. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-54

¹⁰ Balaban N, Novick RP. Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* *agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. FEMS Microbiol Lett. 1995;133(1-2):155-61.

¹¹ Somerville GA, Cockayne A, Durr M, Peschel A, Otto M, Musser JM. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. J Bacteriol. 2003;185(22):6686-94.

système agr¹². Elle appartient à la famille des toxines hémolytiques de *S. aureus* et crée des pores dans la membrane cellulaire. Elle provoque notamment la lyse des érythrocytes humains, de lapin, de mouton, de cheval, de chat, de poulet, *etc.* par destruction des phospholipides des membranes cellulaires¹³. Elle est également impliquée dans la prévention de la formation du biofilm et dans l'initiation du stress oxydatif dans les polynucléaires neutrophiles humains¹¹. Elle est constituée de 26 acides aminés et possède une masse de 2,9 kDa (Figure 1)¹⁴. Elle est présente sous deux formes : *i*) formylée en N-terminal sur le résidu méthionine, qui est la forme native ; et *ii*) déformylée¹⁵.

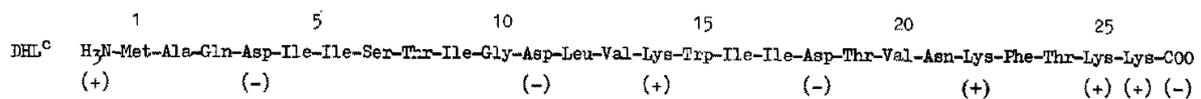


Figure 1 : Séquence primaire de l'hémolysine δ (d'après¹⁴)

Différentes méthodes de détection de l'hémolysine δ de *S. aureus* ont été décrites :

- Tests d'hémolyse : mesure de l'hémolyse induite par une souche de *S. aureus* cultivée sur gélose au sang en présence d'anticorps anti hémolysine α et β . L'hémolysine δ peut également être détectée par la recherche de la synergie d'hémolyse entre l'hémolysine δ et l'hémolysine β ¹⁵.
- Biotests : modèle animal : mesure de la dose létale minimale (DLM) sur des souris ou des cobayes¹³.
- RT-PCR : RT-PCR ciblant l'ARN III¹⁶.
- Northern blot ciblant l'ARN III^{16, 17, 18}

¹² Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. PLoS Pathog. 2011;7(3):e1002006.

¹³ Kreger AS, Kim KS, Zaboretzky F, Bernheimer AW. Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. Infect Immun. 1971;3(3):449-65.

¹⁴ Fitton JE, Dell A, Shaw WV. The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett. 1980;115(2):209-12.

¹⁵ Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. Peptides. 2009;30(4):817-23.

¹⁶ Goerke C, Campana S, Bayer MG, Doring G, Botzenhart K, Wolz C. Direct quantitative transcript analysis of the agr regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile *in vitro*. Infect Immun. 2000;68(3):1304-11.

¹⁷ Traber K, Novick R. A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate delta- and alpha-haemolysins. Mol Microbiol. 2006;59(5):1519-30.

¹⁸ Kornblum JS, Projan SJ, Moghazeh SL, Novick RP. A rapid method to quantitate non-labeled RNA species in bacterial cells. Gene. 1988;63(1):75-85.

- Séquençage : Le séquençage complet du locus *agr* peut également être réalisé permettant d'identifier des mutations ponctuelles pouvant expliquer son dysfonctionnement¹⁷.
- Chromatographie liquide hautes performances (HPLC)
 - Détection UV¹⁹
 - Détection ESI-MS¹¹

Objectifs du travail et principaux résultats

L'objet du travail était de détecter l'hémolysine δ par « Whole Cells Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight » (WC-MS MALDI TOF) utilisée dans les conditions nécessaires à l'identification bactérienne (protocole de routine sur cellules entières)⁹.

Ainsi, nous avons montré la présence d'un pic à 3008 \pm 5 Thomson (Th) pour la forme formylée de l'hémolysine δ ou d'un pic à 3035 \pm 5 Th pour la forme formylée variante G10S (Figure 2). Nous avons pu établir un lien entre absence des pics 3008 ou 3035 Th et déficience en hémolysine δ et montrer qu'il existait un lien entre déficience en hémolysine δ et infections chroniques. Enfin, en accord avec la littérature²⁰, nous avons retrouvé un lien entre déficience en hémolysine δ et suspicion de souche de *S. aureus* présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides : « *Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus* » (GISA).

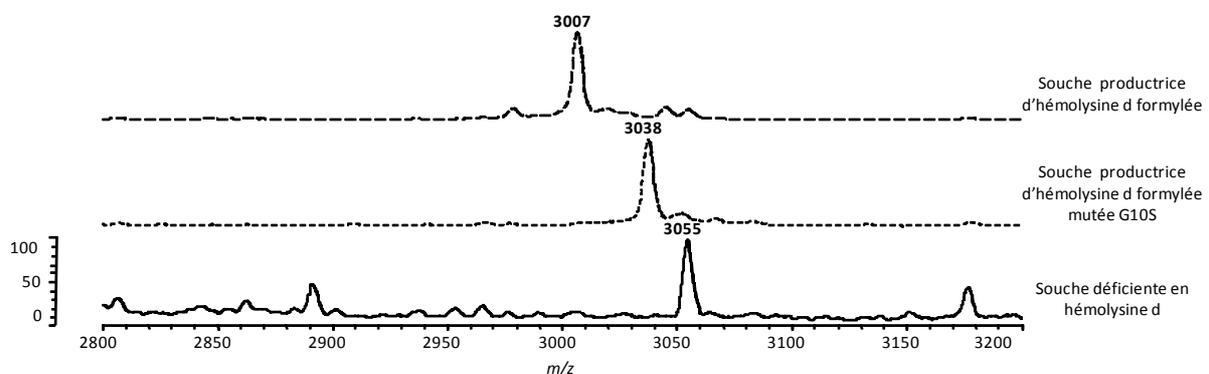


Figure 2 : Détection de l'hémolysine δ par WC-MS MALDI TOF (Exemple des 3 types de spectres possibles.)

Au total, la mise au point d'un outil rapide et d'excellente praticabilité de détection de l'hémolysine l'hémolysine δ devrait faciliter la détection des souches de *S. aureus* déficientes

¹⁹ Otto M, Gotz F. Analysis of quorum sensing activity in staphylococci by RP-HPLC of staphylococcal delta-toxin. Biotechniques. 2000;28(6):1088, 90, 92, 96.

²⁰ Sakoulas G, Gold HS, Cohen RA, Venkataraman L, Moellering RC, Eliopoulos GM. Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2006;57(4):699-704.

pour le système *agr*, dont la fréquence est estimée entre 15% et 22% selon les études^{21, 22, 23} et dont divers travaux suggèrent leur association avec des infections persistantes et/ou des souches GISA. Ces souches déficientes pour le système *agr* ont notamment été retrouvées :

- Au cours des bactériémies : Une étude clinique rétrospective portant sur les bactériémies persistantes (BP) à SARM a montré que les souches de SARM présentant un dysfonctionnement du système *agr*, objectivée par la recherche de l'hémolysine δ sur gélose, étaient plus fréquemment retrouvées au cours des bactériémies persistantes (BP) en comparaison aux bactériémies résolutive²⁴. De plus, une souche de *S. aureus* déficiente pour *agr* était capable de prédire la mortalité avec une sensibilité de 30%, une spécificité de 79%, une valeur prédictive positive de 18 % et une valeur prédictive négative de 88%²¹.
- Au cours de la mucoviscidose²⁵.
- Au cours des infections impliquant la formation de biofilms : 78% des souches déficientes pour *agr* formaient un biofilm contre seulement 6% des souches exprimant *agr*²⁶.

Ainsi, la détection facilitée par WC-MS MALDI TOF des souches déficientes pour l'hémolysine delta pourra être utilisé comme marqueur prédictif d'infections persistantes et/ou de souches pouvant devenir GISA. Grâce à cet outil, la réalisation d'études cliniques incluant un grand nombre de souches de *S. aureus* devrait démontrer si ces souches déficientes pour l'hémolysine delta nécessitent une prise en charge renforcée, pouvant notamment inclure une antibiothérapie combinée ou de durée accrue. Ce travail a fait l'objet d'un brevet déposé conjointement par les Hospices Civils de Lyon et la société bioMérieux partenaire de ce projet.

²¹ Schweizer ML, Furuno JP, Sakoulas G, Johnson JK, Harris AD, Shardell MD, et al. Increased mortality with accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* among bacteremic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1082-7.

²² Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology.* 2008;154(Pt 8):2265-74.

²³ Tsuji BT, Maclean RD, Dresser LD, McGavin MJ, Simor AE. Impact of accessory gene regulator (*agr*) dysfunction on vancomycin pharmacodynamics among Canadian community and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011;10:20.

²⁴ Fowler VG, Jr., Sakoulas G, McIntyre LM, Meka VG, Arbeit RD, Cabell CH, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis.* 2004;190(6):1140-9.

²⁵ Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG, Jr., Moellering RC, Jr., Novick RP, Lucindo N, et al. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2687-92.

²⁶ Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F., & Otto, M. (2000). Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases,* 182(6), 1688–1693.

Détection en urgence de la Leucocidine de Panton Valentine (PVL) par PCR sur souche de *S. aureus* PCR toxine PVL en urgence sur souche

La détection rapide des souches de *S. aureus* productrices de PVL constitue un élément essentiel pour optimiser la prise en charge des patients notamment en cas de suspicion de pneumopathie nécrosante. La mise à disposition d'un tel outil peut permettre une confirmation rapide de ce diagnostic et la mise en place de thérapeutique ciblée (antibiotiques « anti-toxiniques », Immunoglobulines, ECMO) ou à l'inverse une exclusion du diagnostic permettant l'exploration d'autres hypothèses cliniques. Une technique d'amplification génique par PCR en temps réel des gènes codant la leucocidine de Panton Valentine a été mise en place au CNR à partir des souches. La technique utilise une extraction rapide et des amorces spécifiques permettant d'amplifier sur LightCycler 1 (Roche Diagnostic) un fragment d'ADN du gène *lukSF-PV*. L'utilisation de SYBR GREEN, capable de s'intercaler dans l'ADN double brin, assure la révélation des produits d'amplification. Le résultat est disponible en 3 heures et peut être transmis immédiatement au laboratoire prescripteur.

Dosage de la PVL par ELISA

Ce test permet la quantification de la production de PVL dans un échantillon biologique ou dans le surnageant d'une culture bactérienne. L'objectif était (i) de pouvoir déterminer si certaines souches de *S. aureus* contenant les gènes de la PVL, et notamment les souches à potentiel épidémique comme les SARM-C, sont productrices ou non de quantités élevées de PVL, (ii) de pouvoir déterminer les concentrations de PVL produite localement dans les différents tissus, (iii) de détecter la production de PVL directement sur des prélèvements cliniques afin de pouvoir établir le diagnostic dès les premières heures de prise en charge des patients. La technique repose sur un test ELISA utilisant un anticorps polyclonal de lapin et un anticorps monoclonal recombinant produit en collaboration avec le laboratoire bioMérieux.

Afin de valider ce nouvel outil, nous avons utilisé à un large panel de souches et de prélèvements biologiques. Plus de 300 souches de divers fonds génétiques ont été analysées et nous avons observé une concordance parfaite entre le test ELISA PVL et la PCR. De même, le test appliqué sur les échantillons cliniques, pus cutanés et osseux, liquides articulaires, aspirations trachéales, liquides de lavage broncho-alvéolaire et liquides pleuraux a confirmé les données obtenues après cultures. Sur ces prélèvements, le test ELISA PVL a présenté une spécificité de 100% et une sensibilité de 95%, ce qui en fait un test diagnostique fiable et rapide, le résultat pouvant être obtenu en moins de 3 heures.

Cette technique reste pour l'instant du domaine R&D et n'est pas utilisée en routine mais est en cours d'implémentation au sein du CNR.

Développement d'un test immunochromatographique pour la détection rapide de la leucocidine de Panton Valentine.

Les résultats obtenus avec le test ELISA nous ont conduits à mettre au point un test immunochromatographique, méthode de détection de la PVL plus rapide que le test ELISA, facilement industrialisable et commercialisable. De plus, les tests immunochromatographiques sont simples d'utilisation, faciles à conserver (température ambiante) et beaucoup moins coûteux que les techniques de PCR commercialisées actuellement ou les tests ELISA car ils ne requièrent aucun matériel spécifique et aucun pré-requis spécifique pour le personnel amené à les réaliser. Ce test a été développé en collaboration avec la société bioMérieux. Environ 300 souches de divers fonds génétiques ont été analysées et nous avons observé une concordance totale entre test immunochromatographique PVL et la PCR. De même, le test a été utilisé pour détecter directement la PVL dans plus d'une centaine d'échantillons cliniques, pus cutanés et osseux, liquides articulaires, aspirations trachéales, liquides de lavage broncho-alvéolaire et liquides pleuraux. Sur ces prélèvements, le test immunochromatographique PVL a présenté une spécificité de 100% et une sensibilité de 88%. Les résultats peuvent être obtenus dans l'heure, directement à partir des échantillons cliniques (y compris les écouvillons) en l'absence de tout matériel spécifique. Le développement de ce type de test permet d'envisager une détection rapide et simple de la PVL dans tous les laboratoires, permettant d'identifier rapidement les patients atteints d'infections sévères PVL+ et assurant ainsi la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée. Avec ce nouvel outil diagnostique, une meilleure prise en charge des patients peut être envisagée ce qui devrait se traduire par une baisse de la mortalité et de la morbidité des infections staphylococciques dues à la PVL. Le développement du test a atteint la phase de validation des lots de fabrication.

Sérologie PVL et TSST-1

Le CNR a développé deux techniques sérologiques pour l'aide au diagnostic et au suivi des pathologies associées à la leucocidine de Panton Valentine (PVL) et à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Les anticorps sériques dirigés contre la PVL ou la TSST-1 sont quantifiés par méthode ELISA et comparés à un calibrateur stable issu d'un pool de donneurs sains. Les seuils décisionnels et les performances internes de ces tests ont été déterminés en comparant les taux d'anticorps chez un groupe de malades (PVL, n=29 ; TSST-1, n=10) et chez une population de 200 témoins sains (donneurs de sang). La sérologie PVL a

montré d'excellentes performances internes dans la population française (sensibilité et spécificité >90%) ; les performances étaient également satisfaisantes pour la sérologie TSST-1 (sensibilité 80%, spécificité 90%). Si l'isolement des souches de *S. aureus* responsables des signes cliniques doit demeurer un objectif prioritaire, ces deux sérologies constituent des outils rétrospectifs pouvant concourir au diagnostic de certaines infections toxiques staphylococciques. La sérologie PVL présente un intérêt tout particulier dans les pneumopathies nécrosantes non documentées, même s'il nous reste encore à investiguer la cinétique de séroconversion. Dans le cas de la sérologie TSST-1, l'absence d'anticorps à la phase aigüe du choc toxique staphylococcique menstruel est en faveur d'un choc toxique staphylococcique et la persistance d'un taux négatif est associée à un risque accru de récurrence. Ces techniques répondent à une attente réelle de la part des cliniciens confrontés au diagnostic de ces pathologies, avec plus de 110 dosages effectués pour 20 hôpitaux français et plusieurs hôpitaux européens (Royaume-Uni, Irlande) depuis leur mise en place fin 2010²⁷.

PCR CC398

L'émergence de souches de SARM d'origine animale appartenant au complexe clonal CC398 constitue un problème de santé publique dans de nombreux pays européens notamment du Nord de l'Europe. Ces souches sont à l'origine d'infections humaines qui peuvent être sévères. De telles souches ont été détectées en France, essentiellement chez les animaux pour l'instant. L'un des problèmes rencontrés avec ces souches est la capacité à détecter ces souches et/ou à facilement de confirmer l'appartenance au CC398. Nous avons donc adapté une technique d'amplification ciblant spécifiquement le gène *sau1-hsdS1* des souches de ce CC décrite par nos collègues danois²⁸. Ces auteurs ont démontré sur une collection de 1307 souches, que cette technique présente une sensibilité et une spécificité de 100%. Dans notre laboratoire, nous avons retrouvé les mêmes caractéristiques pour cette PCR. Elle nous a permis de confirmer rapidement l'appartenance à ce complexe clonal de près de 200 souches qu'ils s'agissent de souches de SASM ou SARM d'origine animale ou humaine.

Détermination de la résistance à la méticilline par expression du gène *mecC*: En collaboration avec nos collègues danois, une technique de PCR permettant l'identification rapide du gène *mecC* (correspondant à un variant du gène *mecA*) non détecté par les PCR ciblant le gène *mecA* a été développée et est disponible au sein du CNR.

²⁷ Croze M et al. Serum antibodies against Pantone-Valentine leukocidin in a normal population and during *Staphylococcus aureus* infection. Clin Microbiol Infect. 2009 Feb;15(2):144-8.

²⁸ Stegger M et al. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying *sau1-hsdS1*. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):732-4

2113. Techniques en développement : principes et état d'avancement

Développement de la technique de MLVA appliquée à *S. aureus* (Typage)

La technique MLVA (**Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis**) ou Multi-Locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) Analysis est une méthode d'analyse génétique qui exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem. Ce type d'analyse est bien connu en médecine légale puisque c'est ainsi que les « empreintes génétiques » sont réalisées. Le terme « MLVA » est plus particulièrement utilisé dans le cadre du typage de bactéries. L'amplification d'une collection définie de locus répétés en tandem (par PCR) et la mesure de la taille de ces amplifiats permet d'assigner à une souche une série de nombres correspondant au nombre d'unités répétées à chaque locus. Le nombre de motifs répétés est variable d'une souche à l'autre. Appliquée à *S. aureus*, la MLVA a démontré une résolution infra-spécifique meilleure que le *spa*-typing. Elle permet en outre des gains en terme de simplicité et de rapidité de réalisation, une centaine de souches pouvant être analysée en 24 à 48 heures pour un coût inférieur, cette technique n'étant pas basée sur le séquençage mais sur une analyse de fragments avec standardisation interne.

Dans le cadre de l'étude EARSS 2011, le CNR des staphylocoques, en collaboration avec le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) (Hollande) a souhaité mettre en place et tester ce nouvel outil de typage pour *S. aureus*. Hélène Meugnier, ingénieur du CNR des staphylocoques a été formée à cette technique au RIVM et l'a implémenté dans notre laboratoire.

PCR PVL en urgence directement sur les prélèvements (Diagnostic)

Comme présenté ci-dessus, le CNR réalise actuellement en urgence la recherche spécifique des gènes codant la PVL sur les souches qui lui sont adressées. Afin d'améliorer la prise en charge des patients présentant une pneumonie nécrosante, pour laquelle la précocité de l'adaptation thérapeutique est cruciale, une technique d'amplification génique par PCR quantitative des gènes codant la PVL directement sur les prélèvements est en cours de développement et de validation avec les prélèvements collectés aux Hospices Civils de Lyon. L'objectif est de pouvoir à terme assurer l'utilisation de cette PCR directement sur les prélèvements pour l'ensemble de nos correspondants.

Détermination des 24 principaux « répertoires V β » du récepteur des lymphocytes T (Diagnostic – suspicion de choc toxique staphylococcique)

Cet outil de diagnostic fait l'objet d'optimisation avec les objectifs suivants :

(i) **augmenter la spécificité du test** : la cartographie des signatures V β établie par le CNR, au regard des 24 principaux répertoires V β (70% des répertoires humains) présente des signatures redondantes pour certaines toxines (par exemple SEB/SEC) et la mesure d'autres répertoires V β pourrait ainsi accroître la spécificité.

(ii) **améliorer sa sensibilité** : dans certains cas, plusieurs déterminations ont été nécessaires afin d'objectiver ou d'exclure une expansion des répertoires V β . En effet, en phase précoce de choc toxique, nous avons observé des diminutions et non une expansion des répertoires ciblés par la toxine. Ainsi, le test doit être idéalement **réalisé 24 à 48h** après l'apparition du choc. L'étude des sous populations lymphocytaires et/ou l'association de marqueurs d'activation précoce (CD69, etc.) pourrait contribuer à une détection précoce des expansions dues aux superantigènes.

(iii) **augmenter le périmètre de réalisation de l'analyse** et faciliter les conditions pré-analytiques. De part la méthodologie, les analyses doivent être réalisées le jour même du prélèvement. Le CNR doit valider cette méthodologie sur des prélèvements de plus de 24h, notamment en modifiant les conditions préanalytiques : utilisation du sang total, séparation préalable des PBMC, utilisation de tubes séparateurs, transport à température maîtrisée.

212. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

L'antibiotype, le typage *agr*, la caractérisation du type de cassette *SSCmec*, le *spa* typing, le MLST, l'analyse des profils de restriction en champ pulsé, les puces à ADN et en cours de développement la MLVA sont les principaux marqueurs épidémiologiques disponibles (cf. chapitre 211. Techniques disponibles).

213. Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence...

Description, conditions de stockage et conditions de mise à disposition de ces collections :

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

Le CNR est à même de fournir des souches représentatives des différents clones de *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline (SARM) diffusant actuellement en milieu hospitalier (SARM-H) et dans la communauté (SARM-C) (France et Pays étrangers), ainsi que des souches représentatives des différentes pathologies (SARM ou SASM) : pneumonies nécrosantes, choc toxique staphylococcique, impétigo bulleux, scarlatine staphylococcique, etc. Ces souches sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) aux laboratoires académiques et hospitaliers sur demande motivée adressée au responsable du CNR sous réserve d'avoir complété la lettre d'agrément pour transfert de matériel du Centre National de Référence des Staphylocoques (Annexe 1).

Le CNR conserve également les souches types représentant les différentes espèces de staphylocoques.

Par ailleurs, le laboratoire a cloné chez *E. coli* et produit sous forme recombinante la totalité des toxines superantigéniques staphylococciques, les différentes leucocidines et hémolysines de *S. aureus*. A l'exception de l'entérotoxine B dont la détention est soumise à autorisation, les autres toxines peuvent être mises à disposition de laboratoires académiques ou hospitaliers dans le cadre de collaborations.

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

214. Activités portant sur des agents de la menace et dans le cadre du réseau national des laboratoires Biotox

Le CNR des staphylocoques, dans le cadre de ses activités de recherche portant sur les toxines staphylococciques, détient un stock d'entérotoxine B. Cette toxine est inscrite à la liste réglementaire des micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOT) (Arrêté du 30 juin 2010 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique) et est susceptible d'être utilisée comme agent de bioterrorisme. Le CNR dispose des autorisations réglementaires pour l'acquisition, la détention et la mise en œuvre permanente pour cette toxine.

Dans les cadres réglementaires prévus, le CNR assure à ce titre la fourniture d'entérotoxine B aux laboratoires du réseau Biotox-Piratox qui en font la demande afin de calibrer, étalonner ou tester leurs outils de détection ou de dosage. Ainsi récemment, le CNR a transmis des échantillons à la Cellule Nationale NRBC de la Gendarmerie Nationale (qui est dotée d'un laboratoire mobile inscrit au réseau Biotox-Piratox) afin de valider ses méthodes pour la recherche de l'entérotoxine B par ticket détecteur immunologique sur différentes matrices.

215. Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR :

2151. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats :

Evaluation des tests immunochromatographiques BinaxNow® *Staphylococcus aureus* pour la détection rapide de *S. aureus* directement dans les flacons d'hémocultures

Le test BinaxNow® *Staphylococcus aureus* est un test immunochromatographique permettant l'identification rapide de *S. aureus* directement à partir de flacons d'hémoculture. Une étude prospective a été effectuée sur les hémocultures du laboratoire de bactériologie du CBPE-Hospices Civils de Lyon présentant un examen direct positif à *cocci* à Gram positif. Soixante quatorze hémocultures (58 patients) ont été incluses. Les résultats obtenus par rapport au Gold Standard (culture + identification phénotypique) ont mis en évidence une sensibilité de 97.7% (43/44) et une spécificité de 86.7% (26/30). Les caractéristiques de ce test apparaissent donc intéressantes. Néanmoins la longueur des centrifugations itératives requises par le protocole de réalisation ainsi que le coût important de ces tests réalisés sur hémocultures positives à *cocci* à Gram positif (correspondant donc pour une grande majorité à des staphylocoques à coagulase négative contaminants) amènent à s'interroger sur le positionnement de ce test en routine de laboratoire.

Milieux New Brilliance™ MRSA Agar (Oxoid) : Evaluation du milieu Brilliance MRSA2 (Oxoid) en comparaison avec le milieu ChromID MRSA (bioMérieux) utilisé en routine, pour la détection de *S aureus* résistant à la méticilline. 646 prélèvements de nez ont été ensemencés en parallèle sur les 2 milieux et incubés 24h à 37°C. Après identification toute discordance concernant la résistance à la méticilline était vérifiée par détection du gène *mecA*.

15 positifs (SARM) ont été retrouvés sur les 2 milieux ainsi que 2 faux positifs sur le milieu Brilliance (S aureus metiS) ce qui donne des valeurs de sensibilité, spécificité, VPP, VPN de 100% pour le ChromID MRSA et de 100, 99.7, 88.2, 100% pour le Brilliance MRSA2.

Concernant la sélectivité quelques Bacilles à Gram négatif qui sont des BMR, dont les colonies sont facilement identifiables (colonies brillantes et de taille supérieure à celle des staphylocoques) peuvent exceptionnellement donner de faux positifs sur ces milieux : 1 cas pour le ChromID MRSA et 2 pour le Brilliance MRSA2 sur les 646 prélèvements.

Le CNR participe depuis fin 2011 à **l'étude Microbs (Novartis)** concernant la sensibilité aux antibiotiques de souches de staphylocoques, étude qui se poursuivra en 2012.

Cette ouverture aux transferts de technologie s'applique aussi à nos collègues étrangers avec des transferts de compétence et de techniques (Algérie, Inde). Ces échanges ont été notamment soutenus par des fonds de l'Union européenne, du CNRS, des gouvernements des pays d'origine.

22. Activité d'expertise de l'année 2011

221. Décrire le nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...)

En 2011, le CNR a reçu **3022** souches. **1359** souches ont été reçues dans un but d'expertise toxinique et de recherche de résistance aux antibiotiques. Ces souches provenaient d'une centaine de villes françaises (180 hôpitaux, 53 LABM) mais aussi des territoires d'outre-mer (Pointe à Pitre, Papeete, Mayotte, Fort de France, Saint Denis de la Réunion, Saint Paul). Nous avons reçu **1663** souches ou ADN de pays étrangers et /ou France (métropole et Outre mer) dans le cadre de protocoles ou études diverses. Ces souches venaient des pays suivants : Algérie, Allemagne, Angleterre, Danemark, France (métropole, Antilles, Mayotte, Ile de la Réunion), Sénégal, Suisse, Trinidad, Turquie, USA.

Toutes ces souches ont bénéficié d'une analyse complète à savoir vérification de l'antigiogramme et caractérisation complète de la souche par puce à ADN.

222. Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats

voir chapitre 32. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

223. Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

Le CNR a distribué 268 souches de ses collections : 146 en France et 122 à l'étranger (Danemark, Allemagne, Suisse, Slovénie, Angleterre, Inde, USA).

3. Activités de surveillance

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

311. Réseau de partenaires :

Les souches reçues au CNR des staphylocoques sont envoyées par l'ensemble des CHU, CHG de France métropolitaine mais aussi par un nombre croissant de LABM et d'hôpitaux ces dernières années. Les 1359 souches reçues au CNR en 2011 pour expertise (virulence et résistance sont donc bien le reflet de l'épidémiologie de l'ensemble des régions françaises hors protocole. Nous recevons également des souches de l'étranger dans le cadre de collaboration nous permettant d'améliorer la connaissance de l'épidémiologie de *S. aureus* dans ces pays.

312. Evaluation et caractéristiques des infections

3121. Données générales

Entre 2006 et 2011, le CNR a reçu **11971** souches de staphylocoques pour expertise avec une augmentation importante du nombre de souches reçues chaque année, ce nombre passant de 1200 en 2006 à **3022 en 2011** (Figure 1).

En 2011, **1359** souches ont été reçues dans un but d'expertise toxinique et de recherche de résistance aux antibiotiques. Ces souches provenaient d'une centaine de villes françaises (180 hôpitaux, 53 LABM) mais aussi des territoires d'outre-mer (Pointe à Pitre, Papeete, Mayotte, Fort de France, Saint Denis de la Réunion, Saint Paul). Nous avons reçu **1663** souches ou ADN de pays étrangers et /ou France (métropole et Outre mer) dans le cadre de protocoles ou

études diverses. Ces souches venaient des pays suivants : Algérie, Allemagne, Angleterre, Danemark, France (métropole, Antilles, Mayotte, Ile de la Réunion), Sénégal, Suisse, Trinidad, Turquie, USA.

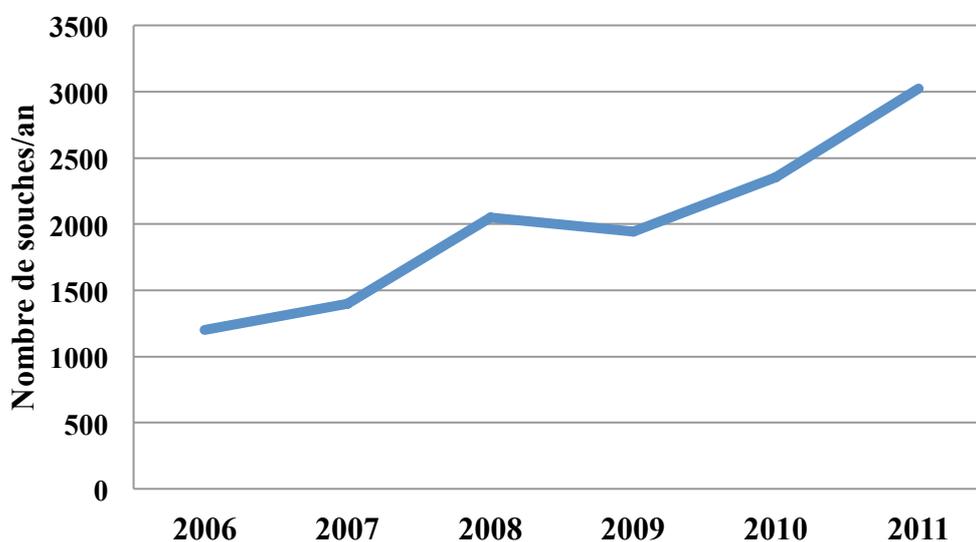


Figure 1- Evolution du nombre de souches reçues au CNR entre 2006 et 2011.

Le nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines rapportées en France est en légère augmentation avec 117 cas en 2011 contre 91 cas en 2010 (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines par syndrome recensées par le CNR des Staphylocoques entre 2006 et 2011 en France.

Année	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc toxique staphylococcique	Scarlatine staphylococcique	Total Syndromes/an
2006	32	20	32	11	95
2007	18	16	27	19	80
2008	11	18	26	11	66
2009	10	19	31	12	72
2010	16	22	43	10	91
2011	23	26	61	7	117

L'étude des corrélations clinico-biologiques entre le profil toxinique et la présentation clinique a permis de dégager des informations importantes pour les différents syndromes toxiques (cf ci-dessous).

3122. Chocs toxiques staphylococciques et scarlatine staphylococcique.

Depuis 2006, le CNR a analysé 220 souches de choc toxique staphylococcique (CTS) et 70 souches de sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique (Figure 2).

En 2011, 61 cas de CTS ont été rapportés, dont **19 cas de CTS menstruels** ; ces chiffres, continuent à augmenter par rapport aux années précédentes. L'âge des patientes s'étend de 13 à 37 ans avec une médiane de 19,5 ans. Les cas ne semblent pas reliés à l'utilisation d'une marque particulière de protection périodique. Le pronostic était favorable. Onze souches isolées possédaient les gènes codant la TSST-1, l'entérotoxine A et un allèle de type *agr3* appartenant au clone majoritaire associé au CTS diffusant actuellement dans la communauté (CC30). Sept souches possédaient uniquement le gène codant la TSST-1 et une souche ne possédait pas le gène codant la TSST-1, mais celui codant l'entérotoxine C, un allèle *agr 2*. Aucune des souches responsables des cas menstruels n'était résistante à la méticilline.

Dans les **42 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 patients s'étend de 1 à 82 ans avec une médiane d'âge de 36,02 ans tandis que le *sex ratio* ♂/♀ de ces patients est 25/17. Vingt-huit souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 14 autres souches possédaient au moins un gène codant un autre superantigène majeur (SEA, SEB ou SEC).

• **Sept cas de scarlatine staphylococcique** ont été rapportés. L'âge des patients s'étale de 1 à 16 ans avec une médiane d'âge de 5,4 ans tandis que le *sex ratio* ♂/♀ est de 4/3. Ces manifestations sont survenues au décours d'infections diverses (infections cutanées, pharyngite, ostéite, arthrite), communautaires ou nosocomiales. Quatre souches possédaient au moins le gène codant la TSST-1, 3 autres possédaient au moins un gène codant une entérotoxine (SEB, SEP). Aucune souche n'était résistante à la méticilline.

Chocs toxiques staphylococciques et formes mineures

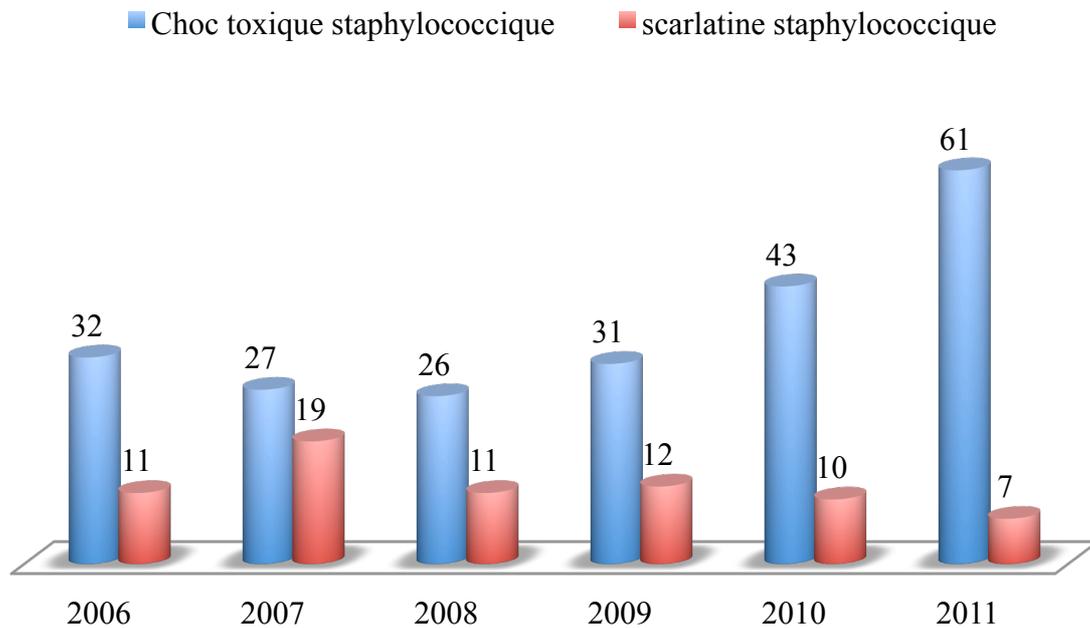


Figure 2- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour choc toxique staphylococcique et formes mineures entre 2006 et 2011.

Détermination des répertoires V β dans un contexte de choc toxique ou de maladie de Kawasaki

Au cours de l'année 2011, le CNR a réalisé **17 déterminations** « V β » concernant 13 patients. Ces déterminations concernaient 10 enfants (sexe ratio ♂/♀ : 2/3 ; âge moyen : 7,8 ans) et 3 adultes (sexe ratio ♂/♀ : 1/2 ; âge moyen : 45,7 ans) hospitalisés au CHU de Lyon excepté pour 1 cas (Hôpital Saint Joseph - Saint Luc, Lyon). Les principaux motifs de demande de cette analyse reposaient sur l'association d'une fièvre, d'une hypotension avec ou sans choc et une érythrodermie. Ils avaient pour but d'aider à affirmer ou à infirmer les diagnostics de chocs toxiques, qu'ils soient staphylococciques ou streptococciques ; ou de syndrome de Kawasaki. Dans 9 cas sur 13, cette analyse se révéla contributive, faisant ou aidant au diagnostic de certitude. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) résume les contextes et résultats obtenus.

Tableau 2. Contexte clinique et résultats obtenus par l'analyse des répertoires V β du TCR.

Pathologie diagnostiquée	Présence d'expansion(s) des répertoires « V β » du TCR des Ly T		Absence d'expansion(s) des répertoires « V β » du TCR des Ly T		Total
	Souche responsable isolée (nature)	Absence de souche isolée	Souche responsable isolée (nature)	Absence de souche isolée	
CTS-M	2 (<i>S. aureus</i> <i>tst</i> ⁺)	/	/	/	2
CTS-NM	2 (<i>S. aureus</i> <i>tst</i> ⁺)	/	/	/	2
Syndrome de Kawasaki	/	/	/	2	2
CTStrepto	5 (<i>S. pyogenes</i> <i>speA</i> ⁺)	/	/	/	5
Choc septique	/	/	/	2	2
Total	9	0	0	4	13

Abréviations : CTS-M : choc toxique staphylococcique menstruel ; CTS-NM : choc toxique staphylococcique non menstruel ; CTStrepto : choc toxique streptococcique.

Dans 4 cas, la détermination des répertoires V β a été réalisée 2 fois : l'objectif était de mettre en évidence une variation du profil, la première détermination étant douteuse, elle permit le diagnostic de CTStrepto dans 2 cas et d'exclure une participation superantigénique dans les 2 autres cas.

Au sujet des CTS-M et NM, l'analyse comparative des profils toxiques (toxintypie) des souches de *S. aureus* correspondantes (isolées dans tous les cas) ont montré la présence du gène *tst* codant la TSST-1.

Au sujet du cas de CTStrepto, l'analyse toxinique de la souche de *S. pyogenes* fut réalisée par le CNR des Streptocoques (Pr. Claire POYART) montrant la présence du gène *speA* codant la SPEA dont la signature V β avait été détectée.

Au sujet des syndromes de Kawasaki, aucune expansion V β n'a été mesurée en accord avec les données de la littérature, ne retrouvant pas systématiquement une activation V β dépendante et suggérant l'hétérogénéité des mécanismes étiologiques responsables²⁹.

Au sujet des cas de choc septique, aucune expansion V β caractéristique d'une toxine superantigénique staphylococcique ou streptococcique n'a été mesurée en accord avec les données microbiologiques et celles de la littérature³⁰.

²⁹Yarwood JM, Leung DY, Schlievert PM. Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome. FEMS Microbiol Lett. 2000;192(1):1-7.

Evolution par rapport à l'année 2010

Par rapport à 2010, le CNR avait réalisé 18 déterminations pour 13 patients soit une stabilité du nombre de demandes. Du fait du nombre limité de cas et de ses contraintes pré-analytiques, l'analyse ne peut être réalisée que pour des patients hospitalisés dans une zone géographique limitée et bénéficiant de moyens de transport performant vers le CHU de Lyon, expliquant ainsi la stabilité du nombre de demandes. Par ailleurs, l'analyse s'est révélée contributive dans 70% des cas en 2011 contre 56% en 2010. Cette augmentation peut s'expliquer par un meilleur positionnement de l'analyse au cours des pathologies suspectes d'impliquer un mécanisme toxique.

Conclusions et perspectives pour l'année 2011.

Au total, l'année 2011 montre une stabilisation des demandes d'« analyses V β ». On note une prescription mieux ciblée et son recours pour des cas de diagnostic de chocs toxiques nécessitant un diagnostic de certitude ou au cours des maladies de Kawasaki. Différents projets d'évolution et/ou d'amélioration de l'analyse V β avaient été fixés pour 2011.

Etude de la stabilité et de la faisabilité de l'analyse V β à partir de prélèvements sanguins datant de plus de 24h : Cette étude a été réalisée à partir de tubes de sang provenant de l'établissement français du sang (EFS). Elle montre un coefficient de variation moyen sur les 23 répertoires V β de 2.4% ; 10.5% et 17.3% sur un prélèvement >24h, >48h et > 72h conservé à température ambiante. Au total, ces résultats démontrent que l'analyse est réalisable à partir de prélèvements datant de 24h-48h maximum, conservés à température ambiante. A terme, ces données devraient permettre un accroissement de la zone géographique dans laquelle l'analyse pourrait être réalisée par le CNR.

Autres projets : Le transfert de cette analyse sur un nouveau cytomètre de flux située sur un plateau commun, le CMF actuel étant proche de la fin d'exploitation ; l'amélioration de la sensibilité de l'analyse (i.e. détection précoce d'altérations et/ou d'expansions) grâce à la combinaison à des marqueurs cellulaires d'activation précoce tout comme l'amélioration de la spécificité de l'analyse en ciblant les sous populations lymphocytaires T notamment, CD4 et CD8 n'ont pas été réalisés, en raison d'une priorisation dans les différents projets du CNR.

³⁰Ferry T, Thomas D, Perpoint T, Lina G, Monneret G, Mohammedi I, et al. Analysis of superantigenic toxin Vbeta T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. Clin Microbiol Infect. 2008;14(6):546-54.

3123. Syndromes d'exfoliation staphylococcique

En 2011, le CNR a analysé 51 souches provenant de 49 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en **23 cas de maladie exfoliante généralisée** et **26 cas d'impétigo bulleux** (Figure 4)

Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

Actuellement, grâce à l'expertise du Dr Pascal Del Giudice avec qui nous collaborons depuis 2003, nous nous intéressons à ce qui semble être une **forme mineure de la maladie exfoliante généralisée** caractérisée par un exanthème desquamatif du cou, des plis axillaires et périnéaux, associé à un syndrome fébrile et un impétigo facial. En 2011, nous avons observé 2 cas de formes mineures de maladie exfoliante généralisée. Nous allons poursuivre la surveillance de ce type particulier de syndrome d'exfoliation et colliger les cas afin de mieux caractériser cette infection tant sur le plan clinique que microbiologique. Cette meilleure connaissance des spécificités des staphylococcies cutanées a des implications sur la prise en charge des patients. En effet, les signes cutanés d'une forme mineure d'exfoliation peuvent se confondre avec une scarlatine staphylococcique, cette deuxième maladie ayant toujours un risque potentiel d'évolution vers le choc toxique staphylococcique ce qui n'est pas le cas de la première.

En 2011, pour les 22 cas pédiatriques, l'âge des patients ayant présenté une **exfoliation généralisée staphylococcique classique** s'étend de quelques jours à 5 ans avec une médiane de 1,9 ans tandis que le sex ratio ♂/♀ de ces patients est 15/7. Quatorze souches possédaient les gènes codant les exfoliatines A et B (ETA et ETB), 5 souches l'ETA seule et 3 souches l'ETB seule. Un seul cas d'exfoliation généralisée a été rapporté chez une adulte âgée de 38 ans, souffrant d'insuffisance rénale. La souche possédait les gènes codant les exfoliatines ETA et ETB.

A noter qu'une souche appartenait au complexe clonal CC509 exceptionnel en France mais classiquement décrit au Japon. Il s'agit **d'une souche résistante à la méticilline**, productrice d'exfoliatine et responsable de SSSS.

Syndromes d'exfoliation staphylococciques

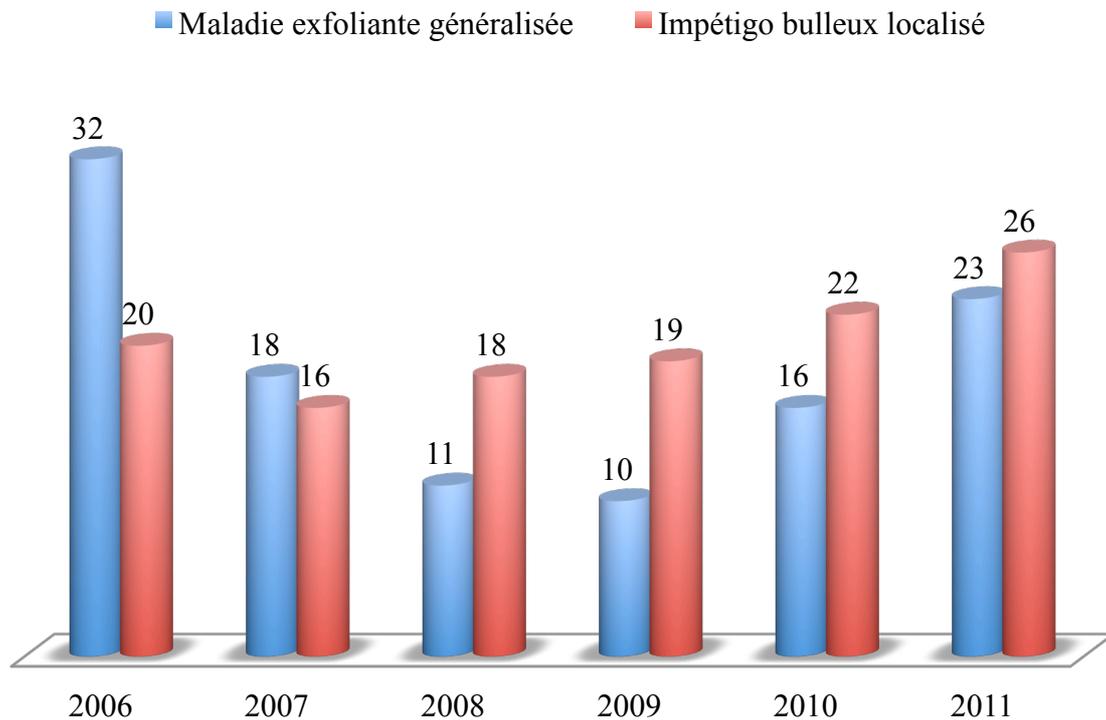


Figure 4- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour syndrome d'exfoliation staphylococcique entre 2006 et 2011.

En 2011, l'âge des patients ayant présenté un **impétigo bulleux** s'étend de quelques jours à 50 ans avec une médiane de 9,8 ans tandis que le *sex ratio* ♂/♀ de ces patients est 9/17. Huit souches possédaient les gènes codant ETA et ETB, 12 souches l'ETA seule, 6 souches l'ETB seule. Une souche isolée chez un adulte présentant une septicémie avec des signes cutanés était résistante à la méticilline et appartenait au complexe clonal CC88 diffusant actuellement en Afrique.

3124. Infections cutanées à *S. aureus* PVL+

Le CNR reçoit un nombre croissant de souches dans le cadre d'infections cutanées principalement dans deux contextes. Tout d'abord des souches de SARM présentant un profil de résistance évocateur de SARM-C qui alerte le bactériologiste et l'incite à adresser la souche au CNR. Deuxièmement des souches de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infections récidivantes ou nécessitant un drainage chirurgical voire dans un contexte de diffusion intra-familiale d'infections staphylococciques.

Ainsi en 2011, nous avons expertisé **263 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès). La proportion de souches PVL+ est de 50% au total mais de 85,7% dans les infections primitives. Parmi les souches PVL+, il y a 38% de SARM (Figure 5). Il s'agit en majorité d'infections communautaires et les principaux clones de SARM sont représentés avec évidemment une majorité des clones diffusant actuellement en Europe et en Afrique du nord : le **clone ST80** (*agr3*, PVL+, *mecA*+). Nous avons également quelques cas d'infections avec le clone d'origine Nord américaine et à diffusion mondiale : le clone **USA300** (*agr1*, PVL+, *mecA*+) et quelques cas dus au clone océanien **ST30** (*agr3*, PVL+, *mecA*+) (Figure 6).

Infections suppuratives 2011 (n=263)

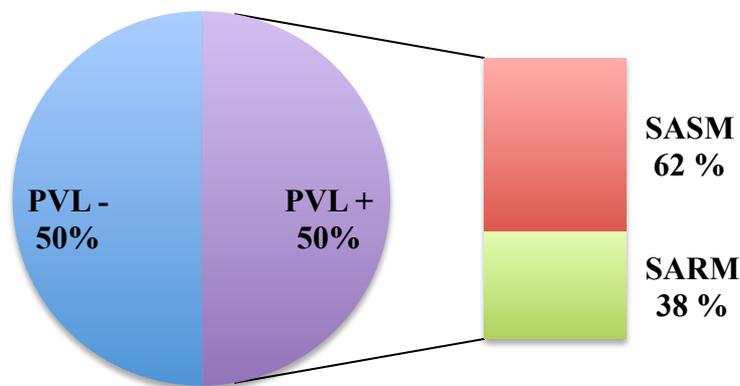


Figure 5- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2011.

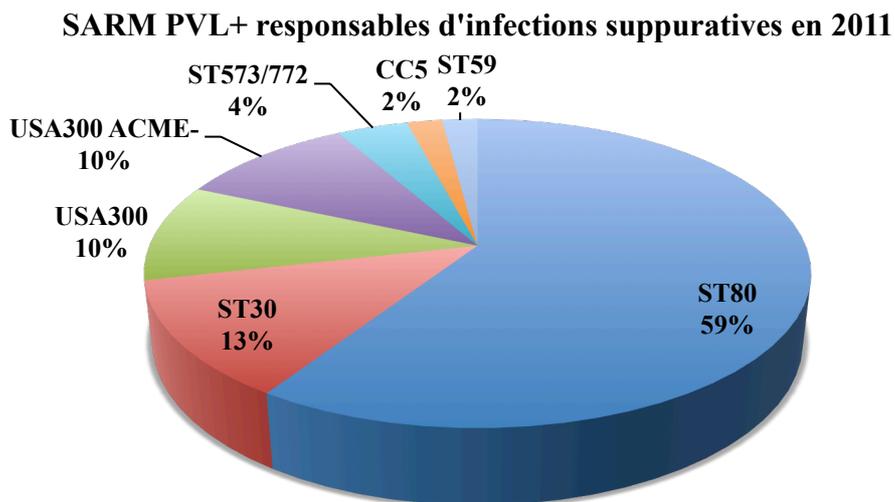


Figure 6- Caractéristiques des clones de SARM communautaires PVL responsables d'infections suppuratives en 2011.

3125. Furonculoses Familiales.

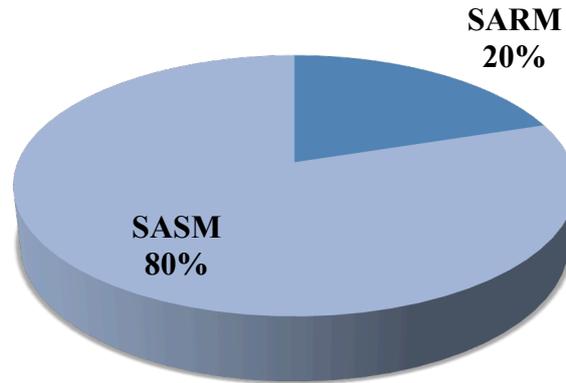
En 2011, **20 recherches directes** des gènes codant la PVL dans un contexte de furonculose familiale ont été effectuées à partir d'écouvillonnage de **sites de portage** (nez, gorge, périnée, anus) à l'hôpital femme/mère/enfant pour la détection des **porteurs** sains ou symptomatiques et vérifier l'efficacité de la **décontamination**. En collaboration avec les infectiologues pédiatres (Pr Daniel Floret, Dr Yves Gillet, Dr Laure Hees) nous continuons à suivre 3 familles non reliées au plan épidémiologique et présentant des furonculoses récidivantes avec des souches sensibles à la méticilline, *agr3*, possédant les gènes codant la PVL, les entérotoxines A, H, K, Q et résistantes à la pénicilline G, à l'acide fusidique mais surtout **résistantes à la chlorhexidine et à la mupirocine** rendant difficile la décontamination.

Concernant les furonculoses familiales venant d'autres laboratoires, nous avons reçu 6 demandes d'expertise pour recherche de leucocidine de Panton Valentine dans un contexte d'infections cutanées à diffusion intrafamiliale avec différentes souches d'infections et de portage pour chacun des membres des différentes familles.

3126. Pneumonies staphylococciques nécrosantes et pleuro-pneumopathies liées à la production de la leucocidine de Panton Valentine.

La pneumonie nécrosante n'étant pas pour le moment une maladie à déclaration obligatoire, il est possible que le nombre de cas réels soit sous-estimé. De la même façon, il est possible que nous ayons un biais de recrutement c'est-à-dire que seuls les cas graves ou avec un antibiogramme caractéristique du SARM-C diffusant actuellement en Europe et en Afrique du nord ne soient signalés et/ou adressés au CNR. Dans le but de mieux comprendre et donc prendre en charge cette pathologie, un PHRC a été lancé afin de répondre à plusieurs questions : (i) La PVL est-elle un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumopathies communautaires graves à *S. aureus*. (ii) Quels sont les facteurs (cliniques, biologiques, thérapeutiques) de pronostic favorable associés à la maladie ? (iii) Quel est le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches de pneumonie nécrosante ? (iv) Existe-t-il une susceptibilité génétique de l'hôte à l'origine de la rareté et de la sévérité de cette maladie ? Afin de répondre à ces questions ce projet de recherche comporte un volet observationnel et un volet immunogénétique. Tous les hôpitaux français ont été sollicités pour rapporter les cas définis comme une pneumonie communautaire sévère (nécessitant une hospitalisation en réanimation) à *S. aureus* producteur ou non de PVL. Entre **novembre 2010 et mars 2012, 47 patients** (sex ratio ♂/♀ 26/21, de 1 mois à 79 ans) ayant présenté une pneumonie nécrosante ont été inclus (Figure 7).

Pneumonies nécrosantes PVL- novembre 2010 à mars 2012 (PHRC)



Pneumonies nécrosantes PVL+ novembre 2010 à mars 2012 (PHRC)

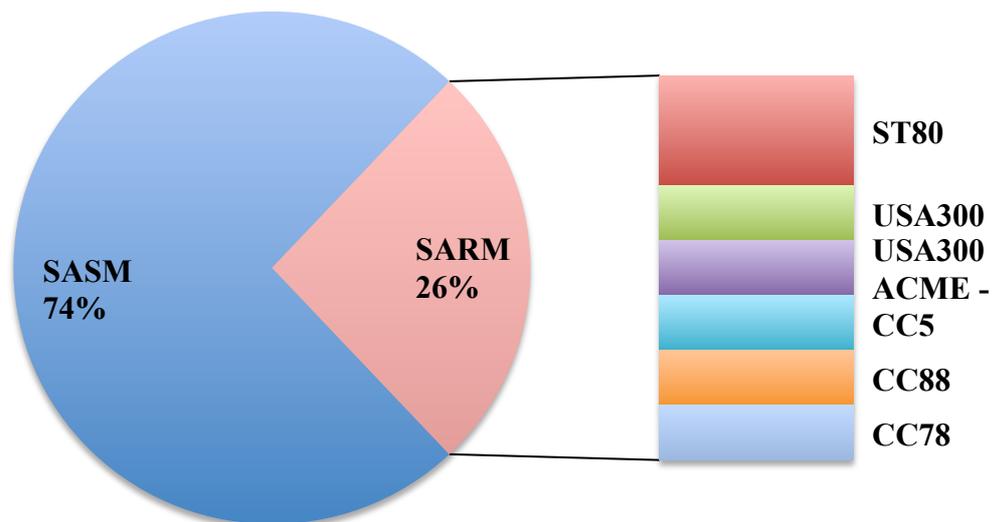


Figure 7- Caractéristiques des souches de *S. aureus* responsables de pneumonies nécrosantes entre **novembre 2010 et mars 2012 (PHRC)**.

Ce PHRC est toujours en cours et l'analyse des données cliniques et immunologiques ne sera réalisée qu'ultérieurement. En revanche, le résultat préliminaire de la Figure 7 confirme la prévalence élevée de la résistance à la méticilline des souches PVL+ (26%). Ce chiffre justifie de notre point de vue la prise en compte du risque de SARM dans l'antibiothérapie probabiliste des pneumonies communautaires PVL+. On notera par ailleurs le chiffre de 20% de SARM dans les pneumonies communautaires PVL-, chiffre qui justifie donc aussi la prise en compte du risque SARM dans le traitement probabiliste de ces pneumonies. Bien

évidemment ces chiffres sont à considérer avec réserve compte tenu de l'effectif et seront affinés au fur et à mesure du déroulement de ce PHRC.

3127. Intoxications alimentaires individuelles et collectives

Début 2011, le CNR a été nommé expert par le tribunal de grande instance d'Avignon dans le cadre d'une suspicion de TIAC avec décès d'un cas survenu dans les suites d'un repas dans un établissement de restauration rapide du sud de la France.

3128. Ostéites et infections ostéo-articulaires

Depuis 2007, nous avons expertisé 110 souches d'infections ostéo-articulaires (15 en 2007, 13 en 2008, 30 en 2011) (Figure 8).

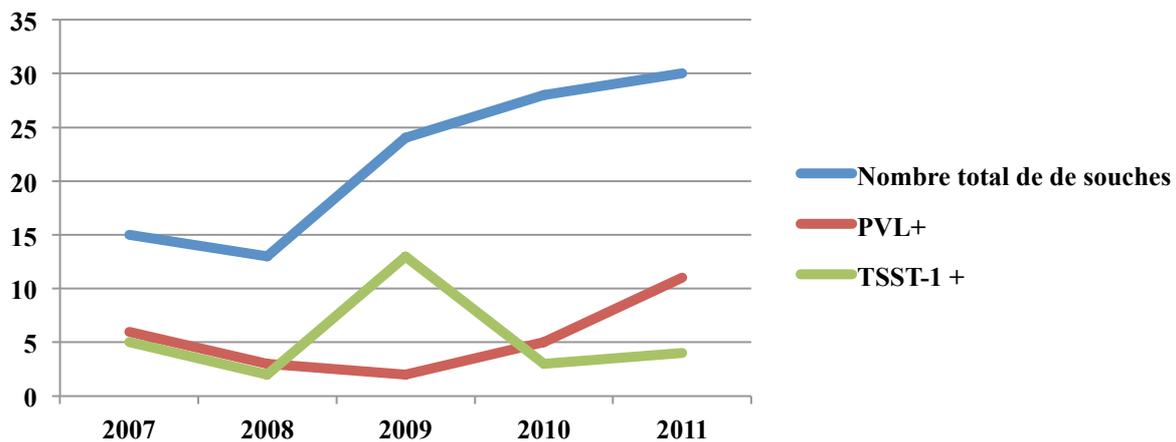


Figure 8- Evolution du nombre de souches reçues au CNR pour infection ostéo-articulaires entre 2007 et 2011.

En 2011, nous avons reçu pour expertise **30 souches** de *S. aureus* isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire, les patients étant âgés de 2 mois à 97 ans (médiane d'âge 39,8 ans) avec un *sex ratio* ♂/♀ de 22/8. Les tableaux cliniques sont très divers : ostéomyélites aiguës de l'enfant, ostéoarthrites, infections sur prothèse,...Quatre infections étaient liées à des souches productrices de la TSST-1. Onze infections étaient dues à des souches portant le gène codant la leucocidine de Pantone Valentine. Parmi ces dernières, quatre souches étaient sensibles à la méticilline tandis que les 7 autres étaient des SARM-C. Ces souches étaient isolées dans un contexte d'infection ostéo-articulaire en rapport avec une furonculose récidivante.

313. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

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

Fruit de cette collaboration et de ces échanges réguliers, un groupe de travail a été constitué sous l'égide de l'InVS pour la rédaction d'un argumentaire pour la mise en place d'une surveillance nationale des pneumonies sévères à *S. aureus* à travers l'inscription sur la liste des maladies à déclaration obligatoire en France (voir contribution à l'alerte).

L'organisation conjointe CNR-InVS du colloque biennal SympoStaph (voir ci-dessous) constitue aussi une illustration des interactions étroites qui existent entre les deux partenaires autour de la thématique des infections staphylococciques.

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

Les objectifs de la collaboration entre le CNR des staphylocoques et l'InVS sont donc :

- (i) de surveiller et de suivre les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches de SASM et de SARM circulants en France,
- (ii) d'alerter l'InVS sur l'apparition de possibles cas groupés à partir des informations transmises au CNR et/ou des souches qui lui sont adressées,
- (iii) de détecter l'apparition de nouveaux clones présentant des facteurs de virulence ou des résistances aux antibiotiques particuliers,
- (iv) de surveiller l'émergence et la dynamique des clones de SARM communautaires,
- (v) de participer, en cas de décision positive de l'HAS, à la mise en place et au suivi de la DO des pneumopathies nécrosantes (voir chapitre programme d'activité N+1, N+2)

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

Un des exemples de la collaboration avec l'InVs pour 2011 est l'alerte lancée par le CNR concernant la détection du nouveau variant du gène *mecA* (voir Alerte).

314. Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement

ANSES /Resapath

Staphylococcus aureus est considéré comme un pathogène et comme un commensal chez les animaux et de nombreuses études ont détaillé leur prévalence dans diverses populations animales. Dans le cadre de la surveillance des SARM chez les animaux, le CNR des staphylocoques a mis en place avec l'ANSES Lyon une collaboration pérenne visant à suivre l'implication des souches à la fois dans la colonisation et les infections animales. Le CNR assure la caractérisation de l'ensemble de souches de MRSA identifiées par l'ANSES Lyon via le réseau RESAPATH.

En 2011, une première étude rétrospective a été conduite en collaboration sur les animaux de compagnie. Le but de cette étude était d'estimer la prévalence des infections à SARM chez ces animaux de compagnie en France et de comparer les clones identifiés avec ceux circulant chez l'Homme. Entre 2006 et 2010, 1250 souches de staphylocoques à coagulase positive issues d'animaux de compagnie d'origines géographiques variées ont été analysées par diffusion en gélose, et toutes les souches résistantes à la céfoxitine ont été caractérisées au niveau moléculaire (PCR *mecA*, microarray) et typées par *spa*-typing et PFGE. La prévalence des SARM chez les animaux de compagnie est faible (23/1250, 1,84%), mais la très large majorité d'entre eux (87%) sont des clones invasifs humains fréquents en France. Deux clones humains majeurs ont été retrouvés: le clone Lyon (16/23) et le clone Géraldine (2/23). Deux clones atypiques, un ST22 Barnim et un variant du clone USA300, ont également été identifiés, tous deux présentant un lien épidémiologique direct avec l'Allemagne et les USA (respectivement), où ces clones sont endémiques. Le clone ST398 a par ailleurs été identifié chez 3 animaux. Ainsi, Sur une période de 5 ans, la prévalence des infections à SARM chez les chiens et les chats reste globalement faible (<2%), mais la distribution des clones reflète très largement l'épidémiologie humaine. Ces résultats suggèrent donc que les animaux de compagnie sont à la fois victimes et vecteurs potentiels de SARM humains épidémiques, endémiques et/ou invasifs et que ce réservoir ne doit pas être méconnu dans l'exploration et la

gestion des infections staphylococciques notamment en cas de formes récidivantes ou épidémiques intra-familiales ou au sein de collectivités.

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

321. Données globales

En 2011 : 98 souches de staphylocoques ont été reçues. Il s'agit de 70 souches de *S. aureus* et de 28 souches de staphylocoques à coagulase négative, ces souches proviennent de 52 centres.

Le nombre de centres ayant fait parvenir des souches au CNR pour étude de la résistance est beaucoup plus important que les 5 années précédentes (27 à 52 centres de 2006 à 2011), ce qui s'explique par la plus grande diversité des phénotypes de résistance en particulier la résistance isolée à la méticilline avec demandes de gènes *mec A* ou *C* et par l'abaissement des bornes du CA SFM pour les glycopeptides.

Tableau 1. Origine géographique et nombre de souches de staphylocoques adressés au CNR en 2011 pour expertise concernant la résistance aux antibiotiques.

Provenance	Nb de Souches	<i>S. aureus</i>	SCN
Ajaccio	1	1	
Albertville	1	1	
Amiens	1	1	
Angoulême	1	1	
Annecy	1		1
Annonay	3	2	1
Antibes	1	1	
Belfort	1	1	
Béthune	1	1	
Béziers	1		1
Bordeaux	1		1
Bourg en Bresse	1		1
Cahors	3	3	8
Chalon sur Saône	7		7
Chalon en Champagne	1	1	
Chambéry	1		1
Compiègne	1	1	
Creil	2	1	1
Gap	1	1	
Garches	1	1	
Grenoble	9	9	
Istanbul	1	1	
L'Arbresle	2	2	
La Roche sur Yon	1	1	
Lons le Saunier	1	1	
Louhans	1		1
Lunéville	2	2	
Lyon autres centres	3	2	1
Mantes la Jolie	1	1	

Meaux	2	1	1
Metz	1		1
Montélimar	1	1	
Montereau	1	1	
Montpellier	14	14	
Neuilly	1	1	
Nouvelle Calédonie	1	1	
Orthez	1		1
Papeete	1	1	
Passy	1	1	
Paris	2	2	
Perpignan	1	1	
Pointe à pitre	2	2	
St Martin d'Hères	3	2	1
St Nazaire	1	1	
Salon	1	1	
Toulon	1	1	
Toulouse	3	0	3
Tourcoing	2	2	
Vesoul	1		1
Vienne	1		1
Villefranche	2		2
Voiron	1	1	
Total	98	70	28

322. Recherche ou confirmation du gène *mecA*

Hormis les PCR *mecA* réalisées systématiquement pour l'ensemble des souches adressées pour expertise, le CNR a été sollicité spécifiquement pour la recherche du gène *mecA* par PCR. Dans ce contexte, **46** souches ont été analysées : 38 *S. aureus* et 8 staphylocoques à coagulase négative.

Un résultat a été rendu positif dans 22 cas (dont 4 staphylocoques à coagulase négative). 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 24 cas (dont 4 staphylocoques à coagulase négative) pour des souches phénotypiquement sensibles à l'oxacilline. 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 céfoxitine était compris entre 25 et 27 mm, ou de souches avec des profils de résistance moins habituels : souches multirésistantes aux antibiotiques, souches résistantes isolément aux aminosides, fluoroquinolones ou macrolides.

Pour les Hospices civils de Lyon, 118 recherches du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été effectuées en 2011 : **89** *S. aureus* et **29** staphylocoques à coagulase négative, **57** se sont avérées positives (dont 20 Staphylocoques à coagulase négative) et **61** négatives (dont 9 Staphylocoques à coagulase négative). Ces recherches ont été effectuées pour vérification d'antibiogramme conformément aux recommandations du CA SFM ou dans le cadre de protocoles.

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

L'étude a été effectuée pour **39** souches de laboratoires extérieurs, l'envoi était justifié par des CMI de vancomycine et/ou de teicoplanine > 2 mg/l selon les nouvelles recommandations du CA-SFM, un test de criblage positif en particulier sur des souches de mucoviscidose, ou pour des souches isolées en orthopédie.

18 souches ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Il s'agissait principalement de souches inductibles en présence de glycopeptides, isolées de prélèvements broncho-pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose, **21** souches étaient sensibles aux glycopeptides après analyses de populations. Parmi ces souches il s'agit principalement de souches envoyées pour CMI ETest à 3 ou 4 mg/l pour les glycopeptides.

Pour les Hospices Civils de Lyon, la recherche est effectuée systématiquement sur les souches de SARM de mucoviscidose (82), les souches détectées intermédiaires ou résistantes à la teicoplanine sur l'antibiogramme en microdilution et pour quelques malades d'orthopédie. Parmi les patients atteints de mucoviscidose **9 souches** ont été confirmées de sensibilité diminuée au glycopeptides, souches isolées chez 5 enfants, dont 4 connus les années précédentes.

Hors mucoviscidose, **11** autres souches ont été analysées, **5** se sont révélées de sensibilité

diminuée aux glycopeptides chez des patients d'orthopédie ou atteints de pathologies chroniques.

324. Recherche de résistance à d'autres antibiotiques

28 demandes de laboratoires extérieurs ont concerné des confirmations d'antibiogrammes et de CMI. 21 concernaient des staphylocoques à coagulase négative, notamment pour confirmation de CMI élevées à la teicoplanine et au linézolide cf ci-dessous.

325. Résistance au linézolide

En 2011, le CNR a expertisé 6 souches résistantes au linézolide, 3 souches provenant du CHU de Toulouse et 3 souches provenant du CH de Chalon sur Saône : 5 souches de *S. epidermidis* et 1 souche de *S. hominis* (Toulouse). Les 5 souches présentaient des mutations dans l'ARN 23S. Les mutations identifiées étaient :

- G2576U pour la souche de *S. hominis*, il s'agit de la mutation la plus fréquente et
- A2504T pour les souches *S. epidermidis* ; il s'agit de mutation extrêmement rare mais déjà rapportée dans la littérature.

Après analyse en champ pulsé, les souches de Chalon présentent un très fort lien de clonalité.

326. Recherche du variant du gène *mecA* (communications à la RICAI 2011)

Nouveau variant du gène *mecA* : détection, identification, confirmation et caractérisation moléculaire en routine.

F. Laurent⁶⁻⁷, A.R. Larsen¹, A. Tristan⁶⁻⁷, M. Bes⁶⁻⁸, J.W. Decousser³, A.S. Poirier⁴, H. Chardon², M. Haenni⁵, F. Doucet-Populaire³, M.E. Reverdy⁶⁻⁸, R. Skov¹, F. Vandenesch⁶⁻⁸
¹Laboratoire de bactériologie, Serum Staten Institut, Copenhague, Danemark ²Laboratoire de bactériologie, Hôpital d'Aix-en-Provence ³Laboratoire de bactériologie et d'hygiène hospitalière, Hôpital Antoine Béclère - APHP, Clamart ⁴Laboratoire de bactériologie, Hôpital de La Roche-sur-Yon, La Roche-sur-Yon ⁵Anses ⁶Centre National de Référence des Staphylocoques ⁷Laboratoire de bactériologie, Centre Biologie Nord ⁸Laboratoire de bactériologie, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Objectif : La découverte récente d'un variant du gène *mecA*, *mecA*_{LGA251}, présentant moins de 65 % d'homologie avec le gène *mecA*, nous a amené à nous interroger sur i) la diversité génétique des souches portant ce nouveau gène, ii) la capacité des techniques phénotypiques et génotypiques de routine à assurer leur détection, leur identification et leur confirmation.

Méthode : Soixante-onze souches humaines et une souche animale, d'origine danoise et française, résistantes à la cefoxitine en diffusion et portant le gène *mecA*_{LGA251} ont été incluses. Elles ont d'abord été caractérisées au niveau moléculaire par puces à ADN et *spa*-typing. Ont été testés : i) 4 milieux sélectifs chromogéniques utilisés pour screening des SARM, ii) 3 galeries d'antibiogrammes en milieu liquide, iii) 4 protocoles de détection immunologique de la PBP2a, iv) 5 kits de biologie moléculaire pour l'identification des SARM.(voir Table)

Résultats : Soixante souches appartenaient au complexe clonal CC130 (*agr* 3, 10 *spa*-types différents) and 12 aux CC1945 (*agr* 4, 4 *spa*-types différents). A l'exception des bêta-lactamines, les souches étaient toutes sensibles aux autres classes d'antibiotiques.

		Souche <i>mecA</i> _{LGA251} n=72	
		Pos	Neg
Screening SARM	ChromID MRSA (BM)	72	0
	Brilliance MRSA 2 (Oxoid)	72	0
	BBL CHROMagar MRSA II (BD)	60	12
	MRSA Select (BioRad)	37	35
ATB milieu liquide	Vitek (BM)	69	3
	Phoenix (BD)	60	12
	Microscan, Siemens	70	2
PLP2a Immunologique	Clearview PBP2A (Alere)	10	62
	Clearview PBP2A + induction cefox	72	0
	PBP2a agglutination (Oxoid)	1	71
	PBP2a agglutination + induction cefox	1	71
		Pos	Neg
Méthode moléculaire	PCR <i>mecA</i> « maison » n=72	0	72
	GeneOhm StaphSR assay (BD) n=23	0	23
	Xpert MRSA/MSSA SSTI (Cepheid) n=72	0	72
	Xpert MRSA nasal (Cepheid) n=72	0	72
	NucliSENS EasyQ MRSA (BM) n=44	0	44

Les puces à ADN ont révélé des profils génétiques proches au sein de chacun des deux groupes avec la présence rare des gènes *tst* (n=4), *egc* (n=7), *edinB* (n=7), *sec* (n=3), *sel* (n=3).

Conclusion : En routine, la capacité de détection, d'identification et/ou de confirmation de la présence du gène *mecA*_{LGA251} est très variable d'une technique à l'autre, les techniques

moléculaires étant systématiquement prises en défaut. Devant une souche de SARM par ailleurs multisensible aux autres antibiotiques, seule la réalisation spécifique de la PCR *mecA*_{LGA251} ou du test Clearview Exact PBP2A après induction par la céfoxitine peut permettre de confirmer la présence de ce nouveau mécanisme de résistance.

Premières descriptions en France de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) portant un variant du gène *mec* : épidémiologie et caractérisation des souches

H. Chardon¹, M. Haenni³, O. Barraud², J.M. Delarbre⁵, M. Bes⁴, A. Tristan⁴, C. Martin², A. Gravel⁵, L. Maulin¹, N. Brieu¹, J.Y. Madec³, F. Vandenesch⁴, F. Laurent⁴
¹CH, Aix-en-Provence ²CHU, Limoges ³Agence Nationale de Sécurité Sanitaire ⁴Centre National de référence des staphylocoques, Lyon ⁵CH, Mulhouse, France

Contexte : En juin 2011, étaient décrites pour la première fois, en Grande-Bretagne et au Danemark, des souches animales et humaines de SARM porteuses d'un variant du gène *mecA*, *mecC*, présentant moins de 65% d'homologie avec *mecA* et de ce fait, négative en PCR *mecA*. Ces souches de SARM étaient par ailleurs sensibles à l'ensemble des autres antibiotiques (SARM-multiS).

Objet : Décrire l'épidémiologie et les caractéristiques des premières souches françaises identifiées.

Résultats : Au total, sur les 158 souches humaines de SARM multiS collectées, cinq souches *mecC*⁺ ont été identifiées par PCR (Aix-en Provence n=3 (en 2006, 2007, 2008), Mulhouse n=1 (2010), Limoges n=1 (2010)). Parmi les souches animales adressées par l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de Lyon, une souche était positive (Meurthe-et-Moselle, 2008). L'analyse moléculaire de ces 6 souches a révélé qu'elles appartenaient toutes au même complexe clonal CC130 (*agr3*, *spa*-type t843) et présentaient des profils génétiques identiques en puces à ADN avec notamment l'absence de gènes de résistance (autres que *mecC*) ou de gènes codant des toxines. Au niveau phénotypique, si ces souches étaient toutes détectées par la méthode en diffusion avec le disque de céfoxitine (<27mm), les systèmes Vitek® et Phoenix® n'ont permis d'identifier le caractère méti-R que pour 4 des 6 souches. Enfin le test Clearview PBP2a était négatif pour les 6 souches directement à partir des colonies, mais positif après induction par un disque de céfoxitine.

Les 5 souches humaines étaient à l'origine de formes parfois sévères (infection sur KT de dialyse, mal perforant plantaire, infection cutanée, parotidite/mediastinite/ostéite, arthrite).

La souche animale était associée à une mammite bovine. Une seconde souche (non conservée) isolée à la même période au sein du même élevage et présentant un profil de résistance

identique avait été isolée, suggérant une transmission croisée avec ces souches. Aucun autre cas n'a été signalé après mise sous traitement des deux animaux et renforcement des mesures d'hygiène.

Conclusion : Notre étude confirme la présence de souches de SARM *mecC+* en France chez l'homme et chez l'animal et met en lumière les difficultés de détection et d'identification en routine de telles souches.

33. Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux

331. Investigation d'épidémies

Au cours de la période 2006-2011, le CNR a été contacté régulièrement par des correspondants locaux pour des phénomènes épidémiques suspects. Ces phénomènes ont pu concerner de quelques cas à plusieurs dizaines de cas et toucher un service, une structure sanitaire, plusieurs structures voire l'ensemble du territoire national. Le CNR a alors pu apporter les outils moléculaires disponibles au laboratoire et son expertise afin d'aider à l'analyse de ces épisodes. Dans certains cas, il a pu participer à l'élaboration de mesures correctives et préventives ainsi qu'à la mise en place de surveillance.

Clone Géraldine. Le CNR a participé à la détection et l'investigation d'une épidémie à SARM (**clone Géraldine**) dans un service de Néonatalogie de l'hôpital de Bordeaux. Nous avons analysé 32 souches de SARM avec un phénotype de résistance proche de celui du clone Géraldine (préalablement retrouvé dans les hémocultures de deux prématurés en juin et en octobre 2010). Il s'agit de 19 souches pédiatriques, 7 souches isolées du personnel hospitalier des services concernés et 6 souches de l'environnement. Deux antibiogrammes sont rencontrés KT Ery Fu ou KT Fu, compatibles avec le profil de sensibilité des SARM appartenant au clone Géraldine. L'objectif est de savoir si ces nouvelles souches appartiennent elles aussi au clone Géraldine et si les profils génotypiques sont identiques, ce qui permettrait de faire le lien et d'établir ou réfuter certaines voies de transmission potentielle (ont été incluses trois souches de SARM de services différents des services concernés mais de même antibiogramme). Cette épidémie a fait l'objet d'une présentation à la RICAI en décembre 2011.

Staphylococcus capitis. *Staphylococcus epidermidis* est reconnu comme le plus fréquent des staphylocoques à coagulase négative : dans les unités de soins intensifs néonataux, il représente 70% des staphylocoques isolés au cours des bactériémies. Parmi les staphylocoques à coagulase négative *non-epidermidis*, *Staphylococcus capitis* est très

rarement isolé au cours des bactériémies de l'adulte, et lorsqu'il est retrouvé dans les flacons d'hémocultures est considéré comme un contaminant. En revanche, l'étude rétrospective conduite par le CNR au sein des HCL et plus largement mais à moindre échelle au niveau national a permis de mettre en lumière une fréquence particulièrement élevée des septicémies à *S. capitis* (39% des bactériémies versus 22.4% pour le *S. epidermidis*) au sein des services de réanimation néonatale de Lyon. Les souches présentaient une résistance à la méticilline (et donc à l'ensemble de bêta-lactamines) atypique au sein de cette espèce, associée à une résistance à l'ensemble de aminosides et à la fosfomycine. La caractérisation moléculaire des souches a permis de montrer que l'ensemble des souches appartenait à un même clone (NRCS-A) qui a été identifié dans les services de réanimation néonatale de plus de 10 centres hospitaliers à travers la France. Ces souches sont différentes des souches retrouvées chez l'adulte ou dans les populations pédiatriques plus âgées. Ces souches présentent par ailleurs, une sensibilité diminuée aux glycopeptides. Enfin, l'analyse rétrospective des données cliniques réalisée sur la période 2008-2011 montrent une sévérité significativement (analyse multivariée contrôlée sur l'âge et le poids de naissance) plus marquée des septicémies tardives à *S. capitis* que celles dues aux autres espèces de staphylocoques à coagulase négative. Des travaux concernant la distribution géographique de ce clone et les facteurs de virulence associés à cette endémicité sont en cours (voir partie projet).

332. Recherche de liens de clonalité

En 2011, le CNR a reçu 84 souches de staphylocoques (*S. aureus* ou à coagulase négative) pour recherche de lien de clonalité. Il s'agissait de comparer différentes souches d'un même patient ou des souches de patients différents. Aucune souche pour accident transfusionnel n'a été reçue (Figure 14).

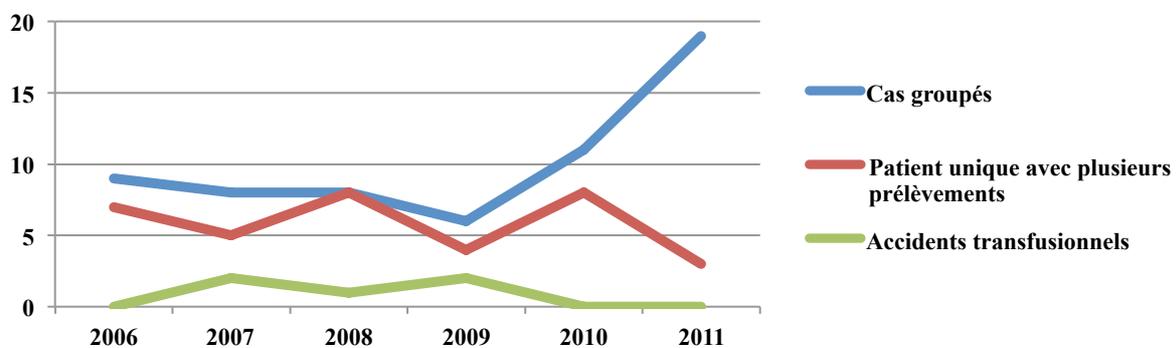


Figure 14- Evolution de nombre de souches reçues au CNR pour recherche de lien de clonalité entre 2006 et 2011.

Au cours de l'année 2011, le CNR a investigué 22 cas groupés d'infection ou épidémies. L'analyse des profils de restriction de l'ADN des souches après électrophorèse en champ pulsé (permettant de définir des pulsotypes) ou l'analyse par puces à ADN, du type d'allèle *agr* et l'antibiogramme a permis d'évaluer le lien de clonalité des souches isolées. Les cas ont été analysés dans les contextes suivants :

Dieppe:

- Trois souches de *S. aureus* isolées le même jour chez un patient ayant présenté une infection sur prothèse de genou. L'analyse par électrophorèse en champ pulsé mettait en évidence un pourcentage de similitude de 100 % pour 3 souches. Il existait donc un lien de clonalité entre ces souches.

Lyon :

- Deux souches de *S. aureus* isolées dans l'hémoculture d'un prématuré et dans un lait maternel. Les souches ne présentaient pas de lien de clonalité.
- Deux souches de *S. aureus* isolées chez des prématurés ayant présenté un choc d'allure toxinique. Les souches, sensibles à la méticilline présentaient un fort lien de clonalité.
- Quatre souches de *S. aureus* isolées chez des patients hospitalisés dans le même service clinique. Les souches, sensibles à la méticilline ne présentaient aucun lien de clonalité.

Limoges :

- Sept souches de *Staphylococcus aureus* producteurs de la leucocidine de Pantone Valentine, isolées chez des rugbymen professionnels. Six de ces souches présentaient un très fort lien de clonalité et étaient différentes de la septième.

Massy :

- Deux souches de *S. aureus* isolées de prélèvement d'hémoculture de cicatrice pré-sternale d'un enfant. Les souches présentaient un très fort lien de clonalité.

Pont l'Abbé :

- Trois souches de *S. aureus* isolées en post-opératoire chez des patients du même service. Ces souches appartiennent toutes au complexe clonal CC80 donc elles présentent un fort lien de clonalité.

Toulouse :

- Trois souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline isolées chez des patients en soins palliatifs. Deux souches sur les trois présentent un fort lien de clonalité et appartiennent au clone Lyon.

Angoulême :

- Cinq souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline, isolées chez des patients opérés pour pose d'une prothèse de hanche. Seules 2 souches sur les 5 présentaient un fort lien de clonalité les autres étaient différentes et différentes entre elles.

Vannes :

- Deux souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline, isolées chez deux enfants. Les souches ne présentent pas de lien de clonalité.

Paris :

- Deux souches de *S. aureus* isolées de liquide articulaire de genou droit et de séquestre osseux chez un même patient dans un contexte d'ostéomyélite chronique. Les deux souches, productrices de la leucocidine de Panton Valentine présentaient un très fort lien de clonalité.
- Deux souches de *S. aureus* isolées de liquide articulaire de genou et du prélèvement de nez chez un même patient. Les deux souches présentaient un très fort lien de clonalité.

Giens :

- Deux souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline, isolées de prélèvements per-opératoires chez deux patients. Les souches ne présentaient pas de lien de clonalité.

Chambéry :

- Six souches de *S. capitis* isolées en réanimation néonatale. Les pulsotypes de ces souches sont identiques et identiques à celui du clone diffusant actuellement en néonatalogie en France.
- Cinq souches de *S. aureus* isolées en néonatalogie. Il s'agissait de deux souches environnementales et de trois souches de patients. Les deux souches environnementales présentaient un très fort lien de clonalité avec celle isolée chez l'un des enfants et les autres ne présentaient pas de lien de clonalité.

Cabestany

- Deux souches de *S. aureus*, sensibles à la méticilline, isolées chez deux patients opérés le même jour. Les deux souches ne présentaient pas de lien de clonalité.

Petit Canal :

- Quatre souches de *S. aureus*, sensibles à la méticilline, isolées chez 4 patients. Au total, seules deux souches, productrices de la leucocidine de Panton Valentine présentaient un fort lien de clonalité et appartenaient au CC152.

Montpellier :

- Quatorze souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline. Les souches appartenaient toutes au CC80.

- Quatre souches de *S. aureus* : 2 résistantes et 2 sensibles à la méticilline isolées chez la même patiente. Au total, les deux souches sensibles possédaient un fort lien de clonalité, les deux souches résistantes présentaient un fort lien de clonalité mais les sensibles et les résistantes ne possédaient pas de lien de clonalité.

- Deux souches de *S. aureus* une sensible et une résistante à la méticilline, isolées chez un même patient. Les deux souches présentent un lien de clonalité sans qu'il soit possible de préciser si ces 2 populations étaient présentes dans le prélèvement initial, ni si il y a eu acquisition ou perte de cassette de résistance.

Mâcon :

- Six souches de *S. aureus*, sensibles à la méticilline, isolées en per-opératoires chez des patients repris au bloc opératoires. Seules deux souches sur 6 présentaient un fort lien de clonalité et appartenaient au CC30.

Bourgoin-Jallieu :

- Quatre souches de *S. aureus*, sensibles à la méticilline, isolées chez des patients opérés dans la même clinique. Les souches ne présentaient pas de lien de clonalité.

333. Caractérisation de nouveaux clones et formes cliniques spécifiques

3331. Caractérisation de nouveaux clones

Clone CC398

Les souches de *S. aureus* appartenant au Clone CC398 sont à l'origine d'infections humaines qui peuvent être sévères. Le CNR s'est attaché à surveiller et évaluer l'émergence des souches de SARM appartenant au complexe clonal CC398 aussi bien chez l'animal (voir collaboration avec l'ANSES) que chez l'homme (voir ci-après). De telles souches ont été détectées en France, essentiellement chez les animaux pour l'instant. L'introduction des puces à ADN qui permettent de rattacher une souche clinique donnée aux grands clones connus et présents dans la banque de données (incluant CC398) et leur utilisation en systématique sur toutes les souches reçues au CNR, ont permis d'identifier plus d'une centaine de souches cliniques appartenant au complexe CC398. De façon surprenante, le nombre de souches de SARM CC398 d'origine humaine est très faible alors que le nombre de souches de SARM CC398, rarement décrites dans la littérature s'est avéré important. Cette observation est en cours d'investigation afin d'établir le profil clinique et microbiologique de ces souches ainsi que

d'établir les liens entre les populations de SARM CC398 et SASM CC398 qu'elles soient d'origine humaine ou animale.

En 2011, nous avons observé une augmentation très importante du nombre de souches reçues (95 souches en 2011) pour expertise dans le cadre d'infections sévères (pneumonies nécrosantes, endocardites infectieuses, spondylodiscites, infections suppuratives...). Il s'agit de souches, sensibles à la méticilline appartenant à ce complexe clonal.

3332. Caractérisation de souches responsables de formes cliniques spécifiques

Colonisation

Etude de la co-colonisation nasale à SARM, SASM, SCNMR et SCNMS

La colonisation nasale par des *Staphylococcus aureus* résistants et/ou sensibles à la méticilline (SARM, SASM) et par des staphylocoques à coagulase négative (SCN) résistants et/ou sensibles à la méticilline (SCNMR, SCNMS) a été déterminée par la méthode des répliques sur velours selon le protocole prévu initialement. Au final, 353 patients ont été inclus entre Juillet et Décembre 2010 dont 202 étaient hospitalisés en Réanimation médicale et chirurgicale et 151 en chirurgie orthopédique. Les patients des services de réanimation ont été considérés comme représentatifs des populations concernées par le dépistage du portage hospitalier des SARM. Les patients des services d'orthopédie ont été considérés : (i) comme représentatifs des populations concernées par le dépistage pré-opératoire du portage de *Staphylococcus aureus*, recommandé dans les services de chirurgie orthopédique et de chirurgie cardiaque; (ii) comme représentatifs du niveau de colonisation communautaire.

Les résultats mettent en évidence un fort taux de colonisation nasale par le genre *Staphylococcus* dans sa globalité (moins de 5% de patients non colonisés) qu'il s'agisse des patients de réanimation ou d'orthopédie. La prévalence de la colonisation par *S. aureus* (25%) et par SCN (90%) est identique dans les deux sous-populations. En revanche, la prévalence de la résistance à la méticilline est différente. Elle est plus élevée chez les patients de réanimation que chez les patients d'orthopédie qu'il s'agisse des *S. aureus* (3% versus 1.3%) ou des SCN (76% versus 34%).

La co-colonisation *S. aureus*-SCN est retrouvée chez 21 % des patients (22.5% en orthopédie et 19.8% en réanimation). De façon plus intéressante, dans l'optique de l'utilisation des tests de dépistage moléculaire des SARM de deuxième ou troisième génération, une co-colonisation SCNMR-SASM est retrouvée chez 6% des patients d'orthopédie et 13.4% des patients de réanimation. Ces chiffres doivent être mis en perspective avec la prévalence du

portage de SASM (24.5% en orthopédie et 21.8% en réanimation) et du portage de SARM (seulement 1.3% en orthopédie et 3% en réanimation).

La confrontation de ces données épidémiologiques et des arguments présentés par les différents fournisseurs de tests moléculaires pour le dépistage rapide du portage des *S. aureus* et SARM apporte un éclairage nouveau sur la pertinence de certains choix techniques réalisés. Avec les tests de deuxième génération combinant PCR Jonction/*orfX* et PCR *spa*, l'utilisateur s'expose à des faux positifs correspondant à de rares souches SASM dont la cassette SCC*mec* a été partiellement tronquée (perte du gène *mecA* et conservation d'une partie de la jonction chez des souches SARM) et à de rares faux négatifs correspondant à des clones SARM présentant une zone de jonction atypique, non amplifiée par la PCR Jonction/*orfX*. Il a donc été proposé dans les tests de troisième génération, une PCR *mecA* supplémentaire qui permettrait d'identifier facilement ces souches atypiques (*mecA*+/*JorfX*-/*spa*+ ou *mecA*-/*JorfX*+/*spa*+).

Cependant cette PCR *mecA* amplifiant indifféremment le gène *mecA* des souches de *S. aureus* ou de SCN, les patients co-colonisés SASM-SCNMR sont à leur tour détectés faussement positifs (*mecA*+(SCNMR)/*JorfX*-/*spa*+(SASM) ou *mecA*+ (SCNMR) /*JorfX*+(SASM drop-out) /*spa*+(SASM drop-out)). Or, si on ne considère que les patients colonisés à SASM (n=37 en orthopédie, n=44 en réanimation), le taux de faux positifs (co-colonisation SASM-SCNMR) serait de 24% (9/37) en orthopédie et 61% (27/44) en réanimation. Le bénéfice attendu avec un test de troisième génération par l'ajout de la PCR *mecA* est donc largement contrebalancé par le taux de faux positif induit par la co-colonisation SASM-SCNMR. Pour aller au-delà, ce taux apparaît même inacceptable dans le cadre d'une utilisation en routine et donc rend peu pertinent le marqueur « PCR *mecA* ».

Protocole « Dermatologie Fréjus » en partenariat avec le service d'Infectiologie-Dermatologie du centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus Saint-Raphaël.

L'objectif de ce travail est de décrire les caractéristiques cliniques, épidémiologiques et bactériologiques (toxiniques) des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*. Il repose sur l'étude d'une cohorte prospective d'infections cutanées prises en charge au centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus Saint-Raphaël au sein du service du Dr Pascal Del Giudice.

Depuis 2003, en lien avec le Dr Pascal Del Giudice en charge du service de Dermatologie au centre Hospitalier Intercommunal de Fréjus Saint-Raphaël, une étude prospective a été mise en place afin de mieux caractériser les infections cutanées à *S. aureus* tant sur le plan diagnostique clinique grâce à l'expertise acquise dans ce service que sur le plan virulence

(toxines et résistance) avec l'expertise du CNR. Entre 2003 et 2011, nous avons reçu **560 souches** de *S. aureus*. Cette collaboration a conduit à plusieurs **publications originales**.

La première publication³¹ a permis de décrire l'apparition de deux populations de SARM avec des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques distinctes, isolées chez des patients présentant des infections cutanées communautaires. De Novembre 1999 à décembre 2003, dans un hôpital français, une **étude prospective** épidémiologique, clinique et bactériologique a été menée pour étudier les infections cutanées acquises dans la communauté. Cent quatre-vingt-dix-sept patients ont présenté 207 infections cutanées (154 primitives et 53 surinfections). Vingt-deux patients (11 %) avaient des infections à SARM. L'incidence des infections cutanées dues aux SARM-C est passée de 4 % en 2000 à 17 % en 2003 (non significatif). Six patients (3 %) ont été infectés par SARM-C et 15 (8 %) par SARM-H; un patient a été perdu pour le suivi et ne pouvait pas être classifié. Les SARM-C et les SARM-H avaient des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques différentes. Les infections dues aux SARM-C étaient plus sévères que les infections dues aux SARM-H, elles ont toutes nécessité un drainage chirurgical contre seulement 2 sur 13 pour les infections dues aux SARM-H ($p < 0.001$). Tous les SARM-C appartiennent au même clone, *agr 3*, PVL+ (gènes non détectés dans les SARM-H) et possèdent un antibiotype spécifique. Donc il existe une distinction claire dans la communauté entre les souches de SARM-C et de SARM-H responsables d'infections cutanées acquises dans la communauté.

Cette collaboration a également permis de démontrer **l'association entre la production de PVL et la survenue d'abcès primitifs**³².

Le rôle de la PVL dans les infections de la peau et des tissus mous étant controversé, notre but était de déterminer la prévalence des gènes codant la PVL dans les souches de *S. aureus* isolées d'abcès primaires et secondaires. Une étude prospective a été conduite de juillet 2003 à juin 2008. Sont considérés comme primaires, les abcès survenus sur peau précédemment saine et secondaire dans tous les autres cas. Cinquante-sept patients ont été inclus dans l'étude. Les gènes de la PVL ont été détectés dans 40 cas (70%). Trente-huit des 41 abcès primaires possèdent les gènes codant la PVL contre seulement 2 des 16 abcès secondaires (12.5 %) ($p < 0.001$).

Grâce à cette étude réalisée en service de dermatologie, nous avons rapporté la **première**

³¹ Del Giudice P et al. 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.

³² Del Giudice P et al. Primary skin abscesses are mainly caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains. Dermatology. 2009;219(4):299-302.

observation en France d'infection autochtone, c'est-à-dire acquise localement, due au **clone USA 300**, actuellement responsable d'une situation épidémique aux États-Unis, où il est à l'origine de la majorité des infections cutanées à *S. aureus*³³.

De plus, cette cohorte de patients de dermatologie, nous a permis de décrire précisément (grâce à l'expertise dermatologique) la **clinique des infections cutanées associées au clone communautaire ST80**³⁴. De novembre 1999 à octobre 2009, 20 patients ont présenté une infection cutané avec un SARM-C ST80 (âge médian 28 ans, médiane 27; de 1 à 66 ans). Les 20 patients avaient les manifestations suivantes : 19 abcès primitifs (18 abcès unique et un patient avec deux), 8 furoncles, 4 folliculites, un cas de cellulite, une plaie et un panaris. Tous les abcès primitifs ont nécessité un drainage chirurgical. La majorité des infections étaient à proximité du périnée (50 %). Il n'y a pas eu de diffusion intrafamiliale. Malgré des mesures d'hygiène strictes, des antibiotiques systémiques et de la mupirocine par voie nasale, quatre patients (20 %) avaient des infections cutanées récurrentes sur une période allant de quelques mois à 6 ans.

Enfin, nous avons montré **l'association entre les souches de *S. aureus* productrices de la leucocidine de Panton Valentine et les infections cutanées folliculaires**³⁵.

Nous avons étudié le taux de *S. aureus* PVL+ dans différents types d'infections cutanées et nous avons comparé les infections cutanées folliculaires aux infections non folliculaires. Du 1 juillet 2003 au 30 juin 2010, 229 infections cutanées ont été incluses : 97 (42.5 %) étaient dues à des souches PVL+. Trente-neuf des 53 infections folliculaires (74 %) [8 des 17 (47 %) cas de folliculites, 30 des 35 (85.5 %) cas de furoncles et 1 cas d'anthrax (100 %)] ont été causés par un *S. aureus* PVL+, comparé à 16 des 131 infections non folliculaires (12 %) ($p < 0.001$).

334. Alerte variant du gène *mecA*

Collège Bactériologie Virologie et Hygiène des Hôpitaux (ColBVH)

En collaboration avec le ColBVH, une enquête prospective du 1^{er} Novembre au 1^{er} Décembre 2011 a été réalisée incluant près de 100 CHG du réseau afin d'évaluer la prévalence des

³³ Del Giudice P et al. A case of indigenous skin infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in France. *Ann Dermatol Venereol.* 2009 Jun-Jul;136(6-7):541-2

³⁴ Del Giudice P et al. Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Feb;25(2):164-9.

³⁵ Del Giudice P et al. Pantone-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Strains Are Associated with Follicular Skin Infections. *Dermatology.* 2011 Feb 22.

souches de SARM porteuses du nouveau variant du gène *mecA*. Par ailleurs nous avons profité de cette étude pour recueillir des données de prévalence, cette fois sur une année complète des principaux profils de résistance aux antibiotiques des SARM en France. L'ensemble des données est en cours de dépouillement.

Enfin, dans le cadre des Contrôle de Qualité Externe coordonné par le ColBVH (Dr P. Pina), le CNR a fourni 4 souches et assuré une partie du support logistique de préparation de ce contrôle. Là encore les résultats sont en cours de recueil et d'analyse.

Une alerte similaire est en cours pour 2012 avec le groupe AZAY.

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

Le CNR des staphylocoques a su établir des interactions fortes avec de nombreux réseaux de laboratoires qu'il s'agisse de laboratoires hospitaliers ou privés et nationaux ou internationaux. Les objectifs sont, dans le cadre d'échanges réciproques : (i) de fournir une aide technique et un accès aux outils développés ou disponibles au CNR pour les études initiées par les différents réseaux, (ii) d'avoir accès à des panels de souches représentatives des clones circulants et/ou de formes cliniques spécifiques étudiées, (iii) de disposer et de fournir des données de prévalence, de virulence, de résistance aux membres des réseaux et plus largement aux autorités de santé, (iv) de pouvoir comparer les données issues des différents réseaux entre eux et avec ceux d'autres pays européens.

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

Etude EARSS-SeqNet Staphylococcus 2011

Identification et suivi longitudinal des clones de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections invasives en Europe

Type de collaboration : CNR – EARSS – Laboratoires correspondants du CNR.

Les objectifs de cette étude prospective réalisée de façon identique (protocole et technique de caractérisation (*spa*-typing)) et simultanée dans 27 pays européens sont :

- au niveau européen de caractériser les principaux clones européens de *Staphylococcus*

aureus responsables d'infections invasives,

- au niveau national de connaître le profil toxinique de ces mêmes clones. Le protocole reprenant exactement celui utilisé en 2006 dans les mêmes laboratoires, les données permettront de connaître l'évolution longitudinale temporelle et géographique des clones de *S. aureus* responsables d'infections invasives en Europe.

A l'échelle nationale, nous avons conduit une étude prospective multicentrique incluant 5 souches consécutives de *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) et 5 souches consécutives de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) isolées d'hémocultures entre le 1er janvier et le 30 juin 2011 dans 23 laboratoires hospitaliers. Un total de 86 SARM et 144 SASM ont été inclus et caractérisés selon leur profil de résistance aux antibiotiques, le typage *agr*, le typage *spa*, le profil toxinique, déterminé par puce à ADN (Identibac *S. aureus* Genotyping ®, Alere) et le typage par MLVA (*Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis*). Les données 2011 ont été comparées avec celles de 2006.

En 2011, 5 principaux clones de SARM ont été identifiés : le clone Lyon,ST8-IV (n=48, 55,8%), le clone "New Pediatric", ST5-VI (n=16, 18,6%), le clone "Classical Pediatric", ST5-IV (n=7, 8,1%), le clone ST22-IV ou UK-EMRSA-15 (n = 4; 4,7%) et le clone Géraldine, ST5-I (n = 3; 3,5%). Les 7 souches restantes appartiennent à 6 autres clones. Depuis 2006, le clone Lyon reste le clone majoritaire. Au sein du clone Lyon, nous avons observé différentes sous-populations, de distribution identique entre 2006 et 2011. Durant cette période, nous n'avons pas observé de différence significative lorsqu'on considère indépendamment les principaux gènes ou allèles de virulence, de cassette *SCCmec* et de résistance. La proportion du clone "New Pediatric" a augmenté de façon significative passant de 7% en 2006 à 18,6 % en 2011. Cette augmentation ne semble pas liée à une variabilité génétique des souches.

Enfin, l'émergence préoccupante du clone ST22-IV, récemment impliqué dans une épidémie dans une unité de néonatalogie à Lyon, est un phénomène à surveiller. L'analyse des données relatives aux SASM est en cours.

Forum EuroStaph Network

Le CNR des staphylocoques a pris l'initiative de proposer la création d'un forum d'échanges entre les différentes structures européennes en charge de la surveillance des staphylocoques. Ce projet a reçu un accueil très favorable de l'ensemble des 27 centres européens de référence (ou équivalents) qui ont tous décidé d'intégrer le projet.

« EuropStaph Network » (<http://www.eurostaph.org>) réalisé, géré et modéré par les membres du CNR est un forum de discussion sécurisé qui vise à fournir un lieu d'échange d'informations et d'expériences à l'échelle pan-européenne entre les laboratoires nationaux de référence des staphylocoques qui sont en charge de la surveillance des staphylocoques en Europe. Il a été conçu comme un moyen d'interagir facilement et rapidement sur des questions de santé publique, de techniques diagnostiques ou de recherche appliquée avec l'objectif global de :

- (i) informer régulièrement les collègues européens de ce qui se passe dans le domaine du staphylocoque dans un pays donné,
- (ii) assurer rapidement la liaison entre l'ensemble des membres quand un problème spécifique est détecté ou quand un signalement peut être nécessaire ou d'intérêt,
- (iii) mettre en contact tous les membres du Réseau pour un commentaire, une demande, une question, une proposition de collaboration, etc.

En outre, ce forum peut être utilisé pour d'autres sujets d'échanges entre les membres du réseau puisque des sous-groupes sur des sujets spécifiques peuvent être créés au sein du forum.

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

Algérie –CHU Mustapha Pacha d'Alger

Une collaboration importante a été établie avec les microbiologistes de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger (Prof Mohamed Tazir et Prof Nadjia Ramdani).

Une collaboration existe depuis plusieurs années avec les microbiologistes de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger (Prof Mohamed Tazir et Prof Nadjia Ramdani). Dans le cadre d'un financement INSERM/DPGRF, un nouveau projet est en cours dont les objectifs sont de :

- Mesurer la prévalence de portage de *Staphylococcus aureus* et notamment des clones possédant le gène codant la leucocidine de Panton et Valentine [PVL+] au sein de la population algéroise,
- Evaluer l'impact clinique des souches PVL+ isolées au cours des infections ostéo-articulaires et des pneumonies à Alger,
- Evaluer le niveau de circulation et la nature des souches de *S. aureus* circulant chez l'animal en Algérie.

Concernant l'étude de portage, 459 sujets sains de la communauté ont été prélevés dont 201 adultes et 258 enfants. Les sujets adultes étaient des donneurs de sang bénévoles se présentant au niveau du centre de transfusion sanguin de notre CHU. Les sujets enfants étaient des consultants au service des urgences ne présentant aucun syndrome infectieux. Les adultes ont bénéficié d'un écouvillonnage nasal et d'un écouvillonnage pharyngé, les enfants ayant bénéficié eux de trois écouvillonnages : nasal, pharyngé et anal. Ce design d'écouvillonnage a permis d'analyser l'éventuelle variabilité anatomique de portage de *S. aureus*. Chacun des prélèvements a été mis en culture sur une gélose au sang frais, une gélose Chapman et un bouillon d'enrichissement, ce dernier n'étant ensemencé que si les cultures sur milieux gélosés s'avéraient négatives. Cette approche a permis d'analyser le gain de sensibilité apporté par le pré-enrichissement pour le dépistage de *S. aureus*.

Chez l'adulte, le taux de portage de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) a été de 55% (n=104), avec un taux de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) avoisinant 3% (n=6). La répartition du portage de *S. aureus* selon les différents sites rapporte les taux suivant : 23% (n=47) ont été retrouvés exclusivement au niveau du nez, 17% (n=34) ont été retrouvés exclusivement au niveau de la gorge et 15% (n=29) ont été retrouvés au niveau de la gorge et du nez.

Chez l'enfant, le taux de portage de SASM est de 52% (n=133), avec un taux de SARM avoisinant 7.4% (n=19). La répartition du portage de *S. aureus* selon les différents sites rapporte les taux suivant : 17% (n=43) ont été retrouvés exclusivement au niveau du nez, 12% (n=31) ont été retrouvés exclusivement au niveau de la gorge, 6% (n=15) ont été retrouvés exclusivement au niveau de la marge anale et 24% (n=63) ont été retrouvés au niveau des différentes combinaisons entre les sites soit nasal+ gorge, gorge+anal, etc.

La caractérisation moléculaire des souches a montré que la prévalence de la PVL au sein de la collection constituée était respectivement de 4% et 7 % chez l'adulte et l'enfant. Les premières données moléculaires de caractérisation des SARM oriente vers une prédominance

du clone ST80, clone communautaire portant le gène de virulence de la toxine de Panton-Valentine.

La recherche de l'allèle *agr* à partir de souches isolées chez des enfants présentant un co-portage (nez-gorge, nez-anal ou gorge-anal) a permis d'établir qu'au moins 10 de ces enfants portaient des souches arborant des allèles *agr* différents indiquant que ces sujets portent des souches différentes dans ces différents sites anatomiques.

Toutes les souches issues de cette étude de portage soit 363 souches ont été envoyées au CNR français des staphylocoques à Lyon au cours de l'année 2011, afin de compléter l'étude moléculaire.

Une première caractérisation des souches envoyées par typage de la protéine A, « *spa* typing » est en cours de finalisation au CNR. Ces données permettront :

1. d'avoir une vue plus globale des clones de SARM et de SARM circulants en Algérie. Cette caractérisation, moléculaire a été réalisée en partie par Melle Antri Kenza au cours de son stage (15 Septembre – 15 Octobre) au CNR.
2. D'établir s'il existe des clones associés à une colonisation préférentielle de tel ou tel site anatomique

Par ailleurs, 10 souches responsables d'endocardite ont été collectées, elles ont bénéficié d'une première étude moléculaire à Alger. Les résultats ont montré la forte prévalence de la PVL. Ces souches sont encours d'analyse par puces à ADN. De plus une soixantaine de souches responsables d'infections invasives ostéo-articulaire, pneumopathie, bactériémies ont été collectées et sont en attente d'une analyse moléculaire.

Sur le versant animal, trente souches isolées chez l'animal dont 9 isolées de portage chez la volaille et 21 isolées de mammites bovines ont été collectées.

Ces travaux vont se poursuivre dans le cadre d'un co-encadrement de deux doctorants algériens.

Inde (Bangalore) - Gayathri Arakere

Les infections dues à *S. aureus* sont un problème majeur dans les hôpitaux indiens et des études récentes montrent que les SARM-C ont diffusés au sein des hôpitaux. L'analyse moléculaire de 68 souches de *S. aureus* indiens isolées des porteurs sains ou présentant une infection nosocomiale a été effectuée. Les souches ont été regroupées en 15 sequence type correspondant aux principaux complexes clonaux déjà décrits. Cependant, grâce à cette étude, nous avons mis en évidence l'émergence d'un clone de SARM ST672. Soixante-neuf pour cent des isolats possèdent les gènes codant la PVL souvent associés à d'autres toxines.

L'analyse par puces à ADN donne pour la première fois, un aperçu des principales toxines, facteurs de virulence, facteurs d'adhésion et facteurs d'évasion du système immunitaire des souches de *S. aureus* d'Inde.

Par ailleurs, un projet collaboratif nommé « Indigo » dans le cadre du programme en biotechnologie et santé avec l'Inde a été mis en place en 2011.

Turquie (Istanbul) - Lutfiye OKSUZ, Prof Nezahat GURLER

Acquis dans la communauté, les *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM-C) producteur de la leucocidine de Pantone Valentine (PVL) se sont répandus partout dans le monde avec des incidences diverses et différents fonds génétiques. Par exemple, le clone USA300 est plus fréquemment détecté en Amérique du Nord, Sud et en Espagne, tandis que le clone ST80 est le clone européen majeur, mais est aussi fréquemment détecté en Algérie; le clone ST30 étant plus fréquemment détecté en Océanie et en Asie. Plusieurs autres clones de SARM-C PVL+ ont été signalés dans le monde, mais peu d'informations sont disponibles sur l'épidémiologie des SARM PVL + à Istanbul, Turquie.

Méthodes: De 2007 à 2011, nous avons rassemblé tous les isolats de SARM à l'hôpital d'Istanbul, Faculté de médecine à Istanbul. La résistance à la méthicilline a été détectée avec un disque de céfoxitine, milieu chromogène SARM. La présence des gènes codant la PVL a été détectée par PCR. Les souches ont également été caractérisés à l'aide des puces à ADN Identibac *S. aureus* Genotyping® (Alere) détectant 334 séquences cibles correspondant à 185 gènes distincts et leurs variants alléliques.

Résultats: Sur un total 88 SARM, 4 étaient PVL+ (4,5%), 2 clones ST22 SCCmecIV et 2 USA300

Ces quatre SARM PVL + ont été isolés chez des patients présentant des infections de la peau et des tissus mous et la peau considérés comme communautaires. Le clone européen ST80 n'a pas été détecté à Istanbul, or ce clone est souvent détecté en Grèce qui a des frontières communes avec la Turquie.

Conclusion: Ce premier rapport décrit les caractéristiques des SARM-C PVL+ détectés à Istanbul, Turquie: leur taux de détection est faible et qu'ils appartiennent aux clones ST22 et USA300.

35. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

PHRC « Pneumopathie nécrosante »

Type de collaboration : CNR – CHU et CHG Français dans le cadre d'un PHRC coordonné par le Pr François Vandenesch

En se basant sur une prévalence de portage nasal de 25%, le nombre de souches de *S. aureus* PVL+ circulants en France pourrait être d'environ 0,6 Million. Cependant sur la base des déclarations spontanées au CNR des staphylocoques, moins de 30 cas de pneumonie à *S. aureus* PVL+ sont notifiés annuellement en France. Ceci nous conduit à postuler que les patients présentant ces infections extrêmement sévères pourraient présenter une susceptibilité particulière pour ces souches. Par ailleurs, la prévalence de la résistance à la méticilline des souches responsables de pneumonies nécrosantes, qui oriente la stratégie du traitement probabiliste, reste imprécise et a doublé entre l'étude de 2002 (6.2%) et celle de 2007(12%). Dès lors, plusieurs questions se posent :

- La PVL est-elle un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumopathies communautaires graves à *S. aureus* ?
- Quels sont les facteurs (cliniques, biologiques, thérapeutiques) de pronostic favorable associés à la maladie?
- Quel est le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches de pneumonie nécrosante ?
- Existe-t-il une susceptibilité génétique de l'hôte à l'origine de la rareté et de la sévérité de cette maladie ?

Afin de répondre à ces questions un projet recherche clinique a été déposé dans le cadre des appels d'offre PHRC et a obtenu un financement (PHRC Leucocidine de Panton Valentine : Facteur indépendant de gravité des pneumonies à *Staphylococcus aureus*).

Il s'agit d'une étude de cohorte comportant un volet observationnel et un volet interventionnel immunogénétique. L'étude est réalisée chez des enfants et adultes hospitalisés pour une pneumopathie à *S. aureus* dans une unité de réanimation ou de surveillance continue. L'étude comporte par ailleurs la constitution de deux collections :

- l'une au Centre de Biotechnologie Cellulaire du CBPE de Lyon : ADN et cellules à partir de prélèvements sanguins
- l'autre au CNR des staphylocoques : souches de *S. aureus* pour caractérisation génétique des souches et sérum pour recherche d'anticorps anti-toxine.

Tous les hôpitaux français sont sollicités pour rapporter les cas définis comme une pneumonie communautaire sévère (nécessitant une hospitalisation en service de réanimation) à *S. aureus* producteur ou non de PVL. Sur la base d'une fréquence attendue de PVL de 10%, le calcul du nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une surmortalité d'un facteur 2 (risque

relatif) avec une puissance de 80% et un risque α de 5% donne un nombre minimum de sujets à inclure de 97 patients PVL+ et 97 patients PVL-. L'étude sera donc réalisée sur une période de trois ans afin d'avoir le nombre de sujet requis permettant des analyses statistiques appropriées. La partie immunogénétique comprendra 40 patients présentant une pneumonie communautaire sévère à *S. aureus* producteur de PVL et 130 membres de leurs familles et consistera à une prise de sang et un entretien médical. L'arbre généalogique de la famille sera réalisé dans le cadre de cette étude. Des analyses spécifiques de génétique épidémiologique (analyse de liaison génétique) seront menées si l'échantillon recueilli le permet.

L'objectif principal est de confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité indépendant des pneumonies à *S. aureus* en comparant un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* PVL+ avec un groupe de patients hospitalisés en réanimation pour une pneumonie communautaire à *S. aureus* ne produisant pas la PVL.

Les objectifs secondaires sont de :

- comparer les groupes de patients atteints de pneumopathies sévères à *S. aureus* PVL + avec évolution favorable et le groupe avec évolution défavorable (décès attribuable selon le médecin investigateur) afin d'identifier les facteurs associés au bon pronostic. Il s'agit d'étudier notamment les effets des différents traitements antibiotiques utilisés (antibiotiques à activité anti-toxinique *versus* sans activité anti-toxinique, délai d'administration) et des immunoglobulines polyvalentes.
- étudier la proportion de SARM parmi les souches de *S. aureus* PVL + et étudier la distribution clonale des souches SARM et non SARM (cf supra les résultats préliminaires obtenus sur l'analyse des premiers cas).
- évaluer l'état immunitaire du patient vis-à-vis de la PVL au moment de la maladie : un prélèvement de sérum pour recherche d'anticorps anti-PVL est réalisé à l'inclusion de tous les patients. Ces tests sont réalisés dans le cadre de la prise en charge habituelle des patients.

Grâce au volet immunogénétique de ce projet de cohorte, nous allons rechercher une prédisposition génétique de type Mendélienne conduisant à une dysfonction de l'immunité innée. Ceci s'oppose aux prédispositions complexes détectées par des « *single nucleotid polymorphisms* » et nécessitant l'analyse de grandes séries de patients. La stratégie générale suivra celle qui a permis au laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses à la faculté Necker à Paris (GHMI-INSERM-U550) de découvrir les mutations impliquées dans la susceptibilité Mendélienne à développer des infections mycobactériennes disséminées, les

infections invasives à pneumocoque, et plus récemment dans les encéphalites herpétiques^{36,37}
(Annexe 2)

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

Collaboration : CNR des Staphylocoques – Centre de génomique de l'Institut Pasteur, Paris

L'objectif du projet est d'identifier les facteurs bactériens associés à une localisation à l'endocarde en cas de bactériémie à *Staphylococcus aureus*. Ce projet s'inscrit dans le cadre plus large d'un programme hospitalier de recherche clinique actuellement en cours et intitulé VIRSTA : « Facteurs associés à une localisation à l'endocarde au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus* »: étude de cohorte prospective, nationale, multicentrique (voir ci-dessous).

Dans cette partie spécifique du projet, l'approche que nous proposons de mettre en œuvre est une analyse génomique comparative des souches d'EI (cas) et des souches de bactériémie sans EI (témoin) en appariant les souches sur différents critères. Nous avons sélectionné huit souches d'EI représentatives de la diversité génétique des souches responsables d'EI actuellement caractérisées dans l'étude VIRSTA, sur les critères groupe *agr* et MLST suivants : CC5, CC8, CC15, CC22, CC30, CC45, CC121, CC398. Ces 8 souches d'EI ont été appariées à 8 souches issues de la collection de bactériémie sans EI, l'appariement étant réalisé sur la base du groupe *agr*, du MLST et d'un profil identique obtenu avec la puce ADN Alere®. Cette méthode d'appariement repose sur l'hypothèse que les souches d'EI et celles uniquement responsables de bactériémies diffèrent par un ensemble de caractéristiques génétiques qui est commun aux 8 couples de souches étudiées. Une hypothèse alternative repose sur la possibilité que les souches responsables d'EI dérivent des souches de portage nasal par adaptation *in situ* dans l'écosystème du nez. A l'appui de cette hypothèse, il est établi que les patients atteints d'endocardite infectieuse sont fréquemment porteurs d'une souche phénotypiquement identique au niveau des fosses nasales. En revanche, le portage nasal est extrêmement répandu dans la population (environ

³⁶Bustamante J. et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Current Opinion in Immunology*. 2008; 20: 39-48.

³⁷von Bernuth H. et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008; 321 (5889): 691-6.

30% des sujets sains³⁸) alors que l'endocardite infectieuse reste une maladie rare. Il est donc possible que de subtiles variations/adaptations soient nécessaires pour qu'une souche de portage nasal soit à l'origine d'endocardite. Aussi, afin d'explorer cette hypothèse, nous proposons de comparer le génome d'une souche d'EI (CC5) isolée des hémocultures et les génomes de 5 isolats du même patient obtenus en primo-culture à partir d'un écouvillonnage nasal. L'analyse préalable avec les puces Alere® a montré que les 5 isolats sont génotypiquement identiques à la souche isolée des hémocultures du même patient. Ceci n'exclut donc pas la présence de variations subtiles de type *single nucleotide polymorphism* (SNP) que nous nous proposons d'identifier par séquençage génomique des 5 + 1 isolats. L'ensemble des souches est en cours de séquençage au centre de génomique de l'Institut Pasteur.

Evaluation de l'immunodépression au cours du choc toxique staphylococcique

Les objectifs sont (i) Evaluer l'état d'immunodépression des patients en choc toxique staphylococcique ; (ii) Améliorer la compréhension de mécanismes physiopathologiques du choc toxique staphylococcique ; (iii) Trouver un **biomarqueur pronostic des chocs toxiques**.

Cliniquement proches, les chocs septiques et les chocs toxiques associent fièvre, hypotension, dysfonctions d'organes et ne diffèrent que par la présence de signes cutanés (i.e. érythrodermie et desquamation). Bien que mettant tous deux en jeu une réponse immuno inflammatoire exacerbée, ils diffèrent par leurs stimuli initiaux. La réponse immunitaire observée au cours du choc septique est décrite comme biphasique, une réponse anti-inflammatoire succédant 48 à 72h après la réponse inflammatoire initiale. Parmi les marqueurs de suivi de la réponse immunitaire décrits, la mesure du HLA-DR monocytaire semble d'intérêt, cette dernière ayant une valeur prédictive de la mortalité au delà de 48 heures³⁹. Par ailleurs, les superantigènes ciblent les lymphocytes T mais leur action sur les différentes sous populations lymphocytaires T reste méconnue. La sous entité des lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25+CD127-FOXP3+) intervient dans le contrôle de la réponse immunitaire. Au cours du choc septique, leurs nombres restent constants et ils présentent des fonctions suppressives accrues, corrélées avec la survie des patients et pouvant

³⁸Wertheim et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. The Lancet infectious diseases (2005) vol. 5 (12) pp. 751-62

³⁹Monneret, G., et al., Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. Intensive Care Med, 2006. 32(8): p. 1175-83.

contribuer à l'immunodépression observée chez ces patients^{40, 41}. Au cours du choc toxique, l'existence ou non d'une immunodépression réactionnelle et le comportement des lymphocytes T régulateurs (numération en pourcentage et en valeur absolue, fonctionnalité) reste inconnue.

A partir d'un prélèvement sanguin des patients datant de moins de 24h, nous allons isoler des cellules mononuclées et déterminer les « signatures Vbéta » par cytométrie de flux, la numération et le pourcentage des lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25+CD127-), ainsi que l'expression du HLA-DR monocytaire.

Des résultats préliminaires sur 5 patients (2 chocs toxiques staphylococciques menstruels, 2 chocs toxiques staphylococciques non menstruels, 1 choc toxique streptococcique), ont révélé une expansion clonale des répertoires Vbéta ciblés par la toxine impliquée (i.e. Vbéta 2 pour la TSST-1 dans nos 5 cas). Cependant, la mesure de l'expression du HLA-DR monocytaire est restée élevée, en accord avec les scores de gravités des malades et démontrant l'indépendance de l'évolution du HLA-DR monocytaire par rapport aux réactions superantigéniques. Par ailleurs, la numération des lymphocytes T régulateurs montre une augmentation tant en pourcentage qu'en valeur absolue de leurs nombres sans lymphopénie associée contrastant avec les données obtenues au cours du choc septique. Récemment, Taylor et Llewelyn⁴² ont montré à l'aide de PBMC stimulés *in vitro* par des superantigènes l'induction d'une conversion des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T régulateurs induits doués de propriétés suppressives. Ainsi, l'augmentation des lymphocytes T régulateurs mesurée pourrait être due à ce phénomène.

Ces données nécessitent : (i) d'être étayées sur un plus grand nombre de patients ; (ii) la mise au point d'un test de suppression permettant l'évaluation de la fonctionnalité suppressive des lymphocytes T régulateurs; et (iii) la mesure de l'expression des répertoires Vbéta ciblés par la toxine impliquée dans la sous-population des lymphocytes T régulateurs.

Projet « Etude de l'histoire évolutive du clone européen ST80 par séquençage à haut débit de génomes complets »

Collaboration : CNR des staphylocoques, Lyon, France - Serum Staten Institut, Copenhague, Danemark - Translational Genomics Research Institute North's Center

⁴⁰ Venet, F., et al., Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*, 2009. 35(4): p. 678-86.

⁴¹ Venet, F., et al., Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(3): p. 523-35.

⁴² Taylor, A.L. et al. Superantigen-Induced Proliferation of Human CD4+CD25- T Cells Is Followed by a Switch to a Functional Regulatory Phenotype. *J Immunol*, 2010. 185(11): p. 6591-8.

for Microbiomics and Human Health, Flagstaff, US – Museum d’Histoire Naturelle, Paris, France.

Le clone SARM-C circulant majoritairement en Europe et au Maghreb est le clone ST80 producteur de la PVL. Il est présenté comme l’équivalent du clone USA300 PVL+ qui a rapidement disséminé sur le continent américain et représente maintenant plus de 50% des infections staphylococciques aussi bien en ville qu’à l’Hôpital et qui constitue un problème majeur de santé publique dans ce pays.

L’objectif du projet est (i) de comprendre la structure génétique et l’histoire évolutive du clone européen ST80 (étude phylogénique et phylogéographique); (ii) d’identifier les glissements et sauts génétiques (perte/acquisition d’éléments mobiles ou de fonctions ou caractères spécifiques) pouvant être associés avec des processus biologiques de l’évolution de ce clone en termes de virulence ou de résistance aux antibiotiques.

L’étude est basée sur le séquençage d’une importante collection de souches ST80 (n=80) représentatives de la diversité temporelle (1993-2010), géographique (Europe, Moyen Orient, Afrique du Nord) et génétique (SARM/SASM, *spa-types*, PVL+/-) de ce clone. Cette étude devrait apporter un éclairage nouveau sur les conditions ayant permis l’émergence du clone ST80 et nous aider à mieux comprendre, mieux appréhender voire mieux contrôler sa dissémination.

Le CNR a obtenu pour ce projet un financement spécifique dans le cadre des « Pfizer Aspire Award» en 2010. Le séquençage des souches a été réalisé en 2011 et l’analyse des données phylo-géographiques à partir de ces génomes complets est en cours en collaboration avec l’équipe de Thierry Wirth au Museum d’Histoires Naturelles et de Robert Skov au Serum Staten Institut de Copenhague.

Projet « clones ST398 »

Collaboration : CNR des staphylocoques, Lyon, France - Serum Staten Institut, Copenhague, Danemark - Translational Genomics Research Institute North’s Center for Microbiomics and Human Health, Flagstaff, US.

La détection récente du portage de souches de SARM chez les animaux d’élevage, notamment les porcs, et la transmission de telles souches à l’homme constitue une source d’inquiétude importante en terme de santé publique, plus particulièrement dans les pays d’Europe du Nord où la prévalence de ces souches chez l’animal et dans les infections humaines s’avère élevée. En effet, la transmission Animal-Homme semble nécessiter des contacts étroits et répétés et les souches animales semblent mal adaptées à l’Homme. Néanmoins certaines infections

semblent correspondre à des transmissions interhumaines et des bouffées épidémiques sporadiques ont été rapportées. Il n'est pas établi si les souches impliquées dans ces cas humains résultent ou non d'une adaptation à l'homme de souches animales. L'une des inquiétudes est la capacité de ces souches animales au cours de leur passage, même transitoire, chez l'Homme à acquérir des traits génétiques leur permettant une adaptation à l'hôte humain qui assurerait une dissémination secondaire de ce clone.

Par ailleurs, en France, le niveau de colonisation à SARM ST398 est plus faible du fait du faible échange d'animaux avec les autres pays et le nombre de cas humains est limité. En revanche, l'utilisation des puces à ADN en routine au CNR des staphylocoques a permis d'identifier un nombre important de souches de SASM ST398 responsables d'infections humaines parfois sévères, notamment des endocardites infectieuses. L'ensemble de ces données conduit à se poser plusieurs questions : (i) Quelle est l'histoire évolutive de ce clone SARM ST398 ? (ii) Les souches animales SARM ST398 sont-elles capables d'évoluer pour s'adapter à l'homme ? (iii) Quels sont les liens entre les populations de souches SARM ST398 et SASM ST398 ? (iv) Existe-t-il des facteurs de virulence particuliers au sein des ST398 ?

Pour répondre à l'ensemble de ces questions, une étude basée sur le séquençage de 90 souches animales et humaines, de SASM et de SARM, et provenant de différents pays européens a été initiée. L'analyse des données génétiques obtenues devrait permettre d'apporter un éclairage sur ces questions dont les implications en terme de santé publique et de gestion du risque sanitaire animale et humain mais aussi en terme économique compte tenu de l'importance de la filière porcine en France et en Europe sont importants.

Les résultats, récemment publiés dans MBio⁴³, suggèrent que les souches MRSA ST398 isolées actuellement trouvent leur origine au sein de MSSA ST398. Cette lignée ST398 semble avoir évolué rapidement au moment de son changement de niche écologique après son transfert de l'homme à l'animal, chez qui elle aurait alors acquis les résistances à la méticilline et à la tétracycline. Des analyses complémentaires sont en cours afin de comprendre en détails les modifications induites et leur implication en terme de virulence phénotypique.

⁴³ Price, L. B. et al. (2011). *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. mBio, 3(1), e00305–11

4. Alerte

- décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal
- descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année
- analyse des tendances et du fonctionnement du système

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.

Alerte nouveaux variants du gène *mecA*

En juin 2011, de nouveaux clones de *S. aureus* résistants à la méticilline mais multisensibles pour les autres familles d'antibiotiques ont été décrits chez des bovins et chez l'homme au Royaume-Uni et au Danemark. Ces souches portent un nouveau variant du gène *mecA*, appelé *mecALGA251* et présentant moins de 70% d'homologie avec le gène *mecA* (PCR *mecA* négative). Un criblage des souches de collection du CNR et de souches de collection de collègues hospitaliers a permis très rapidement de montrer que de telles souches circulaient en France

Dans le cadre de son activité de surveillance de la résistance aux antibiotiques, le CNR des staphylocoques, **en accord et en lien avec l'InVS**, a souhaité alerter l'ensemble des microbiologistes et équipes opérationnelles d'hygiène de l'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* portant ce variant du gène *mecA* en insistant notamment sur la résistance phénotypique atypique de type SARM (cefoxitine/moxalactam/oxacilline) sans résistance associée notamment aux fluoroquinolones et aux aminosides et sur la difficulté de détection et de confirmation de cette résistance à la méticilline. Ces caractéristiques étaient associées à des résultats négatifs pour les tests d'agglutination ou immunochromatographiques ciblant la PLP2a et pour la recherche du gène *mecA* quels que soient les réactifs utilisés (PCR maison ou kits commerciaux).

Dans ce contexte, il était notamment important de rappeler qu'un résultat négatif pour la recherche du gène *mecA* ne devait pas amener à modifier le niveau de résistance à la méticilline détecté phénotypiquement, la positivité de la recherche du gène *mecA* ne permettant que de confirmer la résistance par production de PLP2a, sa négativité n'étant pas une preuve de l'absence de résistance à la méticilline.

Par ailleurs, dans le but d'évaluer la prévalence en France de ces nouveaux variants, nous avons demandé aux microbiologistes français de nous adresser toutes souches de SARM multisensibles (en particulier à tous les aminosides et aux fluoroquinolones) et présentant une PCR *mecA* négative ou un test Clearview Exact PBP2a négatif ou un test de latex PBP2a négatif. Nous avons pu ainsi identifier 7 souches humaines porteuses du variant du gène *mecA*, désormais appelé *mecC*.

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

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

Dauwalder O. Facteurs de virulence staphylococciques. Colloque de service clinique du Pavillon N à la destination des réanimateurs – Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France. (à chaque changement d'internes).

Dauwalder O. MSBM Physiopathologie des maladies infectieuses – Choc toxique, choc septique et choc endotoxinique – 4 heures.

Dauwalder O. Master 1 mention Génétique et Biologie de la Cellule (GBC) - Unité d'enseignement «Immunopathologie » - Superantigènes et chocs toxiques - 16/03/2011 16h00-17h30

Laurent F. Staphylocoques en 2012 : Nouveaux clones et nouvelles résistances. Probioqual, Décembre 2011

Laurent F. Biofilm bactérien. DESC Maladies infectieuses, Paris, Mai 2011

Laurent F. FMC Infections ostéo-articulaire. Organisée avec le laboratoire bioMérieux. 8 Février 2011, 15 Octobre 2011, 27 avril 2012

Laurent F. KMR et *Staphylococcus aureus*. FMC ONERBA - Kits moléculaires de résistance aux antibiotiques et réseaux de surveillance, 21 Mars 2011

Lina G. Les toxémies staphylococciques, DIU interrégionale de Pathologie Infectieuse Pédiatrique, depuis 2000 (1 heure d'enseignement magistral), Université Claude Bernard - Lyon I

Lina G. Microbiologie des infections ostéo-articulaires. Journée bioMérieux 2007, Marcy l'Etoile.

Tristan A. Enseignement post-universitaire en bactériologie. Colloque de Pédiatrie. Formation médicale continue. Les syndromes toxiques staphylococciques, Reims, 28 janvier 2011

Stagiaires

Dans le cadre des échanges et transfert de technologie avec des laboratoires de différents

pays, le CNR a reçu en 2011 des biologistes ou étudiants de pays étrangers afin de transmettre des compétences mais ces collaborations permettent aussi de disposer d'un système de veille concernant l'épidémiologie globale et les clones circulants dans des pays tiers qui pour des raisons géographiques, de flux touristiques ou migratoires pourraient constituer des réservoirs de nouveaux clones susceptibles d'être introduits et de disséminer en France.

Dans le cadre de notre collaboration avec l'Hôpital Moustapha Pacha d'Alger et du projet financé INSERM/DPGRF, le CNR a accueilli une étudiante en thèse, Melle Kenza Antri, venue se perfectionner dans le domaine des techniques de caractérisation moléculaire des *S. aureus*.

De plus, comme chaque année, le CNR a encadré des étudiants en master 1, en master 2 et en thèse que ce soit d'exercice ou d'Université soit sur des sujets de recherche directement appliquée ou plus fondamentaux sur les différentes thématiques du CNR.

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

Le CNR n'a pas publié en 2011 de guide ou de recommandation officielle ; en revanche il a publié des recommandations sur la prise en charge thérapeutique des infections à *S. aureus* PVL positive, sous la forme d'un article de revue dans un PICOL⁴⁴.

53. Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

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

Site Internet

Le CNR dispose d'un site internet http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_staphylocoques/ où figure l'ensemble des éléments concernant le fonctionnement du CNR (missions générales et spécifiques, coordonnées des membres du CNR, fiches de renseignements), les modalités d'envoi des souches et les fiches devant accompagner tout envoi au CNR, les analyses réalisées par le CNR, les documents concernant les enquêtes en cours (PHRC...), une synthèse concernant les différentes formes d'infection staphylococcique et leurs

⁴⁴Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Pragmatic management of Panton-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. Int J Antimicrob Agents. 2011 Dec;38(6):457-64. Epub 2011 Jul 5. Review

caractéristiques, les recommandations concernant la prise en charge des infections staphylococciques, les collaborations passées et en cours, les bilans annuels ou quadriennaux, ainsi que les congrès ou formations organisés par le CNR.

Interventions en séminaires FMC et Congrès

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

Organisation de FMC spécifiques

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

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

Organisation de colloques et congrès

Depuis 2008, le CNR a organisé à Lyon sur un rythme biennal le symposium de langue Française sur les staphylocoques « SympoStaph » (14 et 15 octobre 2008 ; 14 et 15 octobre 2010). Ce colloque francophone sur les staphylocoques et les maladies staphylococciques organisé en partenariat avec l'InVS, l'INSERM, les Hôpitaux de Lyon et l'Université de Lyon est un lieu d'échanges sur les staphylocoques humains et animaux, sur les aspects cliniques, épidémiologiques, physiopathologiques des infections staphylococciques, mais aussi de la réponse de l'hôte et d'aspects plus fondamentaux avec un objectif de compréhension des maladies staphylococciques. SympoStaph a réuni plus de 200 participants issus du monde des cliniciens, vétérinaires, épidémiologistes, biologistes, chercheurs et industriels avec la participation de collègues Suisses, Belges, Canadiens et d'Afrique du Nord.

En Aout 2012, François Vandenesch (assisté de G. Lina) est l'organisateur du congrès International sur les staphylocoques et les infections staphylococciques. Le programme de ce

congrès (International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections) couvrira un large éventail de thèmes cliniques et de recherche sur le staphylocoque touchant à la physiologie bactérienne, la résistance aux agents anti-infectieux et aux outils thérapeutiques et prophylactiques. Les sessions seront présentées par des experts mondiaux dans chacun de ces domaines. Des communications orales sur abstract et des sessions posters font partie intégrale du programme et tous les participants sont invités à soumettre des abstracts. Les détails et le programme de congrès sont consultables sur le site internet du congrès : <http://iss2012.univ-lyon1.fr/fr>

Publications didactiques en français

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

54. Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Les différentes demandes adressées au CNR sont gérées à travers un colloque hebdomadaire qui réunit l'ensemble des biologistes et cliniciens du CNR. Ce colloque permet de décider de la réponse à fournir en fonction de chaque sollicitation venant d'un professionnel. En cas d'urgence, des réunions de concertation sont organisées sans délais. Les résultats obtenus pour chaque souche adressée au CNR font l'objet d'une réponse individuelle et spécifique à chaque contexte clinique par courrier (1100 courriers en 2011). En fonction du contexte et de la nature des résultats obtenus, des contacts téléphoniques sont établis avec les cliniciens et/ou microbiologistes ayant adressé la demande. L'analyse des cas groupés fait l'objet d'un rapport présentant les résultats obtenus et les conseils du CNR afin d'assurer au mieux la gestion de ces épisodes.

55. Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

InVS

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

Instances Judiciaires

Le CNR est intervenu auprès des instances judiciaires à plusieurs reprises afin d'apporter son expertise pour l'analyse de données et/ou dans la réalisation de travaux dans le cadre de certaines enquêtes à la demande du pôle de santé publique du Tribunal de Grande Instance de Paris. A titre d'exemple récent, le CNR a assuré en collaboration avec le laboratoire de microbiologie de l'assistance publique de Marseille, la recherche et la caractérisation des souches et des toxines présentes dans les prélèvements cliniques, autopsiques et environnementaux impliquant une chaîne de restauration rapide à Avignon.

ECDC – EARSS *Staphylococcus*

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

Frédérique Laurent est :

- Membre du comité exécutif de l'European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) (ESCMID) depuis 2010

- Membre du Scientific Advisory Board de l'European Staphylococci Reference laboratory- ECDC depuis 2009
- Membre du Consortium Staphylococcal Reference Laboratories (SRL) – EARSS/ECDC depuis 2007

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 thématique sur les staphylocoques. Il existe donc un continuum entre la recherche fondamentale, la recherche clinique et la recherche translationnelle, l'activité de CNR étant située plutôt sur les versants clinique et translationnel de ces recherches.

L'équipe INSERM dirigée par F. Vandenesch est intégrée depuis le 1 janvier 2007 dans une formation de 9 équipes (**INSERM U851, Dir J. Marvel, Dir Adjoint F.Vandenesch**) qui réunit des équipes d'immunologistes, de virologues et de bactériologistes. Plus récemment, notre équipe a été rejointe par la jeune équipe de Thomas Henry, immunologiste de formation et spécialiste de l'inflammasome. A l'occasion du nouveau contrat quadriennal (évalué par l'AERS en janvier 2010), nous avons décidé avec T. Henry de former un groupe plus large, dont la thématique est « Pathogénie Bactérienne et Immunité Innée ». Ce groupe est piloté par F. Vandenesch avec 3 investigateurs principaux : F. Vandenesch, G. Lina et Th. Henry. Le fil conducteur de notre projet actuel est que l'issue des infections bactériennes résulte de la balance entre les facteurs de virulence et la réponse de l'hôte. Nous nous intéressons aux interactions hôtes pathogènes dans trois modèles bactériens *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* et *Francisella tularensis*, ces trois bactéries ayant en commun le poumon comme l'un des organes cibles⁴⁵. Trois axes de recherche sont développés : un axe clinique et deux axes de recherche fondamentale portant sur les facteurs de virulence bactériens et sur la réponse immunitaire de l'hôte. Notre recherche clinique porte sur l'épidémiologie, la pathophysiologie et la microbiologie de ces trois pathogènes. Cette recherche s'appuie sur le réseau clinico-biologique et les bibliothèques du Centre National de Référence des Staphylocoques et des Légionelles. L'objectif est de suivre l'épidémiologie, de détecter les phénomènes émergents, d'identifier les facteurs de pronostic favorable,

⁴⁵ En particulier dans le cas des pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteurs de PVL, de la légionellose dont le poumon est l'organe cible et de *Francisella tularensis* utilisée en aérosol dans le cadre de la menace bioterroriste.

notamment thérapeutiques, et les facteurs génétiques de susceptibilité de l'hôte. Sur un versant bactérien plus fondamental, 3 thématiques sont développées : (i) l'étude de la régulation de l'expression des facteurs de virulence, (ii) l'identification des ARN non-codants chez *S. aureus* et *L. pneumophila* et l'étude de leur rôle dans la virulence bactérienne, (iii) l'analyse des stratégies d'adhésion de *L. pneumophila* et de *S. aureus* aux héparanes sulfates des cellules hôtes. Du côté de l'hôte, nous caractérisons le rôle antitumoral des superantigènes de *S. aureus* et leur effet de conversion des cellules T régulatrices en Th17 et son implication possible dans des pathologies autoimmunes. Finalement, nous étudions la réponse immunitaire innée des cellules épithéliales et myéloïdes vis-à-vis de *S. aureus* (PVL+) et des bactéries intracellulaires *Legionella* et *Francisella*. Nous cherchons à identifier les facteurs bactériens et les facteurs d'hôte conduisant à l'activation et à la régulation de l'inflammasome, une voie de signalisation de l'immunité innée, importante dans la lutte contre les infections bactériennes.

Ainsi, par nos 3 niveaux de recherche (clinique, microbiologique et immunologique), nous développons des thématiques intégrées du patient jusqu'aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la maladie. En 2011, les principaux **faits marquants** de cette recherche en lien avec le CNR des staphylocoques peuvent être **illustrés par les 8 publications suivantes** :

Cross-talk between Staphylococcus aureus leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner.

Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, Cottin V, Couzon F, Juruj C, Dauwalder O, Goutagny N, Diep BA, Vandenesch F, Henry T.

Cell Microbiol. 2012 Feb 14. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01772.x. [Epub ahead of print]

Dans cet article de physiopathologie, le rôle de la PVL dans l'activation de l'inflammasome (un système de l'immunité innée de réponse aux agressions des pathogènes) est démontré *in vitro* et sur des macrophages alvéolaires humains isolé de patients. L'identification de ce mécanisme contribue à expliquer l'emballement de la réponse inflammatoire conduisant à des effets délétères au cours de la pneumonie nécrosante à *S.aureus* PVL+. L'étude de souches cliniques issues de pneumonies PVL+ et PVL-, recrutées dans le cadre du CNR a permis de confirmer cette hypothèse en révélant un lien entre activation de l'inflammasome *in vitro* et production de PVL.

Beta-lactams interfering with PBPI induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and rot global regulators of Staphylococcus aureus.

Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Wolz C, Vandenesch F, Etienne J, Cheung AL, Bowden MG, Lina G.

Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3261-71. Epub 2011 Apr 18.

Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by Staphylococcus aureus.

Rasigade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O.

BMC Microbiol. 2011 Dec 14;11:263

Ces deux articles poursuivent l'exploration de l'interférence produite par les antibiotiques sur l'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* et des mécanismes mis en jeu. Les exotoxines, dont la PVL, mais aussi certains facteurs d'adhésion voient ainsi leur expression augmentée en présence de certains antibiotiques à concentrations sub-inhibitrices. Ces observations plaident pour une prise en compte de ce cet effet collatéral et potentiellement délétère dans les schémas thérapeutiques des infections graves.

Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of Staphylococcus aureus skin infections: a rabbit model.

Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L, Haesebrouck F, Etienne J, Lina G.

PLoS One. 2011;6(8):e22864. Epub 2011 Aug 5.

Cet article de physiopathologie établit un lien expérimental fort entre la production de PVL et les infections cutanées. Il confirme les observations épidémiologiques de notre groupe et infirme les conclusions de certaines études américaines qui mettent en doute le rôle causal de la PVL dans les infections cutanées. Cet article redonne donc de l'importance à la prise en compte de la PVL pour la thérapeutique et éventuellement la prophylaxie des infections cutanées à *S. aureus* PVL+.

A history of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia.

Rasigade JP, Sicot N, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Etienne J.

Vaccine. 2011 Jun 6;29(25):4185-6. Epub 2011 Apr 27.

Cette étude basée sur la détection des anticorps anti-pvl chez 114 sujets convalescents de pneumonie à *S. aureus* PVL, confirme le rôle protecteur des anticorps anti-pvl vis-à-vis de la sévérité de l'infection et de la survie. Il est légitime de poursuivre les recherches sur les vaccins anti-pvl et les thérapeutiques adjuvantes visant à neutraliser l'effet de cette toxine dans les infections sévères.

T-cell response to superantigen restimulation during menstrual toxic shock syndrome.

Rasigade JP, Thomas D, Perpoint T, Peyramond D, Chidiac C, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Ferry T.

FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Aug;62(3):368-71. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00808.x. Epub 2011 May 9.

En étudiant la capacité des cellules T d'un sujet victime de choc toxique staphylococcique à réagir *ex vivo* à un nouveau contact avec la TSST-1, nous avons montré que les cellules des patients restaient parfaitement stimulables par le superantigène contrairement au modèle habituellement proposé d'anergie transitoire de la réponse T. Dans la mesure où les effets délétères du choc toxique sont liés à l'emballement de la réponse inflammatoire liée à cette prolifération T, ce résultat légitime une attitude thérapeutique agressive et précoce vis à vis de *S. aureus* producteur de superantigène au cours du choc menstruel puisque les effets délétères du superantigène se poursuivent théoriquement aussi longtemps que le superantigène est produit.

Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.

Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, Meugnier H, Benito Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Boisset S.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Mar;30(3):343-54. Epub 2010 Oct 22.

Cet article rapporte la mise au point technique d'une méthode de PCR séquençage pour l'identification des espèces de staphylocoque avec une précision et une fiabilité supérieure à celle de la technique de MALDI-TOF. La mise au point de cet outil typiquement adapté à un CNR est cependant transférable dans n'importe quel laboratoire disposant des méthodes de PCR-séquençage.

Are host genetics the predominant determinant of persistent nasal Staphylococcus aureus carriage in humans?

Ruimy R, Angebault C, Djossou F, Dupont C, Epelboin L, Jarraud S, Lefevre LA, Bes M, Lixandru BE, Bertine M, El Miniai A, Renard M, Bettinger RM, Lescat M, Clermont O, Peroz G, Lina G, Tavakol M, Vandenesch F, van Belkum A, Rousset F, Andremont A.

J Infect Dis. 2010 Sep 15;202(6):924-34.

Dans cette étude réalisée en collaboration au sein d'une population isolée d'Amérindiens de Guyane Française la confirmation que le portage nasal est dépendant de certains traits génétiques humains est établie. Ceci renforce l'hypothèse que tous les humains n'ont pas la même réponse vis-à-vis des méthodes de décontamination ou de prophylaxie vis-à-vis du portage nasal. Cet élément devra probablement être intégré dans l'avenir aux stratégies de *search and destroy* actuellement préconisées de manière non différenciée selon les prédispositions de l'hôte.

Collaborations scientifiques nationales en cours

Effet de *S. aureus* sur la différenciation et la résorption osseuse ostéoclastique *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'infection sur prothèse.

Pr P JURDIC, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (CNRS UMR 5242/ENS/UCBL) team "Biologie cellulaire et physiopathologie osseuse" – Ecole Normale Supérieure de Lyon

Pr AC Crémieux, EA 3647 Physiopathologie et diagnostic des infections microbiennes (EPIM) - Université Versailles Saint Quentin

Etude de la réponse NK après internalisation de *S. aureus* dans les ostéoblastes humains.

T. Walzer, Inserm U851 -Equipe "Différenciation des lymphocytes cytotoxiques et NK"

Capacité de colonisation digestive du clone *Staphylococcus capitis* NRCS-A et sélection *in vivo* de mutants résistants aux glycopeptides en modèle murin axénique

Pr Doucet-Populaire, EA 4043 USC INRA "Ecosystème microbien digestif et santé", Université Paris Sud

Capacité de colonisation digestive des SARM communautaires en modèle murin axénique

Pr Doucet-Populaire, EA 4043 USC INRA "Ecosystème microbien digestif et santé",
Université Paris Sud

**Analyse par génomique comparative des Facteurs bactériens associés à une localisation
à l'endocardite au cours des bactériémies à *Staphylococcus aureus***

Sylvain Brisse, Centre de génomique de l'Institut Pasteur, Paris

**PHRC ORISA "Etude Observationnelle et comparative de la réponse immunitaire des
patients présentant des infections à *Staphylococcus aureus* de plaies chroniques"**

Pr Lavigne, CHU Nîmes

Etude de la prévalence des nouveaux variants *mecC* en France

Collège de bactériologie des Hôpitaux généraux (ColBVH)

Groupe AZAY

Collaborations scientifiques internationales en cours

**Phylogénie temporelle et phylogéographie du clone SARM européen communautaire
ST80 par séquençage des génomes complets**

Pr R. Skov (Serum, Staten Institut, Copenhague, Danemark), Pr L. Price (TGen North's
Center for Microbiomics and Human Health, Flagstaff, USA)

Complexe clonal CC398 et phylogénie mondiale

Pr R. Skov (Serum, Staten Institut, Copenhague, Danemark), Pr L. Price (TGen North's
Center for Microbiomics and Human Health, Flagstaff, USA)

**Impact des toxines cytolytiques et des systèmes de régulation à deux composants dans la
cytotoxicité des souches hypervirulentes de *S. aureus* en modèle d'infection
intracellulaire d'ostéoblastes humains**

Dr B.A. Diep, Division of Infectious Diseases, University of California (San Francisco, CA)

**Recherche par génomique comparative des facteurs impliqués dans la cytotoxicité de *S.*
aureus vis-à-vis des cellules eucaryotes non-immunes**

P.J. Howden, Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, R-U), et H. Grundmann, National Institute for Public Health (Bilthoven, Pays-Bas).

Clonalité et résistance aux glycopeptides chez les souches de *Staphylococcus capitis* responsables de sepsis tardifs en réanimation néonatale

Dr A.M. Kearns, *Staphylococcus* Reference Unit, Health Protection Agency (Londres, R-U) ;
Dr O. Denis, Centre National de Référence *S. aureus*, Cliniques Universitaires de Bruxelles ;
et Pr M.A. Deighton, RMIT University (Melbourne, Australie).

Histoire évolutive récente des souches clonales de *Staphylococcus capitis* responsables de sepsis tardifs en réanimation néonatale

Pr R.V. Goering, Creighton University (Omaha, NE).

Séquençage génomique complet d'une souche du clone NRCS-A de *Staphylococcus capitis*

Dr S. Lemriss, Laboratoire de la Gendarmerie Royale (Rabat, Maroc).

Variabilité des taux d'anticorps dirigés contre la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) dans la population générale des zones de faible et forte prévalence de *S. aureus* PVL-positifs

Dr S. Breurec, Institut Pasteur de Dakar (Sénégal), Dr N. Ramdani-Bougessa, CHU Mustapha Pacha (Alger, Algérie), Dr W.J. van Wamel, Eijkman-Winkler Institute (Utrecht, Pays-Bas).

***Staphylococcus aureus* méticillino-résistant producteur de la toxine leucocidine de Panton et Valentine: portage communautaires, impact dans les infections communautaires, prévalence dans l'environnement et chez l'animal à Alger**

Pr N. Ramdani-Bougessa – Centre Hospitalier Moustapha Pacha, Alger, Algérie.

7. Liste des publications et communications

71. Publications nationales

72. Publications internationales

Rasigade JP, Raulin O, Picaud JC, Tellini C, Bes M, Grando J, Ben Saïd M, Claris O, Etienne J, Tigaud S, Laurent F. Methicillin-Resistant *Staphylococcus capitis* with Reduced Vancomycin Susceptibility Causes Late-Onset Sepsis in Intensive Care Neonates. PLoS ONE 7(2): e31548. doi:10.1371/journal.pone.0031548

Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G. Newinsights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012 Feb;39(2):96-104. Epub 2011 Dec 21.

Del Giudice P, Tattevin P, Etienne J. [Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Review.]. Presse Med. 2011 Dec 16. [Epub ahead of print] French.

Dumitrescu O, Dauwalder O, Lina G. Present and future automation in bacteriology. Clin Microb Infect 2011;17:649-50.

Rasigade JP, Moulay A, Lhoste Y, Tristan A, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Laurent F, Dumitrescu O. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 2011 Dec 14;11:263.

Adrait A, Lebert D, Trauchessec M, Dupuis A, Louwagie M, Masselon C, Jaquinod M, Chevalier B, Vandenesch F, Garin J, Bruley C, Brun V. Development of a Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in serum. J Proteomics. 2011 Dec 6. [Epub ahead of print]

Haenni M, Saras E, Châtre P, Médaille C, Bes M, Madec JY, Laurent F. A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France. J Antimicrob Chemother. 2012 Feb;67(2):326-9. Epub 2011 Dec 6.

Pichereau S, Pantrangi M, Couet W, Badiou C, Lina G, Shukla SK, Rose WE. Simulated antibiotic exposures in an in vitro hollow-fiber infection model influence toxin gene expression and production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jan;56(1):140-7. Epub 2011 Nov 7.

Lebeaux D, Barbier F, Angebault C, Benmahdi L, Ruppé E, Felix B, Gaillard K, Djossou F, Epelboin L, Dupont C, Renard M, Peroz G, Vandenesch F, Wolff M, Andremont A, Ruimy R. Evolution of nasal carriage of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a remote population. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jan;56(1):315-23. Epub 2011 Nov 7.

Lamy B, Laurent F, Gallon O, Doucet-Populaire F, Etienne J, Decousser JW; The Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group. Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among *Staphylococcus aureus* isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Oct 14. [Epub ahead of print]

Catho G, Gillet Y, Dumitrescu O, Lina G, Labbé G, Bellon G, Reix P. [Intrafamilial transmission of *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin responsible for two cases of neonatal necrotizing pneumonia]. Arch Pediatr. 2011 Oct;18(10):1090-4. Epub 2011 Sep 1. French.

Lipinska U, Hermans K, Meulemans L, Dumitrescu O, Badiou C, Duchateau L, Haesebrouck F, Etienne J, Lina G. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: a rabbit model. PLoS One. 2011;6(8):e22864. Epub 2011 Aug 5.

Nowrouzian FL, Dauwalder O, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lindberg E, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Aberg N, Adlerberth I, Wold AE, Lina G. Adhesin and superantigen genes and the capacity of *Staphylococcus aureus* to colonize the infantile gut. J Infect Dis. 2011 Sep 1;204(5):714-21.

Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Pragmatic management of Panton-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. Int J Antimicrob Agents. 2011 Dec;38(6):457-64. Epub 2011 Jul 5. Review.

Hubiche T, Bes M, Roudiere L, Langlaude F, Etienne J, Del Giudice P. Mild staphylococcal scalded skin syndrome: an underdiagnosed clinical disorder. Br J Dermatol. 2012 Jan;166(1):213-5. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10515.x. Epub 2011 Sep 29.

Haenni M, Châtre P, Boisset S, Carricajo A, Bes M, Laurent F, Madec JY. Staphylococcal nasal carriage in calves: multiresistant *Staphylococcus sciuri* and immune evasion cluster (IEC) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. J Antimicrob Chemother. 2011 Aug;66(8):1927-8. Epub 2011 May 24.

Caillault-Sergent A, Illinger J, Dauwalder O, Nesme P, Argaud L. - Necrotising community-acquired pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-secreting *Staphylococcus aureus*: A rare diagnosis to be evoked. - Presse Med. 2011 ;40(10):966-70.

Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes M, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. . Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecALGA251. Clin Microb Infect. Accepted manuscript online: 2011 Nov.

Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. J Microbiol Methods. 2011 Aug;86(2):145-9. Epub 2011 Apr 27.

Rasigade JP, Sicot N, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A history of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia. Vaccine. 2011 Jun 6;29(25):4185-6. Epub 2011 Apr 27.

Dumitrescu O, Choudhury P, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Wolz C, Vandenesch F, Etienne J, Cheung AL, Bowden MG, Lina G. Beta-lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering sarA and other global regulators of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3261-71. Epub 2011 Apr 18.

Sanchini A, Campanile F, Monaco M, Cafiso V, Rasigade JP, Laurent F, Etienne J, Stefani S, Pantosti A. DNA microarray-based characterisation of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Nov;30(11):1399-408. Epub 2011 Apr 17.

Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehrlich R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2011 Apr 6;6(4):e17936.

Filleron A, Chiron R, Reverdy ME, Jean-Pierre H, Dumitrescu O, Aleyrangues L, Counil F, Jumas-Bilak E, Marchandin H. Utility of the E-test GRD for detecting *Staphylococcus aureus* with reduced

susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011

Filleron A, Chiron R, Reverdy ME, Jean-Pierre H, Dumitrescu O, Aleyrangues L, Counil F, Jumas-Bilak E, Marchandin H. *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2011;10:377-82

Rasigade JP, Thomas D, Perpoint T, Peyramond D, Chidiac C, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Ferry T. T-cell response to superantigen restimulation during menstrual toxic shock syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Aug;62(3):368-71.

Carré N, Herbreteau N, Askeur N, Dabas JP, Sillam F, Pinchon C, Bes M, Tristan A, Vandenesch F. [Outbreak of skin infections due to *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes in pupils and their relatives]. *Med Mal Infect*. 2011 Jul;41(7):364-71. Epub 2011 Mar 31.

Gallon O, Pina P, Gravet A, Laurent F, Lamy B, Delarbre JM, Doucet-Populaire F, Decousser JW; College de Bacteriologie Virologie Hygiene Study Group. Performance of a New MicroScan WalkAway PC30 panel and disk diffusion method for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*. 2011 Jun;49(6):2269-71. Epub 2011 Mar 30.

Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog*. 2011 Mar;7(3):e1002006. Epub 2011 Mar 10. Review.

Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, Blanc V, Roudière L, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains are associated with follicular skin infections. *Dermatology*. 2011;222(2):167-70. Epub 2011 Feb 22.

Robert J, Tristan A, Cavalié L, Decousser JW, Bes M, Etienne J, Laurent F; ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Panton-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1734-9. Epub 2011 Jan 10.

Chua K, Laurent F, Coombs G, Grayson ML, Howden BP. Antimicrobial resistance: Not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician's guide to community MRSA - its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. *Clin Infect Dis*. 2011 Jan 1;52(1):99-114. Review.

Riegel P, Jesel-Morel L, Laventie B, Boisset S, Vandenesch F, Prévost G. Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *Int J Med Microbiol*. 2011 Mar;301(3):237-9. Epub 2010 Nov 12.

Haenni M, Galofaro L, Ponsin C, Bes M, Laurent F, Madec JY. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jan;66(1):216-8. Epub 2010 Nov 11.

Blanco R, Tristan A, Ezpeleta G, Larsen AR, Bes M, Etienne J, Cisterna R, Laurent F. Molecular epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):433-6. Epub 2010 Nov 10.

Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, Meugnier H, Benito Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Boisset S. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Mar;30(3):343-54. Epub 2010 Oct 22.

Breurec S, Fall C, Pouillot R, Boisier P, Brisse S, Diene-Sarr F, Djibo S, Etienne J, Fonkoua MC, Perrier-Gros-Claude JD, Ramarokoto CE, Randrianirina F, Thiberge JM, Zriouil SB; Working Group on *Staphylococcus aureus* Infections, Garin B, Laurent F. Epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: high prevalence of Pantone-Valentine leukocidin genes. Clin Microbiol Infect. 2011 Apr;17(4):633-9.

Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, Roudière L, Blanc V, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. JEur Acad Dermatol Venereol. 2011 Feb;25(2):164-9.

Antri K, Rouzic N, Dauwalder O, Boubekri I, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Ramdani-Bougoussa N, Etienne J. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. Clin Microbiol Infect. 2011 Apr;17(4):526-32.

Breurec S, Zriouil SB, Fall C, Boisier P, Brisse S, Djibo S, Etienne J, Fonkoua MC, Perrier-Gros-Claude JD, Pouillot R, Ramarokoto CE, Randrianirina F, Tall A, Thiberge JM; Working Group on *Staphylococcus aureus* infections, Laurent F, Garin B. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in five major African towns: emergence and spread of atypical clones. Clin Microbiol Infect. 2011 Feb;17(2):160-5.

Zribi M, Etienne J, El Euch D, Zribi H, Bes M, Meugnier H, Masmoudi A, Osman AB, Fendri C. [Detection of the first strain of glycopeptide intermediary *Staphylococcus aureus* in Tunis Rabta hospital]. Pathol Biol (Paris). 2011 Dec;59(6):334-5. Epub 2009 Nov 25.

73. Revues pour site internet

Tristan A, « *Pathogenesis section for Staphylococcus aureus* » In: V. L. Yu Ed. <http://www.antimicrobe.org>. ESun Technologies, LLC, Pittsburgh, PA. and the textbook Antimicrobial Therapy and Vaccines, Vol I. Microbes 2009 mise à jour en 2011.

74. Communications nationales

741. Communications orales nationales

Briere M, Ruimy R, Angebault C, Djossou F, Moreau B, El Miniai A, Bertine M, Bes M, Vandenesch F, Rousset F, Andremont A. Dynamique et diversité du portage nasal de *Staphylococcus aureus* dans une cohorte humaine communautaire partiellement isolée. 31e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 1-2 décembre 2011.

Valour F, Trouillet S, Rasigade JP, Ferry T, Lustig S, Chanard E, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Mécanismes physiopathologiques des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus epidermidis* : interactions avec les ostéoblastes et formation de biofilm. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, 2011 (Paris).

Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Valour F, Lustig S, Tigaud S, Laurent F. Co-portage nasal de *S. aureus* sensibles à la méticilline et de staphylocoques à coagulase négative résistants, et son potentiel impact sur les méthodes moléculaires de détection des *S. aureus* résistants à la méticilline. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, 2011 (Paris).

Rasigade JP, Trouillet S, Ferry T, Hayraud C, Lhoste Y, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Virulence et persistance intra-ostéoblastique des SARM communautaires et hospitaliers. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, 2011 (Paris).

Heraud S, Laurent F, Dauwalder O, Doléans-Jordheim A, Tristan A, Reverdy ME, Tigaud S, Vandenesch F, Freydiere AM. Évaluation des tests Binax Now® *Staphylococcus aureus* et PBP2a pour l'identification rapide des SASM et SARM sur les hémocultures positives. 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 1-2 décembre 2011.

Lehours P, Tristan A, Leroyer C, Ambrogi V, Bes M, Boyer F, Tandonet O, Lamireau D, Elleau C, Bertrand C, De Barbeyrac B, Mégraud F, Rogues AM. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline appartenant au clone Géraldine : un pathogène émergent ? 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 1-2 décembre 2011.

Chardon H, Haenni M, Barraud O, Delarbre JM, Bes M, Tristan A, Martin C, Gravet A, Maulin L, Brieu N, Madec JY, Vandenesch F, Laurent F. Premières descriptions en France de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) portant un variant du gène *mec* : épidémiologie et caractérisation des souches. 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 1-2 décembre 2011.

Laurent F, Larsen AR, Tristan A, Bes M, Decousser JW, Poirier AS, Chardon H, Haenni M, Doucet-Populaire F, Reverdy ME, Skov R, Vandenesch F. Nouveau variant du gène *mecA* : détection, identification, confirmation et caractérisation moléculaire en routine. 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 1-2 décembre 2011.

Bouaziz A, Blanc-Pattin V, Rasigade JP, Freydière AM, Chanard E, Tigaud S, Laurent F. Diagnostic des infections ostéo-articulaires à SARM et SASM en moins d'une heure : évaluation du test GeneXpert MRSA-SA SSTI. Journées Nationales d'Infectiologie, 2011 (Toulouse).

Rasigade JP, Trouillet S, Lhoste Y, Ferry T, Lustig S, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline hospitaliers versus communautaires : persistance intra-ostéoblastique et virulence. Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique, 2011 (Paris).

Laurent F, Rasigade JP, Chanard E, Ferry T, Freydiere AM, Neyret P, Tigaud S, Lustig S. Diagnostic moléculaire en moins d'une heure des infections ostéo-articulaires (IOA) à SARM et SASM sur prélèvements per-opératoires. Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique, 2011 (Paris).

742. Communications affichées nationales

Javouhey E, Jamen C, Lina G, Dauwalder O, Vandenesch F, Floret, Y Gillet D. Caractéristiques cliniques et pronostic des chocs toxiques staphylococciques et streptococciques chez l'enfant. 2011, Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française, Paris

Rasigade JP, Trouillet S, Bernelin M, Breurec S, Fall C, Ramdani-Bougoussa N, Antri K, Bes M, Tristan A, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. Increasing north-south gradient in serum antibody levels against Panton-Valentine leukocidin in the general populations of

France, Algeria and Senegal. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, 2011 (Paris).

Delarbre JM, Brieu N, Dubourdiou B, Julienne G, Gravet A, Tristan A, Vandenesch F, Laurent F, Chardon H. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline grâce à un variant du gène *mec* (*mecA* négatif) dans le réseau REUSSIR. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011.

Maulin L, Brieu N, Lagier E, Laurent F, H. Chardon A propos de 3 cas d'infection à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) avec un gène *mec* modifié (*mecA* négatif). Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011.

Dauwalder O, Meugnier H, Benito Y, Badiou C, Carbonnelle E, Crapet P, Khau D, Freydiere AM, Durand G, Etienne J, Laurent F, Lina G, Vandenesch F. Détection de la leucocidine de Panton Valentine de *Staphylococcus aureus* par spectrométrie de masse MALDI-TOF : un challenge impossible. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011.

Karsenty S, Tristan A, Laurent F, Reverdy ME, Tigaud S, Vandenesch F, Freydiere AM. Évaluation prospective du milieu Brilliance MRSA2 (OXOID) pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) sur prélèvements de nez. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011

Chyderiotis S, Karsenty J, Tristan A, Laurent F, Reverdy ME, Tigaud S, Vandenesch F, Freydiere AM. Évaluation prospective du milieu Brilliance MRSA2 (OXOID) pour la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) sur prélèvements de nez. 31^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 1-2 décembre 2011.

Traore P, Bourgeois-Nicolaos N, Ruimy R, Laurent F, Labrune P, Doucet-Populaire F, Decousser JW. Epidémie intrafamiliale d'infections sévères à SARM communautaire PVL+ n'appartenant pas au clone européen ST 80. Congrès Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H), Lyon, 2011.

Valour F, Trouillet S, Rasigade JP, Ferry T, Lustig S, Chanard E, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Physiopathologie des infections-ostéoarticulaires sur matériel à *Staphylococcus epidermidis* : rôle de l'internalisation dans les ostéoblastes et de la formation de biofilm. Congrès de la Société Française de Chirurgie Orthopédique, 2011 (Paris). **Prix SOFCOT de la meilleure communication affichée.**

Del Giudice P, Bes M, Hubiche, Roudiere L, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Prédominance des *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton Valentine dans les infections cutanées folliculaires. Journées nationales d'Infectiologie Toulouse 2011.

Hubiche T, Bes M, Roudière L, Langlaude F, Lina G, Etienne J, Del Giudice P. Mild staphylococcal scaled skin syndrome and under diagnosed SSSS clinical form. Journées nationales d'Infectiologie Toulouse 2011.

75. Communications internationales

751. Communications orales internationales

Rasigade JP, Trouillet S, Lhoste Y, Ferry T, Tigaud S, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* differ greatly in their ability to invade bone cells, persist intracellularly and induce cell damage. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011 (Milan, Italy).

FP7 meeting – European project – O. Dauwalder, Badiou C, Dumitrescu O, Vandenesch F & Lina G - Status of Work Package 5: Effect of Hemolysin III, LukX and LukY on polymorphonuclears and monocytes/macrophages - 12 mai 2011 – Milano, Italy.

Kurt K, Henkel M, Rasigade JP, Laurent F, Ritchie S, Goering RV, Zemlickova H, Struelens MJ, Holtfreter S, Witte W, Nübel U. Subpopulations of *Staphylococcus aureus* ST121 are associated with distinct clinical pictures. 63rd Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, 2011 (Essen, Germany).

Valour F, Trouillet S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Tigaud S, Vandenesch F, Etienne J, Ferry T, Laurent F. Physiopathology of *Staphylococcus epidermidis* Orthopedic Device Infections: Role of Bacterial Internalization In Osteoblasts and Biofilm Formation. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2011 (Chicago, US).

Laurent F, Bouaziz A, Rasigade JP, Ferry T, Chanard E, Neyret P, Tigaud S, Lustig S. Contribution of GeneXpert MRSA-SA SSTI® assay to fast diagnosis of MRSA and MSSA positive prosthesis joint infection. European Federation Orthopaedic and Traumatology Congress (EFORT), (Copenhagen, Denmark) 2011.

Lustig S, Allais E, Boisset S, Rasigade JP, Ferry T, Tigaud S, Neyret P, Laurent F. Evaluation of a new molecular approach using DNA microarrays for the diagnosis of bone and joint infection. European Federation Orthopaedic and Traumatology Congress (EFORT), (Copenhagen, Denmark) 2011.

752. Communications affichées internationales

Dumitrescu O, Forey F, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Linezolid decreases exotoxin expression in *Staphylococcus aureus* by early repressing agr, sarA and SAE regulators. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2011, Milano, Italie.

Saleh Mghir A, Dinh A, Dumitrescu O, Lina G, Boutrad Y, Vandenesch F, Etienne J, Cremieux AC. Ceftobiprole efficacy in vitro on Panton-Valentine leukocidin production and in vivo in a rabbit community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2011, Milano, Italie.

Croisier-Bertin D, Biek D, Hayez D, Rousseau S, Labrousse D, Badiou C, Dumitrescu O, Vandenesch F, Lina G, Etienne J, Piroth L, Chavanet P. In vivo efficacy of ceftaroline in a methicillin-resistant and PVL-producing *Staphylococcus aureus* pneumonia rabbit model.

21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2011, Milano, Italie.

Martin E, Tristan A, Bes M, Bellemin K, Vandenesch F, Etienne J, Clariss O, Lina G, Dumitrescu O. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22 outbreak in a French neonatology unit. 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2011, Milano, Italie.

Rasigade JP, Tellini C, Raulin O, Ben Saïd M, Picaud JC, Clariss O, Etienne J, Vandenesch F, Tigaud S, Laurent F. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus capitis* strains causing late-onset sepsis in intensive care neonates. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011 (Milan, Italy).

Laurent F, Tellini C, Marocco A, Rasigade JP, Reverdy ME, Tigaud S, Vandenesch F, Lina G, Freydiere AM. New immunochromatographic assays for detection of methicillin resistance and identification of *Staphylococcus aureus* directly on primary culture or blood culture bottles in a few minutes. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011 (Milan, Italy).

Laurent F, Denis O, Verkaik NJ, S, Willinger B, Monecke S, Perry J, G, Rasigade J-P, Melles DC, Nonhoff C, Freydiere A-M, Vandenesch F. Detection of *S. aureus* methicillin resistance in 5 minutes directly on primary cultures: large prospective multicentric study in 8 European countries. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (ECCMID)(Milano, Italy), 2011.

Rasigade JP, Thomas D, Perpoint T, Peyramond D, Chidiac C, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Ferry T. Anergy of superantigen-reactive T-cells is not always present during the acute phase of menstrual toxic shock syndrome. Congress of the Federation of European Microbiology Societies, 2011 (Geneva, Switzerland).

Song S, Lays C, Geissmann T, Lina G, Romby P, Vandenesch F, Boisset S. Detection of non-coding RNAs in human *Staphylococcus aureus* infection. 4th Congress of European Microbiologists, June 2011, Geneve, Suisse.

Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F. Impaired virulence, invasiveness and intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* *menD*-negative small colony variant in cultured human osteoblasts. Congress of the Federation of European Microbiology Societies, 2011 (Geneva, Switzerland).

Rasigade JP, Trouillet S, Ferry T, Etienne J, Vandenesch F, Laurent F. Bone Cell Damage Following Intracellular Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011 (Chicago, US).

Skov R, Larsen AR, Tristan A, Petersen A, Decousser JW, Vandenesch F, Laurent F. Novel *mecA* variant LGA251: ability to detect isolates using commercial methods. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) (Chicago, USA), 2011.

Laurent F, Rasigade JP, Blanc-Pattin V, Gandois JM, Freydiere AM, Mehdi N, Guinand R, Chanard E, De Ladoucette A, Benzaguen D, Ferry T, Dubouix-Bourandy A. Retrospective validation and prospective evaluation of the rapid diagnosis of bone and joint infection due to methicillin-resistant *S. aureus*, methicillin-susceptible *S. aureus* and methicillin-resistant

coagulase-negative staphylococci using Xpert MRSA/SA SSTI RT-PCR assay. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011 (Chicago, US).

Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Valour F, Lustig S, Tigaud S, Laurent F. Nasal co-colonization with MSSA and MRSCN and its potential impact on molecular methods for MRSA detection. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011 (Chicago, US).

76. Conférences sur invitation

761. Conférences orales sur invitation nationales

Boisset S. Expression of non coding RNA in clinical samples reflects different life style of *S. aureus* in colonization vs infection. 3^{ème} édition de la journée de conférence sur la thématique Des Infections Nosocomiales, Lyon, 8 novembre 2011.

Dauwalder O. Accréditations des laboratoires d'analyses médicales : validation de méthodes en microbiologie. 2011, Les événements de l'année en microbiologie, Paris.

Lina G. Les syndromes toxiques staphylococciques. 3^{ème} Journée d'Infectiologie de la Réunion, Novembre 2011, La Souris Chaude, La Réunion.

Lina G. Point épidémiologique : phénotype de résistance, nouvelles technique de détection. 3^{ème} Journée d'Infectiologie de la Réunion, Novembre 2011, La Souris Chaude, La Réunion.

Lina G. Diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires. 3^{ème} Journée d'Infectiologie de la Réunion, Novembre 2011, La Souris Chaude, La Réunion.

Laurent F. SARM : vous avez aimé *mecA*, vous aimerez *mecB* ! Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011.

Ferry T, Demey G, **Laurent F.** Infections ostéo-articulaires : cas cliniques interactifs. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2011.

Laurent F, Ferry T. Tests rapides pour le diagnostic des infections staphylococciques : le point de vue du microbiologiste et du clinicien. Congrès National des Biologistes des Hôpitaux, Angers, 2011.

Laurent F. Actualités en microbiologie : ICAAC 2011. Rencontre Nationale en Infectiologie et Microbiologie, Paris, 2011.

Laurent F. Pneumopathie nécrosante et *Staphylococcus aureus*. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF), Paris, 2011.

Vandenesch F. De la colonisation à l'infection (2) : IAS à staphylocoques. Séminaire recherche 2011, Centre des Cordeliers, Paris, 24 mai 2011.

Vandenesch F. Pneumonie communautaire sévères à *S.aureus* en France. congrès AER, Palais des Congrès, Lyon, 20 octobre 2011.

Vandenesch F. MRSA from epidemiology to virulence. 3ème édition des Journées Infections Nosocomiales FINOVI Lyon BioPôle, Lyon, 8 Novembre 2011.

762. Conférences orales sur invitation internationales

Lina G. Panton-Valentine Leukocidine in CA-MRSA. PILGRIM and CONCORD joint meeting, Novembre 2011, Bruxelles, Belgique.

Laurent F. Resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*. ESCMID Meeting on Emerging Multidrug Resistance (Paris, France), 2011.

8. Programme d'activité N+1 et N+2

Le CNR poursuivra en 2012 l'ensemble des activités détaillées dans le programme quadriennal. En matière d'outils diagnostic, le CNR a notamment pour objectif de :

- poursuivre l'optimisation du test de détermination des 24 principaux « répertoires V β » du récepteur des lymphocytes T, avec comme objectif particulier d'assouplir les conditions de délai et de transport des échantillons de patients.
- poursuivre le développement du test de détection directe de la PVL à partir d'un prélèvement.
- évaluer les différents tests développés par les industriels en matière de détection de *S. aureus*, de ses facteurs de virulence ou de résistance par toutes méthodes, y compris très innovantes comme la spectrométrie de masse ou l'amplification phagique
- en lien avec le CNR de la résistance, réévaluer l'ensemble des techniques publiées de détection de la résistance aux glycopeptides afin d'établir un protocole standardisé et détaillé pour la réalisation de cette détection.

En matière de caractérisation clinico-biologique le CNR doit :

- poursuivre l'enquête du PHRC pneumonies à *S. aureus* communautaires sévères afin de répondre aux objectifs épidémiologiques, cliniques et génétiques de ce projet (cf supra)
- poursuivre la caractérisation clinico-biologique fine de la forme mineure du SSSS par rapport à la scarlatine staphylococcique, afin de différencier précocement ces deux situations cliniques dont les risques de complications graves sont très différents.

En matière de recherche en lien avec la problématique du CNR, les objectifs sont de :

- déterminer l'histoire évolutive du clone européen ST80 par séquençage de 80 génomes.
- poursuivre l'analyse de l'histoire évolutive des CC398 afin de comprendre les modifications adaptatives qu'a subi cette lignée au cours des transferts entre l'homme et l'animal.

En matière de surveillance à travers les réseaux nationaux et internationaux, le CNR poursuivra ses actions détaillées au chapitre 3. Il initiera cependant des projets propres comme :

- Un projet de cohorte sur *S. capitis* en collaboration avec le CHU de Nantes. Il s'agira d'une étude épidémiologique clinique et microbiologique des bactériémies à *S. capitis* en unités de soins intensifs néonatales en France. L'objectif principal sera d'analyser les facteurs prédictifs de portage digestif et de bactériémies à *S. capitis* résistants à la méticilline ainsi que le devenir des patients infectés

- Sur la période 2012-2016, le CNR envisage de renouveler avec l'ONERBA une étude de prévalence des clones ST80 et ST5 Géraldine du type de celle réalisée en 2008 afin de disposer d'éléments précis de la dynamique de ces clones émergents actuellement dans la population française

- La surveillance et l'étude des infections cutanées seront poursuivies en collaboration avec Dr Del Guidice, service d'Infectiologie-Dermatologie du centre Hospitalier Intercommunal De Fréjus-Saint-Raphaël avec qui le CNR a mis en place une collaboration depuis de longues années. Les travaux conduits seront réalisés dans le cadre d'une étude longitudinale de ces infections et porteront sur : le suivi prospectif de l'évolution des SARM communautaires, l'incidence annuelle des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*, la prévalence des *Staphylococcus aureus* dans les impétigos et étude de la corrélation clinique-toxine dans ces formes cliniques, le suivi prospectif du risque de transmission croisée des infections cutanées à *Staphylococcus aureus*, la caractérisation des toxines impliquées dans les cellulites à *Staphylococcus aureus*, l'étude des souches responsables d'infections cutanées récidivantes.

- Etude sur les furonculoses familiales récidivantes : dans le cadre de notre collaboration avec les pédiatres de l'hôpital femme/mère/enfant de Lyon, nous allons poursuivre le suivi des familles présentant des furonculoses récidivantes et tenter de mieux

comprendre pourquoi certains membres de ces familles ne présentent jamais d'infections alors que d'autres font des infections récidivantes qu'il est très difficile de décontaminer.

- PHRC IVIg initié par notre centre et qui sera déposé en 2012. L'objectif principal est d'évaluer l'efficacité d'un traitement par IVIG (Privigen®) sur la mortalité des patients avec choc toxique (*S. aureus* et *S. pyogenes*).

En matière de surveillance de la résistance, le CNR a pour projet en 2012 et 2013 :

- d'étudier à partir des souches collectées au sein d'EARSS le glissement des CMI aux glycopeptides des souches de SARM et de SASM ainsi que le retentissement concomitant de cette évolution sur les CMI de la daptomycine

- de mettre en place en 2012-2013 une enquête permettant de recueillir les souches présentant une résistance au linézolide. Cette enquête devra s'intéresser à l'ensemble des espèces de staphylocoques et avoir pour objectif de caractériser les souches/clones correspondants et les pressions à l'origine de leur émergence. Cette étude sera conduite en concertation avec le Centre National de Référence de la Résistance aux antibiotiques.

En matière d'accréditation des laboratoires selon la norme 15189, le CNR poursuivra son investissement dans la démarche qualité et déposera à l'accréditation partielle la détection des gènes codant la PVL en urgence par méthode moléculaire sur Light-Cycler.

Annexes

-Annexe 1.

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

(A faire en double exemplaire)

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

au Centre National de Référence des Staphylocoques désigné CNRS.

Le CNRS demande que le Demandeur accepte que :

- Le matériel fournis par le CNRS reste la propriété du CNRS et qu'il est mis à la disposition de Demandeur pour ses activités.
- Le Matériel est utilisable pour l'enseignement et la recherche à but non lucrative.
- Le Matériel ne pourra pas être redistribué par le Demandeur à un tiers autre que les collaborateurs impliqués dans la réalisation du programme de travail et travaillant directement sous l'autorité du responsable du laboratoire destinataire. Toute demande sera automatiquement signalée au CNRS et le transfert ne pourra se faire qu'après signature d'une Lettre d'agrément pour transfert de matériel avec le nouveau Demandeur et le CNRS.
- Les deux parties s'engagent à garder confidentielles toutes les informations transmises oralement, par écrit ou de toute autre manière, dans le cadre du présent Accord et se rapportant au MATERIEL. Ces INFORMATIONS ne pourront pas être communiquées à des tiers sans autorisation préalable et écrite.
- Le Demandeur informera le CNRS, de manière régulière et confidentielle, des résultats de ses travaux obtenus avec ou à partir du MATERIEL
- Conformément aux usages scientifiques en vigueur, toutes les publications ou communications ayant trait à l'utilisation du MATERIEL font référence à l'origine CNRS. De même, la contribution des agents CNRS ayant rendu le MATERIEL accessible sera mentionnée expressément dans toutes les publications ou communications, soit par remerciements, soit en qualité de co-auteurs.
- Le CNRS est reconnu comme le propriétaire exclusif du MATERIEL et des droits de propriété intellectuelle afférents.
- Il est expressément convenu entre les Parties que le droit d'utilisation du MATERIEL concédé au titre du présent Accord ne peut, en aucun cas, être interprété comme conférant, de manière expresse ou

implicite, à un quelconque droit ou titre de propriété, ou option ou licence sur le MATERIEL fourni par le CNRS.

- Au cas où les résultats obtenus seraient susceptibles de conduire au dépôt d'une demande de titre de propriété industrielle, les Parties décideront d'un commun accord de la stratégie à mettre en œuvre en matière de protection et d'exploitation de ces résultats et, le cas échéant, des personnes habilitées à procéder à un tel dépôt et/ou à une telle exploitation.
- Le Demandeur reconnaît que Matériel est de nature expérimentale et que le CNRS ne donne aucune garantie, quant à son état, son activité, son utilité, son efficacité, sa pureté, son innocuité, sa non-toxicité, sa sécurité, quant à son utilisation, sa valeur commerciale ou sa conformité à un quelconque but.
- Le demandeur est seul responsable de tout risque ou dommage pouvant découler de l'exécution du présent Accord, notamment en cas de blessure, mort, dommage matériel ou tout autre sinistre ou préjudice pouvant résulter de l'usage, des essais ou de la manipulation du MATERIEL.
- Le Demandeur s'engage à utiliser le MATERIEL selon les lois et réglementations en cours.
- Le MATERIEL est accessible gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition)

Le Demandeur et le CNRS, par le biais de personnes autorisées, doivent signer chacune les deux copies, une copie signée étant gardée par le Demandeur et l'autre par le CNRS.

Le Centre National de Référence des Staphylocoques

Nom de la personne autorisée :

En qualité de :

Organisation : Centre National de Référence des Staphylocoques,

Adresse : Centre de Biologie et de Pathologie Est, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex

Signature

Le Demandeur :

Nom de la personne :

Organisation :

Adresse :

Signature

Date

-Annexe 2 -PHRC leucocidine de Panton Valentine : facteur indépendant de gravité des pneumonies à *Staphylococcus aureus*-

LEUCOCIDINE DE PANTON VALENTINE : FACTEUR INDEPENDANT DE GRAVITE DES PNEUMONIES A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>

Investigateur Coordinateur

Pr. F. Vandenesch francois.vandenesch@univ-lyon1.fr

Centre National de Références des Staphylocoques

Centre de Biologie et Pathologie Est

59 bd Pinel

69677 Bron cedex

tel: (33) (0)4 72 35 72 52

fax: (33) (0)4 72 35 73 35

Collaborateurs référents

Réanimation : Pr. L. Argaud laurent.argaud@chu-lyon.fr

Pédiatrie : Dr. Y. Gillet yves.gillet@chu-lyon.fr

Epidémiologie : Dr. M. Saadatian-Elahi Mitra.saadatian-elahi@recherche.univ-lyon1.fr

Responsable Bio-thèque

Dr. M.T. Zabot marie-therese.zabot@chu-lyon.fr

Responsable étude génétique

Dr. C. Picard capucine.picard@inserm.fr

SYNOPSIS

Titre de l'étude	Leucocidine de Panton Valentine : Facteur indépendant de gravité des pneumonies à <i>Staphylococcus aureus</i> .
Promoteur	Hospices Civils de Lyon, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation. 3, quai des Célestins. BP2251, 69229 LYON Cedex 02
Centre coordinateur	Centre National de Références des Staphylocoques Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 bd Pinel 69677 Bron cedex

Soutien financier	PHRC interrégional 2010
Etablissements participants	Plusieurs établissements de santé à travers la France (voir pages 6 et 7).
Période d'étude	Octobre 2010-Décembre 2013
Design de l'étude	Projet d'étude composé de deux parties - Etude épidémiologique de type observationnelle parmi les personnes présentant une pneumonie communautaire à <i>S. aureus</i> - Etude immunogénétique parmi les patients présentant une pneumonie à <i>S. aureus</i> producteur de PVL et les membres de leur famille
Objectifs	- Confirmer le rôle de la PVL comme facteur de gravité indépendant des pneumonies à <i>S. aureus</i> . - Rechercher une éventuelle prédisposition génétique rendant certains patients susceptibles aux pneumonies nécrosantes à <i>S. aureus</i> producteur de PVL.
Taille de l'échantillon Etude épidémiologique	- 97 patients avec une pneumonie à <i>S. aureus</i> producteur de PVL (PVL+) et 97 patients PVL-
Etude immunogénétique	- Tous les patients PVL+ et 130 membres de leur famille
Critères d'inclusion Etude épidémiologique	- Consentement éclairé - Sujets affiliés (ou bénéficiaire) à un régime de sécurité sociale. - Présence de signes cliniques, biologiques et radiologiques de pneumopathie à <i>S. aureus</i> dont l'état clinique justifie une hospitalisation dans une unité de réanimation ou de surveillance continue
Etude immunogénétique	- Présence de <i>S. aureus</i> producteur de PVL
Critères de non inclusion	- Proposants infectés par le VIH - Proposants hospitalisés depuis plus de 48 heures au moment du diagnostic de pneumopathies, - Proposants hospitalisés au cours des trois mois précédents excepté en hospitalisation du jour
Analyse des données	- Statistiques descriptives - Analyses de survie, régression logistique - Analyse de liaison génétique

RESUME

Staphylococcus aureus est un agent pathogène colonisant 20 à 30% de la population générale et entraînant un large spectre de maladies. Environ 3% des souches de *S. aureus* expriment un facteur de virulence appelé la Leucocidine de Pantone Valentine (PVL). Les pneumonies nécrosantes à *S. aureus* producteur de PVL sont des pneumonies sévères mise en évidence pour la première fois en 2002 par notre équipe du Centre National de Référence des Staphylocoques à Lyon. La comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques de 16 cas de pneumonie à *S. aureus* PVL+ et de 36 cas PVL- a permis de démontrer que cette

infection sévère survenait préférentiellement chez des enfants ou des adultes jeunes (âge médian 14.8 ans) avec d'emblée un tableau clinique bruyant nécessitant souvent une hospitalisation en réanimation. Les caractéristiques cliniques associées étaient l'hyperthermie supérieure à 39°C, la tachycardie supérieure à 140/min, les hémoptysies, les épanchements pleuraux et la leucopénie. L'évolution clinique rapidement défavorable dans plus de la moitié des cas conduisait vers un décès rapide en moyenne moins de 5 jours après le début de l'hospitalisation. Le taux de survie des patients PVL+ était de 25% contre 53% pour les patients PVL-. Néanmoins, la différence en terme de survie n'était statistiquement significative que pour le sous-groupe des patients ne présentant pas de co-morbidité. Dans une étude plus récente, basée sur l'analyse d'une cohorte de 50 patients, nous avons montré que les facteurs de mauvais pronostic de la pneumonie nécrosante à *S. aureus* PVL+ étaient essentiellement la leucopénie et dans une moindre mesure la présence d'hémoptysies. Bien que d'autres études aient montré des résultats similaires et que notre groupe ait mis en évidence le rôle de la PVL dans un modèle murin de pneumonie nécrosante, le rôle de la PVL en tant que facteur de gravité indépendant dans les pneumonies à *S. aureus* reste un sujet de controverse.

En se basant sur une prévalence de portage nasal de 25%, le nombre de souches de *S. aureus* PVL+ circulantes en France pourrait être d'environ 0.6 Millions. Cependant sur la base des déclarations spontanées au CNR des staphylocoques, moins de 30 cas de pneumonie à *S. aureus* PVL+ sont notifiés annuellement en France. Ceci nous permet de postuler que les patients présentant ces infections extrêmement sévères pourraient avoir une susceptibilité particulière pour cette bactérie. Par ailleurs, la prévalence de la résistance à la méticilline des souches responsables de pneumonies nécrosantes, qui oriente la stratégie du traitement probabiliste, reste imprécise et a doublé entre l'étude de 2002(6.2%) et celle de 2007 (12%). Dès lors, plusieurs questions se posent :

- La PVL est-elle un facteur indépendant de mauvais pronostic des pneumopathies communautaires graves à *S. aureus* ?
- Quels sont les facteurs (cliniques, biologiques, thérapeutiques) de pronostic favorable associés à la maladie?
- Quel est le niveau de sensibilité aux antibiotiques des souches de pneumonie nécrosante ?

- Existe-t-il une susceptibilité génétique de l'hôte à l'origine de la rareté et de la sévérité de cette maladie ?

Afin de répondre à ces questions, ce projet de recherche comportera une étude prospective de cohorte et une étude immunogénétique. Tous les hôpitaux français seront sollicités pour rapporter les cas définis comme une pneumonie communautaire sévère (nécessitant une hospitalisation) à *S. aureus* producteur ou non de PVL.

Sur la base d'une fréquence attendue de PVL de 10%, le calcul du nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une surmortalité d'un facteur 2 (risque relatif) avec une puissance de 80% et un risque α de 5% donne un nombre minimum de sujets à inclure de 97 patients PVL+ et 97 patients PVL-. L'étude sera donc réalisée sur une période de trois ans afin d'avoir le nombre de sujet requis permettant des analyses statistiques appropriées. Les caractéristiques de la population étudiée seront analysées par des tests de statistiques descriptives tels que pourcentages, test de Chi-2, test *t* de Student, et l'analyse de la variance. Les déterminants associés au pronostic seront analysés par des modèles de survie univariés et multivariés (Cox). Si ces modèles ne peuvent être appliqués pour cause de durée d'observation, une approche par régression logistique pourrait être une alternative.

La partie immunogénétique comprendra tous les patients présentant une pneumonie communautaire sévère à *S. aureus* producteur de PVL et 130 membres de leurs familles et consistera à une prise de sang et un entretien médical. L'arbre généalogique de la famille sera réalisé dans le cadre de cette étude. Des analyses spécifiques de génétique épidémiologique (analyse de liaison génétique) seront menées si l'échantillon recueilli le permet.