Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de Staphylococcus aureus résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1)

Géraldine Durand

▶ **To cite this version:**

Géraldine Durand. Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de Staphylococcus aureus résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10313 . tel-00878162

HAL Id: tel-00878162

https://theses.hal.science/tel-00878162

Submitted on 29 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 313-2009 Année 2009

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE E2M2

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17 Décembre 2009

par

Mademoiselle DURAND Géraldine

TITRE :

Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1)

Directeur de thèse : Madame Michèle BES

JURY : Professeur Jérôme ETIENNE Président
Professeur FrançoisVANDENESCH
Professeur Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE
Docteur Jérôme ROBERT
Madame Michèle BES

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 4

INDEX DES FIGURES 7

INDEX DES TABLEAUX 8

LISTE DES ANNEXES 9

1ère PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 10

Introduction 11

Chapitre I – *S. aureus* : niche écologique et transmission 12

1. Généralités : *S. aureus*, un pathogène ancien 12
2. Niche écologique 12
3. Du portage à l'infection 14

Chapitre II - *S. aureus*, un pathogène bien armé 15

1. Plasticité génomique de *S. aureus* 15
2. Facteurs de virulence de *S. aureus* 16
   - 2.1. Paroi cellulaire 16
   - 2.2. Capsule 17
   - 2.3. Facteurs d'adhésion de *S. aureus* 18
     - *2.3.1. Les facteurs d'adhésion à motif LPXTG 18*
     - *2.3.2. Les SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules) 20*
   - 2.4. La protéine A : un facteur de virulence pléiotropique 21
   - 2.5. Lyse cellulaire et envahissement tissulaire 22
     - *2.5.1. Action des toxines à tropisme membranaire 22*
     - *2.5.2. Action des exfoliatines 24*
     - *2.5.3. Action des autres enzymes 24*
   - 2.6. Facteurs de virulence impliqués dans la diffusion hématogène 25
   - 2.7. Echappement au système immunitaire inné 25
   - 2.8. Les exotoxines superantigèniques 27
     - *2.8.1. Nomenclature et structure 27*
     - *2.8.2. Localisation génomique des superantigènes 29*
     - *2.8.3. Activité des superantigènes 31*
     - *2.8.4. Répertoire VBéta 34*
   - 2.9. La TSST-1 35
     - *2.9.1. Rôle dans les pathologies auto-immunes 35*
     - *2.9.2. Pénétration de la barrière muqueuse 36*
3. Régulation des facteurs de virulence 37
   - 3.1. Expression séquentielle des facteurs de virulence 37
   - 3.2. Régulation par le système *agr* 38
   - 3.3. Sar A et homologues 40

Chapitre III - Infections à *S. aureus* 41

1. Infections suppuratives à *S. aureus* 41
   - 1.1. Infections superficielles cutanéo-muqueuses 41
   - 1.2. Infections profondes 42
     - *1.2.1. Infections des tissus mous 42*
     - *1.2.2. Autres infections profondes 43*
2. Infections toxiniques 44

2.1. Les syndromes d'exfoliations ... 44
2.1.1. Impétigo bulleux ... 44
2.1.2. Syndrome d'exfoliation généralisée ... 45
2.2. Pathologies liées aux exotoxines superantigéniques ... 46
2.2.1. Les toxi-infections alimentaires à Staphylocoques ... 46
2.2.2. Le choc toxique staphylococcique ... 47
2.2.3. Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED) ... 49
2.2.4. La maladie de Kawasaki ... 50
2.3. Pneumonie nécrosante ... 50

Chapitre IV- L'émergence des SARM ... 53

1. Le gène *mec*A support de la résistance à la méticilline ... 53
2. La cassette de résistance à la méticilline SCC*mec* ... 54
2.1. Le complexe *mec* ... 54
2.1.1. Structure ... 54
2.1.2. Rôle des gènes régulateurs mecI et mecRI ... 56
2.2. Le complexe des gènes des recombinases ... 56
2.3. Les différents types SCC*mec* ... 57
2.4. Les différents sous-types SCC*mec* ... 59
3. Autres éléments SCC ... 59
3.1. SCC non – *mec* ... 59
3.1.1. Définition ... 59
3.1.2. Exemples ... 60
3.2. Pseudo –SCC éléments ... 60
3.3. SCC composite ... 60
4. Hypothèses sur l'acquisition de la cassette SCC*mec* ... 61

Chapitre V - Les outils de description des SARM ... 63

1. Outils de typage phénotypique ... 63
2. Outils de typage moléculaire ... 64
2.1. Détermination du fond génétique ... 64
2.1.1. Electrophorèse en champs pulsés ... 65
2.1.2. Le typage agr ... 66
2.1.3. Le séquençage multilocus (Multi Locus Sequence Typing, MLST) ... 66
2.1.4. Le séquençage de la région polymorphique du gène de la protéine A (spa typing) ... 69
2.2. Détermination des gènes accessoires par PCR ... 70
2.2.1. Typage de la cassette staphylococcique SCCmec ... 70
2.2.2. Toxinotypie ... 71

Chapitre VI - Evolution moléculaire des SARM ... 72

1. Un nombre limité de clones pandémiques de SARM nosocomiaux ... 72
1.1. Historique ... 72
1.1.1. Données de l'électrophorèse en champ pulsé ... 72
1.1.2. Données du MLST ... 72
1.2. Identification de cinq lignées phylogéniques de SARM ... 73
2. Emergence des SARM à plusieurs reprises dans une lignée phylogénique donnée ... 75
3. Facteurs limitant le phénomène d'acquisition de la cassette SCC*mec* ... 76
4. Dynamique évolutive et dissémination des clones de SARM hospitaliers ... 77
5. Emergence des SARM résistants à la vancomycine ... 79
6. Les SARM communautaires ... 80
6.1. Emergence ... 80
6.2. Epidémiologie ... 81

2ème PARTIE : ARTICLES DE REVUE ... 83

SARM: données épidémiologiques récentes et évolution de la résistance 84

Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* 90

3ème PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL 96

Introduction au travail personnel 97

I- Elaboration d'outils pour la caractérisation des SARM 98

1. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests 98
2. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis 106

II- Description d'un nouveau clone de SARM portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) 119

Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital-and community-acquired infections in France 119

III- Epidémiologie d'un clone de SARM possédant le gène de la TSST-1 129

1. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007 129
2. Toxin profiling of *S. aureus* strains involved in varicella superinfection 137

IV- Pathogénie d'un clone de SARM possédant le gène de la TSST-1 155

The community- and- hospital-acquired ST5/TSST-1 MRSA clone is a pleiotropic pathogen with a peculiar truncated SCC*mec* I element. 155

4ème PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES 183

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 190

ANNEXES 209

LISTE DES ABREVIATIONS

AFLP :	*Amplified fragment length polymorphism*
BURP :	*Based upon repeat pattern*
BURST :	*Based upon related sequence types*
CC :	Complexe clonal
CHEF :	Contour clamped homogeneous electric field
CHIPS :	*Chemotaxis inhibing protein*
CMH-II :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CNR :	Centre National de Référence
CP :	*Capsular polysaccharides*
CTS :	Choc toxique staphylococcique
ECP :	Electrophorèse en champ pulsé
EMRSA :	*Epidemic methicillin resistant Staphylococcus aureus*
HLA :	*Human leucocyte antigen*
IFN-γ :	Interféron gamma
IL :	Interleukine
MIP:	*Macrophages inflammatory protein*
MLST :	*Multilocus sequence typing*
MSCRAMMs :	*Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*
MRSA :	*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*
MSSA :	*Methicillin sensitive Staphylococcus aureus*
NTED :	*Neonatal toxic shock like-exanthematous disease*
PBMCs :	*Peripherical blood mononuclear cells*
PCR :	*Polymerase chain reaction*
PVL :	*Panton-Valentine leukocidin*
PFGE :	*Pulsed field gel electrophoresis*
S. aureus :	*Staphylococcus aureus*
SaPI :	*Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands*
SARM :	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SARM-C :	*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline communautaire
SASM :	*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SCC(*mec)* :	*Staphylococcal cassette chromosome (mec)*
SCIN :	*Staphylococcal complement inhibitor*

SERAMs :	*Secretable expanded repertoire adhesive molecules*
SSL :	*Staphylococcal superantigen like*
SSSS :	*Staphylococcal scalded skin syndrome*
ST :	*Sequence type*
ST-SCC*mec* :	*Sequence type SCCmec*
TCR :	*T cell receptor*
TNF-α :	*Tumor necrosis factor alpha*
Th-1:	*T helper*-1
TSS :	*Toxic shock syndrome*
TSST-1 :	*Toxic shock syndrome toxin-1*
Vβ :	Portion variable beta du TCR
VNTR :	Variable number of tandem repeats

Dénomination des gènes de *S. aureus* :

agr :	*accessory gene regulator*
ccr :	gène des recombinases
*gyr*A :	gène de la gyrase
*mec*A :	gène de la résistance à la méticilline
spa :	gène de la protéine A

Dénomination des gènes de toxines staphylococciques :

egc :	*enterotoxin gene cluster*
eta, etb, etd :	exfoliatines A, B, D
hla :	hémolysine alpha
hlb :	hémolysine beta
hlg :	hémolysine gamma
hlgv :	hémolysine gamma variant
lukSPV-lukFPV :	leucocidine de Panton Valentine
lukE-lukD :	leucocidine lukE-lukD
lukM :	leucocidine M
sea-i, *sep*, *ser, ses*, *set* :	entérotoxines A-I, P, R, S, et T
se/j-o, *se/q*, *se/u*, *se/u2*, *se/v* :	entérotoxines-like J-O, Q, U, U2, et V
tst :	toxine du choc toxique staphylococcique

Dénomination des gènes des adhésines de *S. aureus* :

bbp :	*bone sialoprotein binding protein*
clfA et clfB :	*clumping factors* A et B
cna :	*collagen binding protein*
eap :	*extracellular adherence protein*
*ebp*S :	e*lastin binding protein*
efb :	*extracellular fibrinogen binding protein*
eno :	*laminin binding protein*
*fnb*A et *fnb*B :	*fibronectin binding proteins* A et B
fib :	*fibrinogen binding protein*
map :	MHC class II analogous protein
pls :	*plasmin-sensitive protein*

Dénomination des gènes de ménage séquencés en MLST :

arcC :	carbamate kinase
aroE :	shikimate déshydrogénase
glpF :	glycérol kinase
gmk :	guanylate kinase
pta :	phosphate acétyltransférase
tpi :	triosephosphate isomérase
yqiL :	acétyl coenzyme A acétyltransférase

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques Page 13
Figure 2. Génome de *S. aureus* Page 16
Figure 3. Souches capsulées de *S. aureus* (types 5 et 8) Page 17
Figure 4. Structure des adhésines à motif LPXTG Page 20
Figure 5. La protéine A, un facteur de virulence pléiotropique Page 21
Figure 6. Mécanisme d'assemblage des monomères de lukF-PV et de lukS-PV Page 23
Figure 7. Action des exfoliatines sur l'épiderme humain Page 24
Figure 8. Mécanismes d'échappement de *S. aureus* au système immunitaire inné Page 27
Figure 9. Arbre phylogénique des entérotoxines Page 28
Figure10. Aspect tridimensionnel de la TSST-1 Page 29
Figure 11. Les ilôts de pathogénicité de *S. aureus* (SaPI1-3) Page 31
Figure 12. Activation lymphocytaire polyclonale par les superantigènes Page 32
Figure 13. Altération de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte par *S. aureus* Page 33
Figure 14. Action proinflammatoire de la TSST-1 Page 37
Figure 15. Régulation de l'expression des facteurs de virulence Page 38
Figure 16. Activation du système *agr* Page 39
Figure 17. Infections cutanées à *S. aureus* Page 42
Figure 18. Fasciite nécrosante à *S. aureus* Page 43
Figure 19. Impétigo bulleux Page 45
Figure 20. Syndrome d'exfoliation généralisée Page 46
Figure 21. Expression du marqueur CD45RO des cellules $CD4^+$ $V\beta2^+$ et $CD8^+$ $V\beta2^+$ chez des patients atteints de NTED Page 50
Figure 22. Imagerie d'un patient atteint de pneumonie nécrosante Page 51
Figure 23. Organisation génétique des différents complexes *mec* chez les Staphylocoques Page 55
Figure 24. Organisation structurale des huit types SCC*mec* Page 58
Figure 25. Pouvoir discriminant des outils moléculaires de description des SARM Page 64
Figure 26. Profils en ECP des différents types USA Page 66
Figure 27. Disposition des 7 gènes de ménage séquencés en MLST sur le chromosome de *S. aureus* Page 67
Figure 28. Représentation en ciel étoilé de la population de *S. aureus* par un diagramme eBURST Page 68
Figure 29. Séquençage du gène de la protéine A Page 69
Figure 30. Origine et évolution des clones de SARM au sein du complexe clonal CC8 Page 74
Figure 31. Origine et évolution des SARM au sein du complexe clonal CC5 Page 76

Figure 32. Prévalence par pays des SARM hospitaliers Page 77
Figure 33. Succession des clones hospitaliers en Italie Page 78
Figure 34. Emergence des SARM communautaires Page 81

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Les principaux facteurs d'adhésion de *S. aureus* à motif LPXTG Page 19
Tableau 2. Signature Vβ et localisation génomique des exotoxines superantigéniques de *S. aureus*. Page 35
Tableau 3. Critères diagnostiques du choc toxique staphylococcique Page 48
Tableau 4. Les huit types SCC*mec* Page 57
Tableau 5. Les clones pandémiques de SARM nosocomiaux Page 75

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Sites polymorphiques des gènes *cch*, *ccr*A, *ccr*B, *ccu* Page 210

Annexe 2. Profil en électrophorèse en champ pulsé d'isolats de *S. aureus* Page 211

Annexe 3. Prévalence des souches de *S. aureus* toxinogènes et résistantes à la méticilline impliquées dans des cas de surinfections de varicelle Page 213

Annexe 4. Typage de la cassette SCC*mec* par la PCR multiplex d'Oliveira et al. Page 214

1ERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Alors qu'il s'agit d'un commensal parmi les plus fréquents de notre flore normale, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie très souvent rencontrée en pathologie humaine à l'origine d'une grande diversité d'infections dont certaines peuvent engager le pronostic vital. L'expression clinique de ces infections dépend de nombreux facteurs de virulence que *S. aureus* est capable de produire. *S. aureus* est à l'origine d'infections suppuratives, localisées ou systémiques, mais aussi de syndromes spécifiques liés à l'action de toxines. Les infections staphylococciques relèvent d'un véritable problème de santé publique tant par la virulence de la bactérie que par l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques.

La résistance à la méticilline est apparue dans les années 1960 dans des souches de *S. aureus* d'origine hospitalière. Ces souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) ont diffusé dans les hôpitaux du monde entier et de grands clones pandémiques nosocomiaux ont été caractérisés par différents outils moléculaires[1].

Au fil des années, les SARM n'ont cessé d'acquérir des résistances à d'autres antibiotiques limitant bien souvent la thérapeutique à la vancomycine dans les années 1980. En 1996, la situation est devenue inquiétante depuis que des souches résistantes à la vancomycine, alors antibiotique de dernier ressort pour les infections à SARM, ont été isolées au Japon [2].

Depuis une dizaine d'années, l'épidémiologie de la résistance à la méticilline est en pleine évolution, longtemps confinée au milieu hospitalier (où la prévalence des SARM en France atteint 30%), elle est apparue en milieu communautaire chez des souches possédant la leucocidine de Panton et Valentine pouvant être responsables d'infections sévères notamment de pneumonies nécrosantes [3].

Au cours de cette revue bibliographique, nous allons nous intéresser : (i) aux facteurs de virulence et à la pathogénie de *S. aureus*, (ii) au phénomène d'émergence des SARM, aux outils, notamment moléculaires dont nous disposons pour le typage de ces souches et enfin à l'épidémiologie et l'évolution moléculaire des SARM.

Chapitre I – *S. aureus* : niche écologique et transmission

1. Généralités : *S. aureus*, un pathogène ancien

Connus depuis l'aube de la bactériologie, les staphylocoques avaient fait l'objet de premières communications par Pasteur à l'Académie des sciences en 1876 et 1880 où il révéla l'existence du « vibrion pyogénique » qu'il avait isolé à la fois dans le pus d'anthrax et chez un patient atteint d'ostéomyélite. C'est un chirurgien anglais nommé Ogston qui donna le nom de staphylocoque à ce micro-organisme par analogie à la forme d'une grappe de raisin observée au microscope après coloration de Gram [4].

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, groupés en amas, catalase positive. Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes, à la classe des *bacilli* et la famille des *Staphylococcaccae.* Il comprend actuellement 41 espèces et 21 sous espèces, isolées chez l'homme et l'animal (Euzéby, http://bacterio.cict.fr). Par la production d'une coagulase, *S. aureus* se distingue des autres staphylocoques dits alors à coagulase négative (bien que certains de ces staphylocoques puissent également produire une coagulase). D'autres propriétés caractérisent *S. aureus*, comme la production d'un pigment jaune, la production d'une endonucléase thermostable et la fermentation du mannitol (cependant des souches de SARM mannitol-négatives ont été decrites [5]).

2. Niche écologique

S. aureus est un germe ubiquitaire présent dans l'environnement et chez les animaux mais son habitat préférentiel est l'homme. Dans les heures qui suivent la naissance, *S. aureus* colonise la peau, l'ombilic, le tube digestif et le périnée du nouveau-né. Cette colonisation fluctue jusqu'à l'âge de 6 ans où l'on considère qu'elle est représentative du portage à l'âge adulte [6]. Chez l'adulte, *S. aureus* est présent dans les zones cutanées humides et colonise surtout les muqueuses des

fosses nasales et de l'oropharynx mais aussi le périnée. La peau, particulièrement celle des mains, est régulièrement colonisée [6].

La fréquence du portage nasal varie de 20 à 30% dans la population générale. On distingue trois cas : (i) les porteurs permanents qui concernent 20% de la population, (ii) les porteurs intermittents ou occasionnels qui concernent 60% de la population, (iii) et enfin ceux qui ne sont jamais porteurs, soit 20% de la population [7]. La raison du portage est mal élucidée. Des facteurs d'adhésion préférentielle aux cellules épithéliales des porteurs ont été évoqués ainsi que des prédispositions génétiques (système HLA) [6].

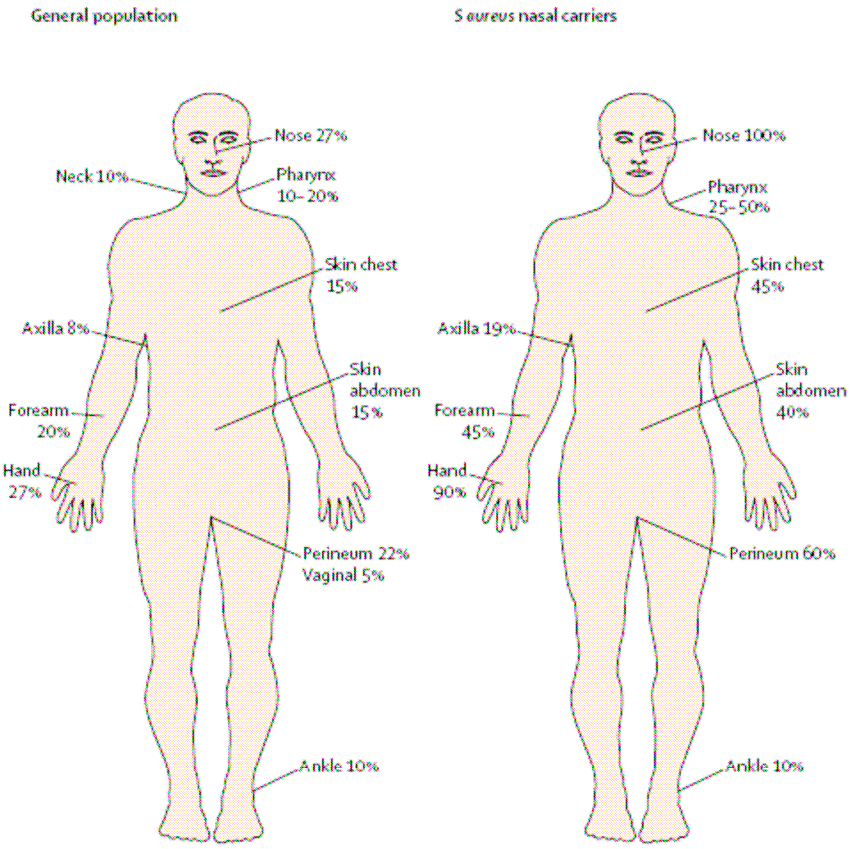


Figure 1. Prévalence du portage à *S. aureus* selon les sites anatomiques d'après Wertheim et al [6]. A gauche, prévalence du portage à *S. aureus* au sein la population générale ; à droite, prévalence du portage à *S. aureus* chez les porteurs au niveau nasal.

3. Du portage à l'infection

Le portage nasal est un facteur de risque pour la survenue d'une infection à *S. aureus* [8]. La plupart des infections à *S. aureus* ont un point de départ cutané. Le grattage du nez et de la peau représente le mécanisme habituel de passage du portage nasal asymptomatique à l'infection cutanée et éventuelle dissémination hématogène. La peau et les muqueuses représentent la barrière de protection essentielle contre les infections staphylococciques. L'infection est ainsi favorisée par toute altération de cette barrière: plaie cutanée, lésions des muqueuses respiratoires provoquées par une infection virale (virus grippal, par exemple). Les corps étrangers comme les dispositifs intravasculaires (cathéters, valve) ou les prothèses orthopédiques constituent également des facteurs favorisants. Le portage est un facteur de risque bien identifié d'infections chez les patients de chirurgie, de soins intensifs, les patients infectés par le VIH ou encore chez les patients hémodialysés [7]. Kluytmans et al ont observé une diminution significative du taux d'infections de sites opératoires après décontamination des patients avec la mupirocine [7]. Cette décontamination permettrait de faire disparaître le portage au niveau des autres sites. Toutefois l'usage de la mupirocine reste contreversée [9, 10]. Par ailleurs des souches résistantes à la mupirocine sont apparues [11].

En milieu hospitalier, la transmission manuportée par le personnel soignant constitue la principale cause de survenue d'infections nosocomiales à *S. aureus*. Les membres du personnel soignant disséminent des souches entre les malades ou bien transmettent leur propre souche. Les clones de SARM hospitaliers diffusent ainsi dans les hôpitaux. Plus rarement, les staphylocoques sont transmis par voie aéroportée ou par du matériel médical souillé (brassards des appareils à tension par exemple [12]. Le problème de la contamination du personnel hospitalier par du matériel non médical souillé comme les claviers d'ordinateur a été également soulevé [13].

En milieu communautaire, la promiscuité et les défauts d'hygiène favorisent le portage et la transmission des SARM qui s'effectue principalement par des contacts cutanés [14].

Chapitre II - *S. aureus*, un pathogène bien armé

1. Plasticité génomique de *S. aureus*

S. aureus est à la fois une bactérie commensale et pathogène de l'homme. Cette apparente contradiction a rendu cette bactérie particulièrement intéressante à explorer au niveau moléculaire. Les travaux de séquençage du génome de *S. aureus* initiés par les équipes de Baba et d'Hiramatsu et que d'autres équipes ont poursuivis, ont permis de percer le secret de ce pouvoir d'adaptation [15]. Le génome de *S. aureus* est formé de deux domaines fonctionnels distincts. La majeure partie du chromosome (75%) appelé « *core* » contient les gènes qui assurent le métabolisme de la bactérie. La deuxième partie du génome (environ 25%) est constituée d'éléments génétiques accessoires et mobiles comme des plasmides, transposons, prophages ou des îlots de pathogénicité portant la plupart des gènes associés à des facteurs de virulence et à la résistance aux antibiotiques (Figure 2) [16-18]. Le profil pathogénique mais aussi le phénotype de résistance semblent donc bien déterminés par les combinaisons de ces éléments génétiques accessoires portés ou non par le chromosome. En dehors des mutations spontanées, *S. aureus* diversifie son génome grâce à sa dextérité à échanger du matériel génétique avec d'autres espèces bactériennes. Les bactériophages sont des vecteurs importants pour le transfert horizontal de gènes de l'environnement naturel [19, 20].

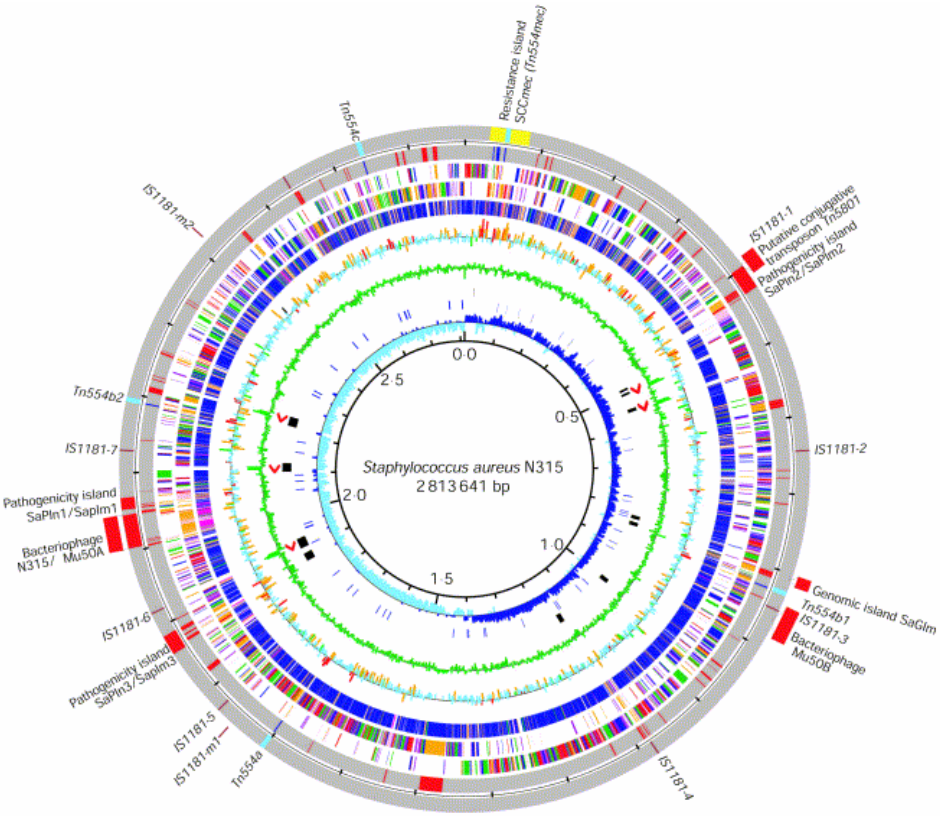


Figure 2. Génome de *S. aureus* - souche N315 résistante à la méticilline et souche Mu50 résistante à la vancomycine d'après Hiramatsu et al [21]. Les éléments spécifiques à Mu50 (96% d'homologie avec la N315) sont représentés au delà du cercle extérieur. Les éléments génétiques mobiles sont représentés au niveau du cercle extérieur: la cassette SCC*mec*, en jaune; le transposon Tn*554*, en bleu clair; les phages et ilôts de pathogénicité, en rouge; les séquences d'insertion IS*181*, en marron.

2. Facteurs de virulence de *S. aureus*

2.1. Paroi cellulaire

La paroi de *S. aureus* est composée d'acides lipoteichoïques et de peptidoglycane. Le peptidoglycane possède une activité endotoxine-like proche du lipopolysaccharide et provoque la libération des cytokines par les macrophages et l'activation du système complément. D'autre part, le peptidoglycane provoque l'agrégation des plaquettes, pouvant ainsi, déclencher une coagulation intra vasculaire disséminée [12, 22]. Les acides lipoteichoïques sont impliqués dans l'adhésion bactérienne par des forces physico-chimiques grâce à leur domaine hydrophobe [23].

2.2. Capsule

Les polysaccharides capsulaires sont retrouvés dans 90% des isolats cliniques de *S. aureus*. Onze sérotypes de polysaccharides capsulaires ont été décrits, ceux de type 5 et 8 étant, de loin, les plus fréquents parmi les isolats humains (80% des cas) [24-26] (Figure 3). Les polysaccharides capsulaires (dit encore capsule) confèrent à la bactérie une résistance accrue à l'opsonophagocytose. Ces exopolysaccharides, synthétisés par *S. aureus* ou encore glycocalix sont à l'origine de la constitution de biofilm, élément majeur de virulence, permettant une adhésion accrue aux surfaces (notamment polymériques) des dispositifs médicaux implantables. La capsule a également été impliquée dans l'adhésion aux cellules endothéliales [27]. La capsule, à la fois chargée négativement et positivement, est un zwiterrion. Cette propriété de la capsule pourrait favoriser la formation d'abcès [28]. Son rôle dans la virulence reste cependant controversée : la capsule confère à la bactérie une résistance accrue à l'opsonophagocytose mais constitue également une cible pour des anticorps protecteurs.

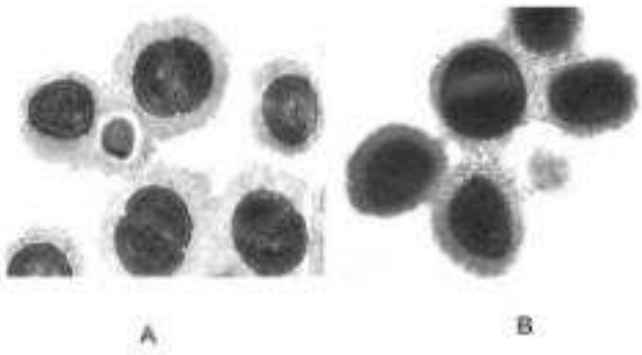


Figure 3. Souches capsulées de *S. aureus* types 5 et 8 vues en microscopie électronique. A : souche de *S. aureus* Reynolds CP5 (capsular polysacharides 5) après stabilisation par un anticorps anti-CP5. B : souche de *S. aureus* Reynolds mutée CP8 (capsular polysacharides 8) après stabilisation un anticorps anti-CP8. D'après Watts et al [24].

2.3. Facteurs d'adhésion de *S. aureus*

S. aureus adhère aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire lors de la colonisation de son hôte. L'adhésion bactérienne est également une étape indispensable pour l'infection en prévenant l'élimination de la bactérie par des phénomènes mécaniques et en permettant l'action ultérieure des toxines [12]. *S. aureus* a aussi la capacité de se lier aux protéines plasmatiques assurant sa dissémination au sein de l'hôte. Deux mécanismes d'adhésion (probablement associés) coexistent : l'un non spécifique, médié par des forces physico-chimiques, l'autre spécifique, avec synthèse bactérienne de facteurs d'adhésion (adhésines). La plupart des adhésines ou MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) sont liées de façon covalente au peptidoglycane (adhésines à motif LPXTG), d'autres sont secrétées dans le milieu extracellulaire (SERAMs, *secretable expanded repertoire adhesive molecules*) [29]. Ces facteurs d'adhésion ont la capacité de lier plusieurs ligands ; inversement un même composant peut interagir avec différents facteurs d'adhésion [30]. Le rôle individuel de ces différents facteurs d'adhésion dans le processus infectieux est inconnu. Cependant l'expression de ces adhésines a été décrite dans différentes pathologies [31]. Une étude récente a montré que des souches de *S. aureus* impliquées dans les infections osseuses sur matériel orthopédique exprimaient majoritairement les gènes *cna* et *bbp* codant respectivement les adhésines aux collagène et à la sialoprotéine osseuse [32].

2.3.1. Les facteurs d'adhésion à motif LPXTG

Ces adhésines sont ancrées dans la paroi cellulaire grâce à leur motif LPXTG (leucine – Proline - Acide aminé X – Thréonine - Glycine). Ce motif est reconnu par une transpeptidase (sortase) qui clive le motif entre les résidus thréonine et glycine, puis catalyse la formation d'une liaison amide entre la thréonine et les ponts peptidiques du peptidoglycane [30]. La portion extracellulaire, composée de différents domaines, comporte les sites de liaison au ligand (Figure 4). Une vingtaine d'adhésines a été identifiée (Tableau 1) [23].

Tableau 1. Les principaux facteurs d'adhésion de *S. aureus* à motif LPXTG. D'après Clarke et al, Tristan et al [30, 31]

Gène	Protéine	Mode d'attachement	Ligands
spa	Protéine A	Covalente (Sortase A)	Fragment Fc des immunoglobulines Facteur Von Willebrand TNF récepteur 1
clfA	Clumping factor A	Covalente (Sortase A)	Fibrinogène
clfB	Clumping factor B	Covalente (Sortase A)	Fibrinogène Kératine
cna	Collagen binding protein	Covalente (Sortase A)	Collagène
fnbpA	Fibronectin-binding protein A	Covalente (Sortase A)	Fibronectine Fibrinogène Elastine
fnbpB	Fibronectin-binding protein B	Covalente (Sortase A)	Fibronectine Fibrinogène Elastine
bbp	Bone sialoprotein binding protein	Non déterminé	Sialoprotéine osseuse
*ebp*S	Elastin-binding protein	Transmembranaire	Elastine
eno	Laminin-binding protein	Ionique	Laminine
*sdr*C	Serine-aspartate repeat protein	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sdr*D	Serine-aspartate repeat protein	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sdr*E	Serine-aspartate repeat protein	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
pls	Plasmin-sensitive protein	Covalente (Sortase A)	Cellules épithéliales nasales Lipides cellulaires (ganglioside M3)
*sas*A/sraP	*S. aureus* surface protein A	Covalente (Sortase A)	Plaquettes
*sas*B	*S. aureus* surface protein B	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*C	*S. aureus* surface protein C	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*E	*S. aureus* surface protein E	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*F	*S. aureus* surface protein F	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*G	*S. aureus* surface protein G	Covalente (Sortase A)	Cellules épithéliales nasales
*sas*H	*S. aureus* surface protein H	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*I	*S. aureus* surface protein I	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*J	*S. aureus* surface protein J	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*sas*K	*S. aureus* surface protein K	Covalente (Sortase A)	Non déterminé
*isd*A	Iron-regulated surface determinant A	Covalente (Sortase A)	Fibrinogène/ Fibronectine Hémoglobine Transferrine Hémine
*isd*B	Iron-regulated surface determinant B	Covalente (Sortase A)	Hémoglobine Hémine
*isd*C	Iron-regulated surface determinant C	Covalente (Sortase B)	Hémine
*isd*H	Iron-regulated surface determinant H	Covalente (Sortase A)	Haptoglobine Complexe Haptoglobine/Hémoglobine
fib	Fibrinogen-binding protein	Covalente	Fibrinogène

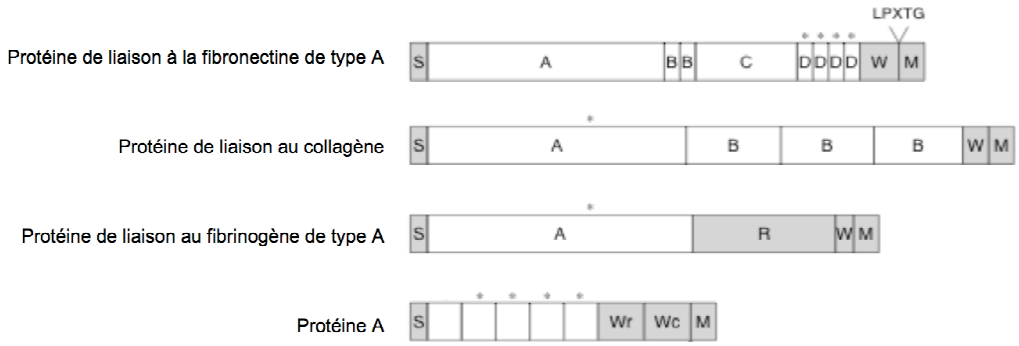


Figure 4. Structure des adhésines à motif LPXTG. Extrémité N-terminale constituée par le domaine S (peptide signal permettant l'adressage de la protéine néo-synthétisée vers le réticulum endoplasmique avant son insertion dans la membrane cellulaire ; domaines uniques (A, C) ou répétés (B, D ou R) contenant le site de liaison au ligand ; extrémité C-terminale constituée de régions hydrophobes W et M (permettant l'ancrage dans la membrane cytoplasmique) séparées par un motif LPXTG assurant la liaison covalente au peptidoglycane. D'après Foster et al 1998 [23].

2.3.2. Les SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules)

La famille des SERAMs regroupe des adhésines (n'ayant pas de relation structurale entre elles) exprimées à la surface de *S. aureus* mais sécrétées dans le milieu extérieur. Parmi ces adhésines ont été identifiées : Eap (*Extracellular Adherence Protein)* aussi désignée sous le nom de Map (MHC class II analogous protein), Emp (*Extracellular Matrix binding Protein*) et Efb (*Extracellular Fibrinogen Binding protein)* ainsi qu'une protéine liant le facteur Von Willebrand [29, 33, 34]. Celles-ci se fixent par des liaisons non covalentes, de type hydrophobe ou électrostatique, aux protéines de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine, les sialoprotéines, l'élastine ou encore la vitronectine.

Ces molécules possèdent également des propriétés immuno-modulatrices et sont notamment impliquées dans la pathogénèse des maladies endo et extra-vasculaires aiguës ou chroniques [29, 35]

La coagulase, rattachée à ce groupe est capable de fixer le fibrinogène.

2.4. La protéine A : un facteur de virulence pléiotropique

La protéine A est une protéine de surface à motif LPXTG. C'est un facteur de virulence pléiotropique : (i) elle adhère au facteur de Von Willebrand [30], (ii) elle possède des propriétés anti-opsonisantes en fixant le fragment Fc des immunoglobulines [34], (iii) elle a une action pro-inflamamatoire au niveau pulmonaire due à sa capacité d'interagir avec le récepteur TNF-α1 exprimé à la surface des cellules épithéliales respiratoires [36], (iiii) elle favorise l'agrégation bactérienne et la formation de biofilms [37] et (v) elle possèderait une activité superantigénique vis à vis des lymphocytes en se liant à l'IgM membranaire des lymphocytes B [38](Figure 5).

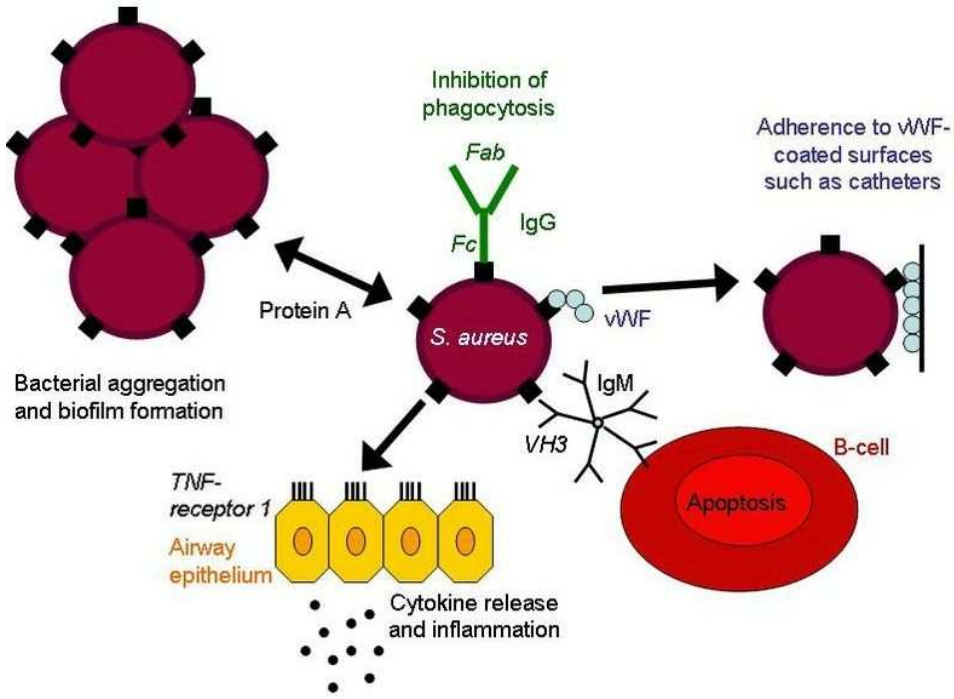


Figure 5: La protéine A, un facteur de virulence pléiotropique. D'après Maren von Köckritz-Blickwede (http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/03/a-pathogens-swiss-army-knife.html).

2.5. Lyse cellulaire et envahissement tissulaire

S. aureus a la capacité de lyser les cellules et les tissus de l'hôte grâce à la mise en jeu d'un grand nombre de cytotoxines et d'enzymes, notamment des protéases [12, 39].

2.5.1. Action des toxines à tropisme membranaire

Les toxines (ou hémolysines) α, β et δ, ainsi que les toxines synergohyménotropes (hémolysine γ, leucocidine de Panton et Valentine et leucocidine LukED), ont la propriété de former des pores dans la membrane cellulaire conduisant à la lyse cellulaire [39].

La toxine α codée par le gène *hla* a un tropisme particulier pour les cellules endothéliales, les plaquettes et les monocytes. Secrétée à l'état de monomère elle s'assemble en un pore heptamérique transmembranaire. Elle se lie aussi à des récepteurs spécifiques et induit le relargage de nombreuses cytokines proinflammatoires [40]. Ses effets délétères sont doubles : mort des cellules impliquées dans l'immunité innée et acquise, mais également stimulation du métabolisme de l'acide arachidonique, exocytose et dysfonctions de la contractilité, aboutissant à la dissémination bactérienne et à des altérations de l'hémostase [41].

La toxine β codée par le gène *hlb* est une sphingomyélinase C qui hydrolyse la sphyngomyéline des érythrocytes et des cellules mononuclées provoquant leur lyse. Elle est à l'origine d'une importante réponse inflammatoire responsable de la pathogénicité [39]. Elle est fréquemment retrouvée parmi les souches vétérinaires responsables de mammites bovines. Le gène *hlb* comporte un site d'insertion pour différents bactériophages comme le prophage ϕSa3, porteurs de facteurs immunomodulateurs. Ce prophage comporte le gène *sak* codant la staphylokinase, le gène *chp* codant la protéine CHIPS (*chemotaxis inhibing protein*) qui est un agent antiinflammatoire inhibant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et le gène *scn* codant le facteur SCIN (*staphylococcal complement inhibitor*) qui est un facteur inhibiteur de la C3 convertase du complément [42].

Les toxines synergohyménotropes sont formées de deux composants protéiques S (*slow eluting*) et F (*fast eluting*) indépendants, qui agissent de façon synergique pour former un pore et lyser la membrane cellulaire [39, 43].

La PVL, constituée des composés LukS-PV et LukF-PV, a une action cytotoxique sur les polynucléaires neutrophiles, les monocytes ou les macrophages. L'assemblage des composés de LukS-PV et LukF-PV en un pore octamérique transmembranaire conduit à lyse cellulaire entraînant une libération massive de médiateurs et d'enzymes de dégradation à l'origine de lésions nécrotiques des tissus (Figure 6)[44, 45]. Les gènes de la PVL (*luk*S-PV et *luk*F-PV) sont portés au niveau de différents bactériophages dont phiSLT[46, 47].

La toxine γ agit sur les mêmes cellules cibles que la PVL. Elle est cependant dotée d'une plus forte action hémolytique. Elle est constituée par deux opérons. Le premier code une protéine unique du groupe S (HlgA) et le second opéron code une protéine du groupe S (HlgC) ainsi qu'une protéine du groupe F(HlgB). Deux combinaisons biologiquement actives existent (HlgA+HlgB) et (Hlgc+HlgB) [39].

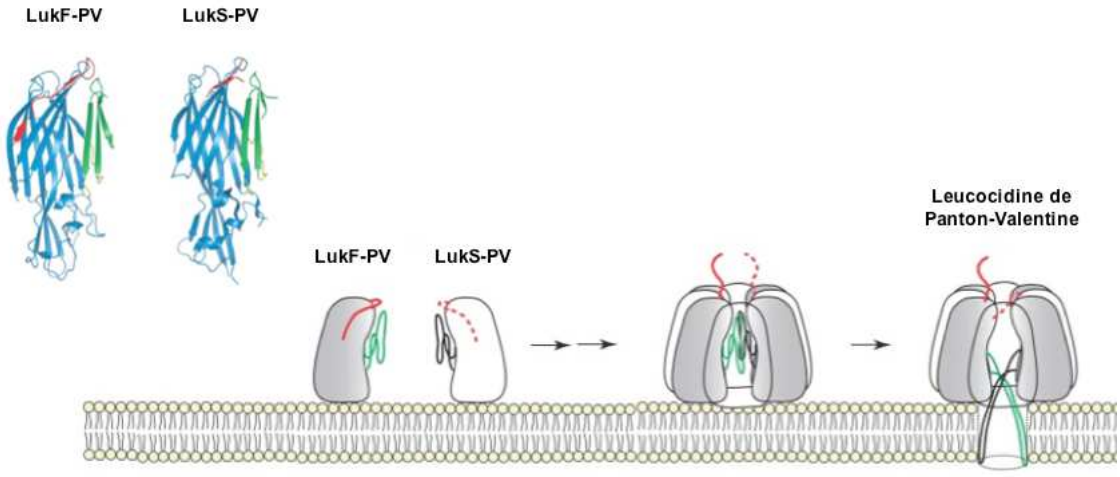


Figure 6. Mécanisme d'assemblage des monomères de lukF-PV et lukS-PV pour former un pore octamérique. D'après Miles et al [44].

2.5.2. Action des exfoliatines

Les exfoliatines sont des sérine-protéases épidermolytiques impliquées uniquement dans certaines pathologies cutanées spécifiques : l'impétigo bulleux et le syndrome d'exfoliation généralisée [48]. Trois exfoliatines ont été identifiées: l'exfoliatine A (ETA), l'exfoliatine B (ETB) et l'exfoliatine D (ETD). ETA est une protéine thermostable codée par un gène chromosomique, alors que ETB est thermolabile et codée par un gène plasmidique. Les exfoliatines ont pour cible la desmogléine-1 qui est un des composants essentiels (desmosomes) de l'adhésion intercellulaire au niveau de la peau et des muqueuses. Elles entraînent un clivage entre le stratum granulosum (couche granuleuse) et le stratum spinosum (couche épineuse) de l'épiderme. L'exfoliatine se lie avec le domaine extracellulaire de la desmogléine-1. Cette liaison entraîne une modification de configuration de la protéase rendant son site actif accessible. La protéase clive le domaine extracellulaire de la desmogléine-1, ce qui aboutit à une disjonction intercellulaire.

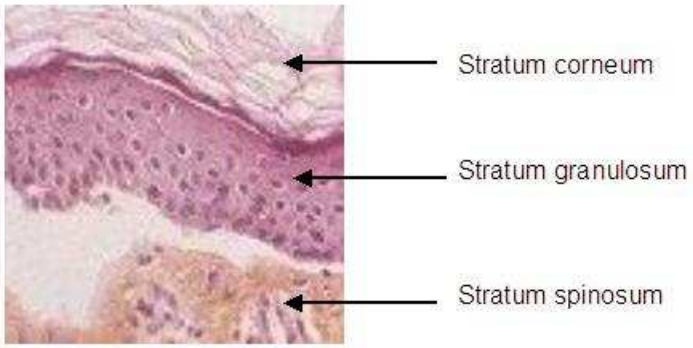


Figure 7. Action des exfoliatines sur l'épiderme humain. Clivage entre le stratum granulosum et le stratum spinosum (http://dermatopathologie.fr)

2.5.3. Action des autres enzymes

S. aureus produit d'autres enzymes qui en dégradant les constituants tissulaires, lui permettent de diffuser au sein de l'hôte :

(i) La phospholipase C, qui hydrolyse spécifiquement la membrane lipidique et protéique contenant du glycosyl-phosphatidylinositol [49].

(ii) L'auréolysine, métalloprotéase, qui hydrolyse notamment les peptides antimicrobiens secrétés par les cellules de l'hôte [50].

(iii) Les hyaluronidases et hyaluronate lyase, enzymes capables de digérer l'acide hyaluronique, polymère constitutif de la peau, des os, de l'humeur vitrée et du liquide synovial. La dépolymérisation de l'acide hyaluronique en permettant la dispersion et la dégradation tissulaire, contribuerait à promouvoir le processus infectieux [51].

(iv) Des protéases comme la sérine protéase (Sspa) et les cystéine protéases (ScpA, ScpB) qui entraînent des dégradations tissulaires par leur effets protéolytiques propres mais également en dégradant les inhibiteurs de protéases de l'hôte [52].

2.6. Facteurs de virulence impliqués dans la diffusion hématogène

La diffusion hématogène se fait probablement par le biais de thrombophlébites locales. L'inflammation locale qui active directement les cellules endothéliales, la présence de récepteurs staphylococciques pour le fibrinogène et la sécrétion de coagulase sont à l'origine de la formation de thrombus. La coagulase forme un complexe avec la prothrombine, appelé staphylothrombine qui entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine à l'origine de thrombus [53]. Ces microthrombi riches en bactéries sont dégradés par une enzyme fibrinolytique la staphylokinase qui dégrade le plasminogène en plasmine permettant ainsi le relargage dans la circulation sanguine de fragments de caillots favorisant la survenue de métastases septiques [54].

2.7. Echappement au système immunitaire inné

Le principal mécanisme de défense contre l'infection à *S. aureus* est la réponse immunitaire non spécifique. Elle repose sur le système complément, les phagocytes et les peptides antimicrobiens. *S. aureus* possède de nombreux facteurs lui permettant d'échapper à ces effecteurs de l'immunité innée. Ces facteurs sont

souvent impliqués dans d'autres mécanismes de virulence comme l'adhésion, la lyse cellulaire et la dissémination hématogène [29, 54].

S. aureus dispose de différentes stratégies pour évader aux défenses de son hôte [54] (Figure 8):

(i) La protéine CHIPS inhibe le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles en se liant à des récepteurs spécifiques de molécules chimio-attractives (fraction C5a du complément et peptides formylés). Environ 60% des souches de *S. aureus* secrètent la protéine CHIPS [42, 55].

(ii) La cascade de l'activation du complément est bloquée par la protéine Efb (*extracellular fibrinogen binding protein*) qui se lie à la fraction C3 et par la protéine SCIN (*Staphylococcus complement inhibitor*) qui interagit avec les C3 convertases inhibant la formation de C3b [35, 56, 57].

(iii) La résistance au *burst oxydatif* s'effectue par le biais de de la catalase, du pigment caroténoïde et de la superoxyde dismutase qui viennent contrer les effets des espèces réactives de l'oxygène [54].

(iv) Les peptides antimicrobiens cationiques sont inactivés par l'auréolysine et la staphylokinase et sont repoussés par modification de la charge (négative) de la surface bactérienne en charge positive (faisant intervenir une modification des acides teichoïques) [54, 58].

(v) La résistance à l'opsonophagocytose fait appel à différents acteurs. La protéine A en fixant le fragment Fc des immunoglobulines G empêche la reconnaissance des IgG fixées à la surface bactérienne par les phagocytes. La staphylokinase en transformant le plasminogène en plasmine serait à l'origine du clivage des immunoglobulines G au niveau du fragment Fc ainsi que la dégradation de la fraction C3b du complément [59]. Le clumping factor A (ClfA), les polysaccharides capsulaires et le poly-N acetylglucosamine gênent la reconnaissance des opsonines par les polynucléaires neutrophiles [54].

(vi) Les toxines à tropisme membranaires comme la γ toxine et la PVL induisent la lyse des polynucléaires neutrophiles.

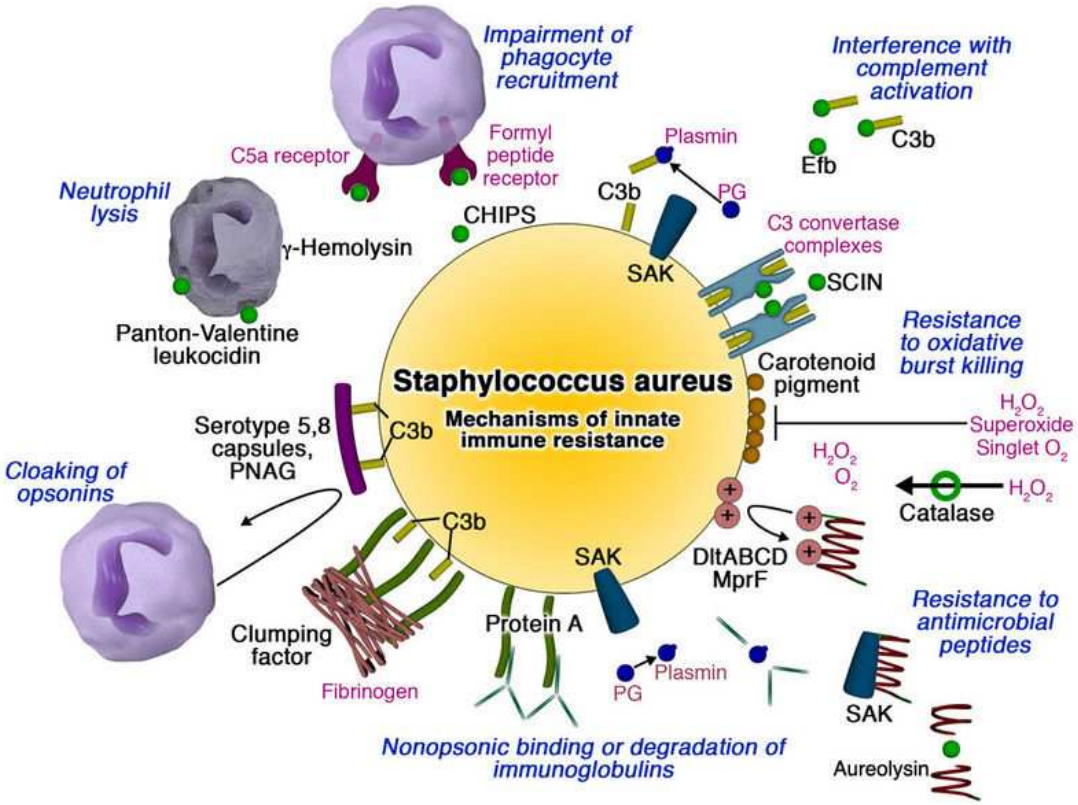


Figure 8. Mécanismes d'échappement de *S. aureus* au système immunitaire inné d'après Nizet et al [54].

2.8. Les exotoxines superantigèniques

2.8.1. Nomenclature et structure

S. aureus est capable de produire des exotoxines superantigéniques. Ce sont des protéines non glycosylées de 20 à 30 KDa synthétisées sous forme d'un précurseur protéique. Elles sont relativement stables à l'inactivation chimique, à la protéolyse et à la dénaturation par chauffage. Ces toxines sont notamment impliquées dans le choc toxique staphylococcique et les toxi-infections alimentaires.

Vingt-trois exotoxines superantigéniques staphylococciques ont été décrites à ce jour. Il s'agit de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1, *toxic shock syndrome toxin-1*) codée par le gène *tst* et de 22 entérotoxines (*staphylococcal*

enterotoxin [SE] ou *staphylococcal enterotoxin-like* [SE*l*] lorsque la toxine ne possède pas de propriétés émétiques chez le singe)[60]: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SE*l*J, SE*l*K, SE/L, SE*l*M, SE*l*N, SE*l*O, SEP, SE*l*Q, SER, SES, SET, SE*l*U, SE*l*U2, SE*lV* codées respectivement par les gènes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *sep*, *selq*, *selr, ses*, *set*, *selu, selu2, selv* [39, 61, 62].

La construction d'arbres phylogéniques basée sur l'alignement des séquences d'acides-aminés des exotoxines superantigéniques montre une ségrégation en cinq groupes monophylétiques, l'entérotoxine SET et la TSST-1 sont isolées (Figure 9) [62, 63].

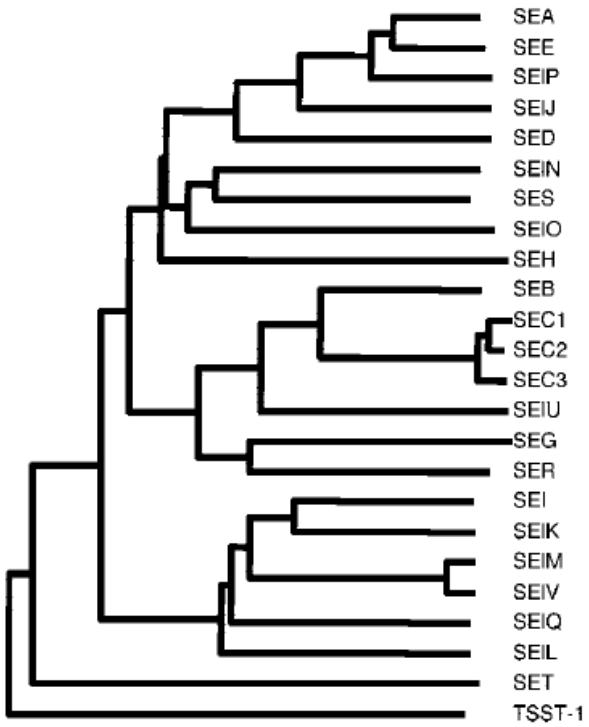


Figure 9. Arbre phylogénique des entérotoxines d'après Ono et al [62]. Groupe 1 de SEA à SEH, groupe 2 de SEB à SER, groupe 3 de SEI à SE/L, les toxines SET et TSST-1 sont isolées.

Ces toxines sont composées de deux domaines globulaires (A et B) adjacents séparés par une hélice α centrale. Le domaine A en position C-terminal est porteur de la spécificité Vβ (Figure 10)[39].

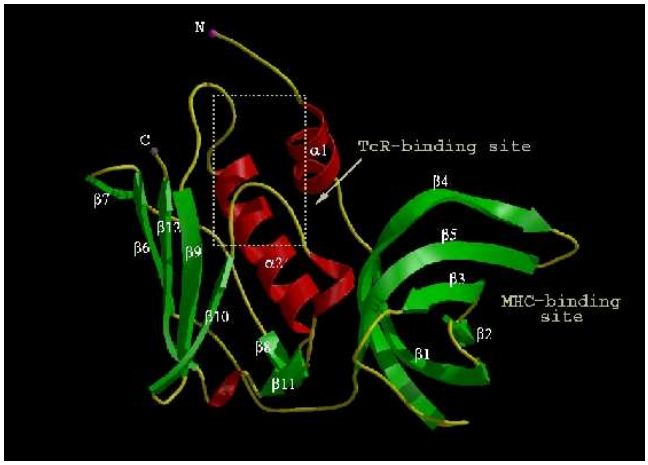


Figure 10. Aspect tridimensionnel de la TSST-1. Les domaines A et B sont séparés par une hélice α centrale. Le domaine A en position C-terminal est de type boucle β et porte la spécificité Vβ. Le domaine B en position N-terminal est de type feuillet β.

2.8.2. Localisation génomique des superantigènes

Des gènes de toxines superantigéniques sont retrouvés dans 70 à 80% des isolats cliniques de *S. aureus* [64]. Les gènes codant les exotoxines superantigéniques sont localisés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages ou îlots de pathogénicité), ce qui favorise la dissémination horizontale entre les souches.

Les îlots de pathogénicité (SaPI, *Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands*) sont des segments d'ADN chromosomique de grande taille probablement d'origine phagique qui portent divers gènes de virulence dont au moins un gène codant une exotoxine superantigénique. Leur teneur en G/C (nombre de couples guanine + cytosine pour 100 couples de bases dans la molécule d'ADN) différente de celle du chromosome bactérien, témoigne de leur origine étrangère. Ils comportent également des gènes d'intégrases responsables de leur mobilité. Ces îlots de pathogénicité peuvent donc s'exciser et se répliquer de façon autonome [19]. Cinq familles d'ilôts ont été identifiées :

(i) L'îlot SaPI1 comporte les gènes *tst*, *sek* et *seq*. De nombreux variants ont été décrits possédant soit le gène *tst* soit le gène *seb*. Le gène *tst* peut être associé au gène *sec*3 codant un des trois variants de la SEC (SEC1, SEC2 ou SEC3) (Figure 11) [64].

(ii) L'îlot SaPI2 contient une grande famille de gènes codant des entérotoxines-like (*Staphylococcal Superantigen Like* ou SSL). Leurs séquences, tant génomiques que structurales, sont homologues avec celles des toxines superantigéniques. Cependant, les résidus importants impliqués dans la liaison au CMH de classe II et au TCR ne sont pas conservés. Ces SSL sont toutefois capables d'induire une réponse inflammatoire avec production de cytokines (IL-6, IL-1β et TNF-α) et d'interagir avec les monocytes et les cellules dendritiques. Il existe une prévalence élevée en anticorps anti-SSL. Leur rôle reste méconnu et interviendrait dans l'interaction de *S. aureus* avec l'hôte (Figure 11)[64].

(iii) L'îlot SaPI3 est composé d'un opéron de gènes codant des sérine protéases, de l'opéron des gènes de la leucocidine LukED, de l'opéron *egc* (*enterotoxin gene cluster*). L'opéron *egc* regroupe les gènes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* et *selo*. L'*egc* est considéré comme une «pouponnière» d'entérotoxines à l'origine de la plupart des gènes d'entérotoxines (Figure 11) [61, 65]. Les superantigènes codés au sein de l'*egc* sont les plus fréquemment rencontrés chez *S. aureus*. Près de 50 à 60% des isolats cliniques contiennent ces gènes mais ne sont pas associés à un syndrome clinique [66].

(iv) L'ilot SaPI4 a été identifié, d'après ces ressemblances structurales avec SaPI1, SaPI2, et SaPI3, chez la première souche de SARM communautaire séquencée par Baba et al (souche MW2 appartenant au clone USA 400). Cependant les fonctions des gènes qui le composent sont méconnues [67].

(v) L'ilot SaPI5 comporte les gènes codant les entérotoxines SEQ2 et SEK2 respectivement très proches de SEQ et SEK. Cet ilôt est retrouvé chez le clone comunautaire américain de type en électrophorèse en champ pulsé USA300 [46].

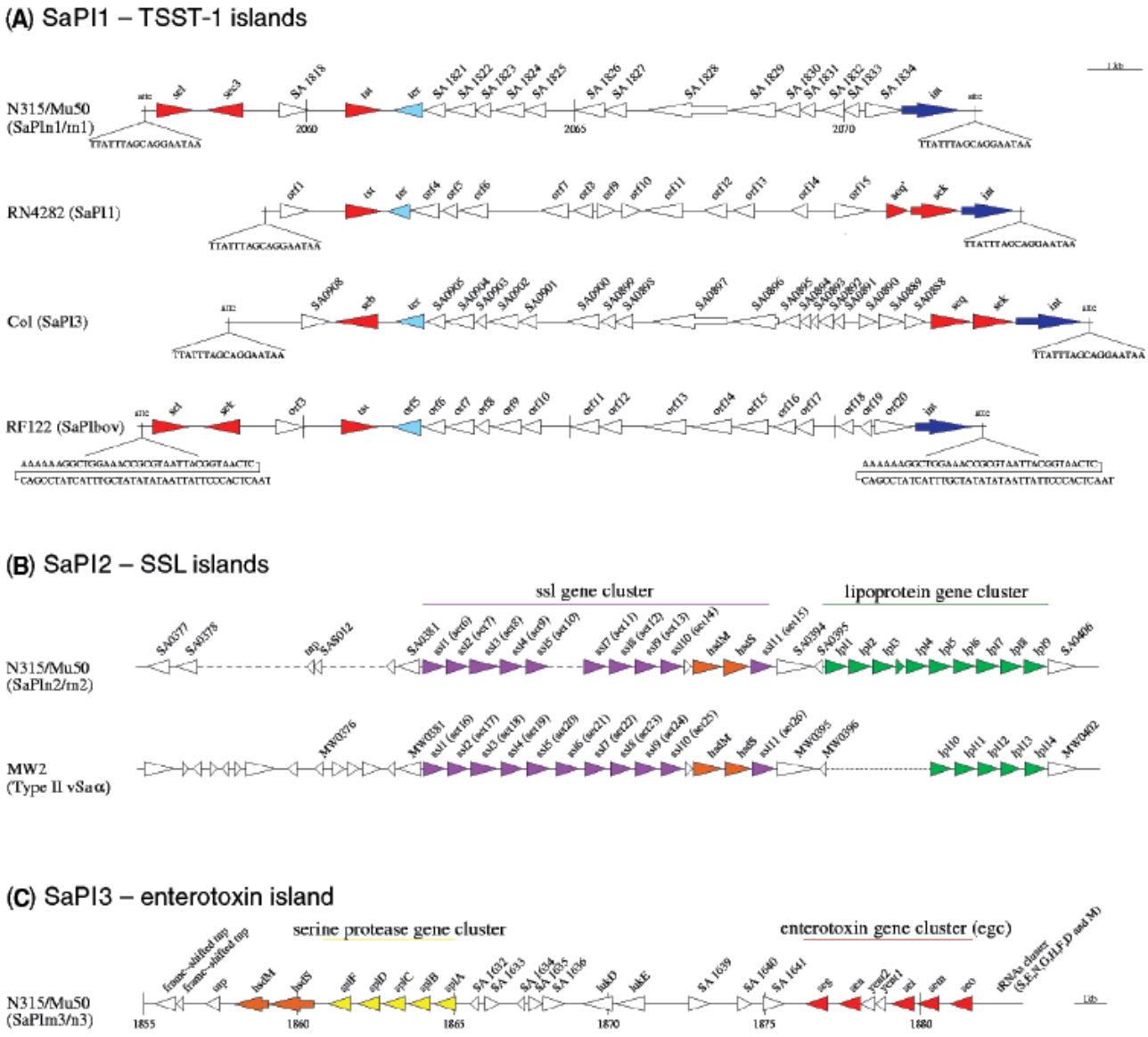


Figure 11. Les ilôts de pathogénicité de *S. aureus* (SaPI1-3). En rouge, gène codant les exotoxines superantigéniques ; en jaune, gène de sérine protéase (*spl*) ; en bleu foncé, gène d'intégrase (*int*) ; en bleu clair, gène de terminase-*like* ; en blanc, ORFs (cadres de lecture ouverts) de fonction inconnus ; en vert, gènes de lipoprotéines ; en brun, système de restriction/modification ; en violet, gènes *ssl* ; *tnp*, gène de transposase ; *luk*, gène de leucocidine. D'après Holfreter et al [64].

2.8.3. Activité des superantigènes

Contrairement à un antigène conventionnel, les superantigènes outrepassent les étapes d'apprêtement de présentation de l'antigène. Ils se fixent de manière conjointe, en dehors du site de présentation de l'antigène, sur la partie constante du

complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) de la cellule présentatrice de l'antigène et sur la partie variable Vβ du récepteur TCR des lymphocytes T. La SEH a la particularité de se lier sur la partie Vα du TCR [68]. Alors qu'un antigène conventionnel active de manière spécifique 0,01% des lymphocytes T, seulement quelque picogrammes d'un superantigène peuvent activer jusqu'à 40% d'entre eux provoquant la libération massive de cytokines pro-inflammatoires de type T helper-1 (Th-1) dont l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6 et l'IL-2 responsables du choc [69]. Les superantigènes ont des propriétés communes : le pouvoir pyrogène, les propriétés superantigéniques, et la capacité de potentialiser de plus de 50.000 fois la létalité à l'endotoxine chez le lapin [69].

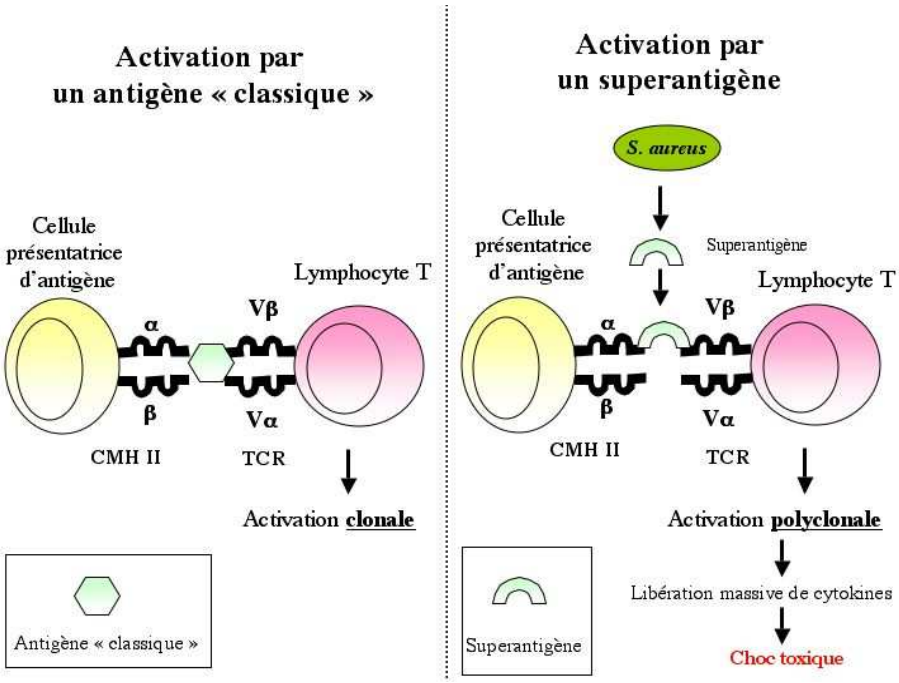


Figure 12. Activation lymphocytaire polyclonale par les superantigènes. A gauche, activation lymphocytaire en présence d'un antigène « classique », apprêté et présenté au récepteur TCR des lymphocytes T par le CMH II de la cellule présentatrice de l'antigène entraînant une activation clonale spécifique des lymphocytes T (de l'ordre de 0,01% des lymphocytes T) ; à droite, activation lymphocytaire en présence d'un superantigène se fixant conjointement sur le CMH II et sur la partie variable Vβ du récepteur TCR des lymphocytes T induisant une activation polyclonale Vβ dépendante des lymphocytes T (jusqu'à 40% des lymphocytes T activés) (http://spiral.univ-lyon1.fr).

La phase de prolifération polyclonale des lymphocytes T Vβ dépendante est suivie par une phase où la production de certaines cytokines est inhibée comme celle de l'IL-2, par une phase d'anergie et parfois d'une déplétion des lymphocytes T Vβ spécifique [69]. Par ailleurs, les superantigènes induisent une immunodépression T et B par stimulation des lymphocytes T suppresseurs et une destruction ou inactivation des lymphocytes T helper (apoptose et anergie). Ils induisent aussi une déplétion lymphocytaire B. L'ensemble des effets biologiques des superantigènes apparaît comme délétère pour l'hôte dans la réponse immune contre les staphylocoques.

Les superantigènes désorganisent ainsi la réponse immunitaire spécifique. D'autres molécules immuno-modulatrices comme la protéine A et la protéine Map ou Eap (cf paragraphe 2.3.2) interviennent également dans ce processus d'immunodépression de l'hôte (Figure 13) [34].

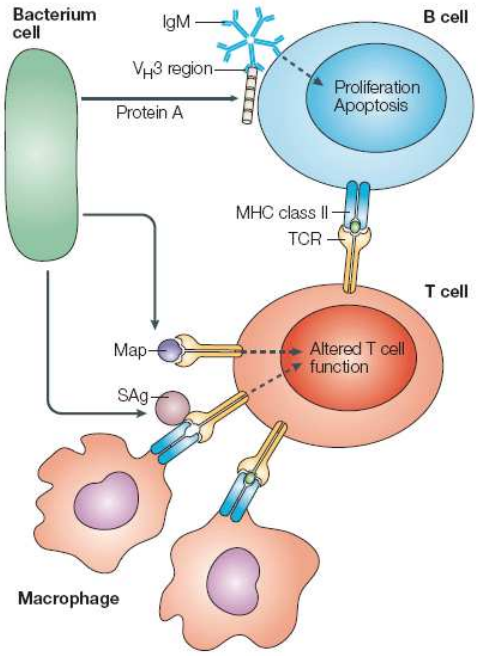


Figure 13. Altération de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte par *S. aureus*. Les superantigènes empêchent la réponse spécifique à l'antigène ; Map (Eap) se lie au récepteur TCR altérant la fonction des lymphocytes T; La protéine A interagit avec la région VH3 des IgM de surface des lymphocytes B induisant leur prolifération et leur apoptose. D'après Foster et al [34].

2.8.4. Répertoire VBéta

Les exotoxines superantigéniques fixent un ou plusieurs des 24 principaux répertoires Vβ d'un individu. Ainsi, chacune d'entre-elles possède théoriquement « une signature Vβ » caractéristique [70]. La signature Vβ de chacune des exotoxines superantigéniques a été déterminée *in vitro* par cytométrie de flux (Tableau 2). La TSST-1 a pour unique cible le Vβ2 qui lui est spécifique [71]. Par contre les entérotoxines ont la capacité de fixer plusieurs Vβ mais aucun Vβ n'est spécifique d'une entérotoxine. Les différents Vβ composant la signature d'une entérotoxine peuvent être considérés comme des Vβ majeurs ou des Vβ mineurs, selon l'intensité de leur expansion induite par l'exotoxine superantigénique en question [70].

Les effets superantigéniques peuvent être indirectement mesurés chez les patients par la détermination des répertoires Vβ des TCR parmi l'ensemble des lymphocytes [72]. Ferry et al décrivent la confirmation précoce d'un choc toxique staphylococcique dû à une souche de *S. aureus* possédant la TSST-1 chez un enfant de 12 ans grâce à la détection du répertoire Vβ2 [73]. Ce diagnostic précoce a permis de traiter le patient par un antibiotique antitoxinique comme la clindamycine. Cependant, cette recherche est difficile : (i) l'effet des superantigènes peut entraîner la prolifération ou l'apoptose de certains clones de lymphocytes T, (ii) la réponse peut être dépendante de polymorphismes du CMH de classe II, (iii) la signature Vβ est dépendante de la dose de superantigène, Llewelyn et al ont montré l'activation partielle du répertoire Vβ de la SEA lorsque celle ci était à faible dose [74], enfin (iv) la signature Vβ bien que prédictive de la toxine superantigénique impliquée, n'est souvent que la résultante de l'ensemble des toxines superantigéniques sécrétées par la bactérie, cas de loin le plus fréquent [70].

Enfin l'activité superantigénique peut être mesurée par un autre test reposant sur la mesure de l'expression lymphocytaire du marqueur d'activation CD69 [75]. Ce test est réalisé à partir de surnageants de cultures de souches de *S. aureus* incriminées dans des syndromes toxiniques.

Tableau 2. Signature Vβ et localisation génomique de chacune des exotoxines superantigéniques de *S. aureus*. Les signatures Vβ ont été déterminées *in vitro* avec le kit IOTest Beta Mark par cytométrie de flux sur culture de PBMCs. D'après Thomas et al [62, 64, 70].

Superantigène	Localisation génomique	Signature Vβ
TSST-1	$SaPI_1$	2
SEA	Prophage (ΦSa3)	5.2, 5.3, 7.2, 9, 16, 18, 22
SEB	$SaPI_1$	3, 12, 13.2, 14, 17, 20
SEC	$SaPI_1$	3, 12, 13.2, 14, 17, 20
SED	Plasmide (pIB485)	1.1, 5.1, 5.2, 5.3
SEE	Phage	5.1, 8, 16, 18, 21.3
SEG	$SaPI_3$	3, 13.1, 13.2, 14
SEH	SCC*mec*	6.7, 8
SEI	$SaPI_3$	1, 5.1, 5.2, 5.3
SE/J	Plasmide pIB485	8, 21.3
SE/K	$SaPI_1$	1, 5.1, 5.2, 6.7
SE/L	$SaPI_1$	1, 5.1, 5.2, 5.3, 7.1, 16, 22, 23
SE/M	$SaPI_3$	21.3
SE/N	$SaPI_3$	9
SE/O	$SaPI_3$	7,1
SE/P	Prophage (ΦSa3)	5.1, 8, 16, 18, 21.3
SE/Q	$SaPI_1$	6.7, 21.3
SER	Plasmides (pIB485, pF5)	3, 12 ,14
SE/U	$SaPI_3$	13.2, 14
SE/V	$SaPI_3$	6.7, 18, 21.3
SES	Plasmide pf5	Non déterminée
SET	Plasmide pf5	Non déterminée

2.9. La TSST-1

2.9.1. Rôle dans les pathologies auto-immunes

En déclenchant l'activation polyclonale des lymphocytes T, les superantigènes induisent l'activation parasite des lymphocytes dirigés contre des antigènes du « soi » jouant un rôle dans les pathologies auto-immunes. Les superantigènes de *S. aureus* dont la TSST-1 pouraient être impliqués dans l'étiologie de certaines

pathologies comme la dermatose atopique [76], la colite ulcéreuse [77], l'arthrite [78] ou encore la rhinosinusite chronique [79]. Par ailleurs, la TSST-1 a été impliquée dans la survenue de la maladie de Kawasaki (cf Chapitre III paragraphe 2.2.4).
Le rôle exact de la TSST-1 dans ces pathologies n'est pas encore clairement établi. On ignore si la TSST-1 est un facteur étiologique ou bien un cofacteur favorisant la survenue de poussées évolutives.

2.9.2. Pénétration de la barrière muqueuse

Dans le cas de choc toxique staphylococcique menstruel, la TSST-1 doit pénétrer la muqueuse vaginale afin de pouvoir interagir avec les cellules de l'immunité et induire les effets systémiques du choc toxique. Le mécanisme de pénétration de la muqueuse vaginale n'est pas encore totalement élucidé. Différents travaux effectués sur un modèle de cellules épithéliales vaginales humaines immortalisées et sur un modèle *ex vivo* de muqueuse vaginale porcine ont permis d'étudier ce mécanisme (Figure 14) [80]. La TSST-1 se fixerait à un récepteur spécifique situé au niveau des cellules épithéliales grâce à une région dodecapeptidique (F119-D130), région non impliquée dans l'activité superantigénique [81]. L'intéraction de la TSST-1 avec les cellules épithéliales vaginales induirait une réponse immunitaire non spécifique avec un relargage de chemokines et de cytokines (IL-1β, IL-8, IL-6, MIP-3α) et un influx de lymphocytes [82, 83]. Cette réponse inflammatoire locale entraînerait une modification de la perméabilité de la muqueuse vaginale qui permettrait la pénétration de la TSST-1. Le passage transépithélial de la TSST-1 par transcytose est également évoqué mais serait moins important [81]. La réponse inflammatoire des cellules épithéliales vaginales à la TSST-1 requiert une dose beaucoup plus importante de toxine que celle requise pour l'activité superantigénique (≥ 10µg/mL versus $\geq 10^{-3}$µg/mL) [81]. Les biofilms de *S. aureus* formés lors de la colonisation vaginale en période de menstruation peuvent produire de grosse quantité de toxine.
D'après certains auteurs, des cytolysines comme l'hémolysine α agiraient en synergie avec la TSST-1 [83]. L'hémolysine α provoquerait une réponse proinflammatoire au niveau des cellules épithéliales superficielles de la muqueuse vaginale avec production de chemokines et de cytokines (IL-1β, IL-8, IL-6, TNF-α),

sans endommager l'épithelium vaginal, et favoriserait la pénétration de la TSST-1. La TSST-1 pourrait alors accéder à ses récepteurs spécifiques qui se situeraient au niveau d'une couche plus profonde de l'épithélium.

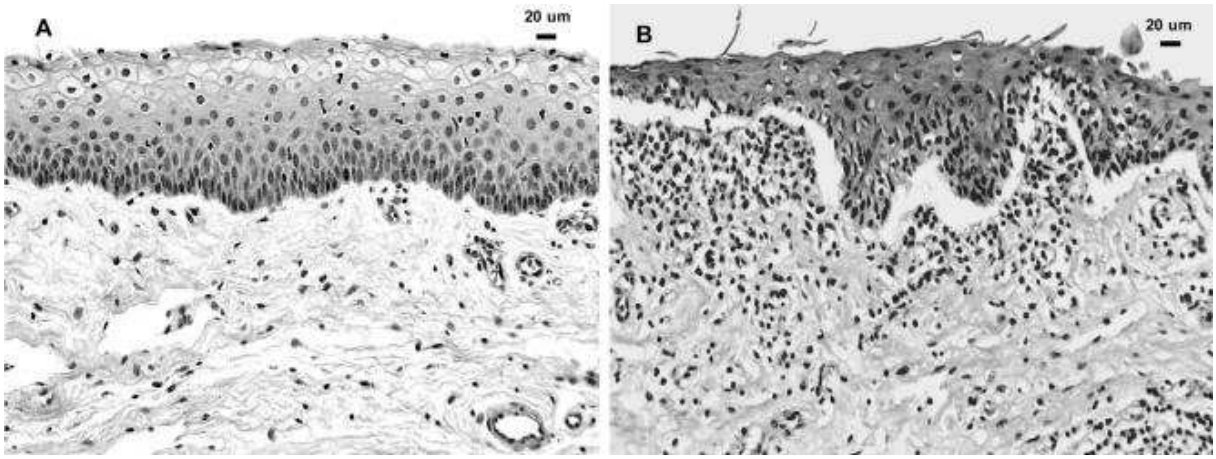


Figure 14. Action proinflammatoire de la TSST-1 dans un modèle *ex vivo* de muqueuse vaginale porcine. A : muqueuse contrôle. B : muqueuse pré-incubée avec une souche MN8 de *S. aureus* puis incubée avec de la TSST-1 marquée montrant une desquamation des cellules épithéliales, une infiltration lymphocytaire sous-épithéliale avec séparation de l'épithelium du tissu conjonctif. D'après Peterson et al [82].

3. Régulation des facteurs de virulence

3.1. Expression séquentielle des facteurs de virulence

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* repose sur l'expression coordonnée de nombreux facteurs de virulence au cours des différentes phases de l'infection. La phase de colonisation fait intervenir des protéines d'adhésion comme la protéine A ou bien les MSCRAMMs alors que les phases d'invasion et de dissémination font intervenir des exoprotéines comme des hémolysines, des protéases ou des entérotoxines qui permettent *in vivo* l'extension du foyer infectieux [12].

La courbe de croissance *in vitro* de *S. aureus* décrit comme pour les autres bactéries une courbe en S : phase de latence, phase de croissance exponentielle, phase de ralentissement, phase stationnaire, phase de déclin (Figure 15). Les adhésines sont

synthétisées pendant la phase de croissance et les exoprotéines pendant la phase post-exponentielle.

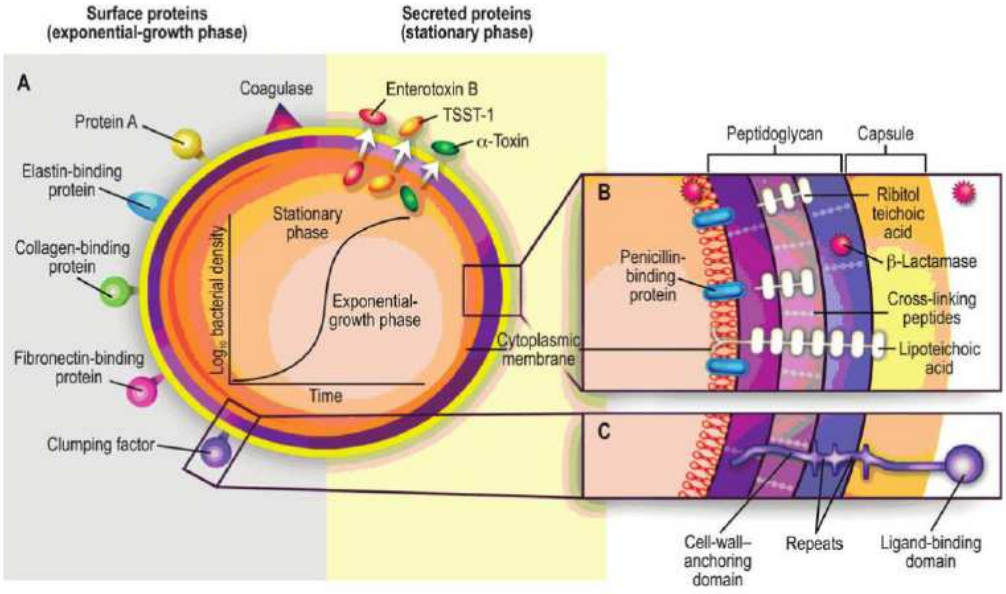


Figure 15. Régulation de l'expression des facteurs de virulence. A : Synthèse des facteurs de virulence exprimés à la surface lors de la phase exponentielle, synthèse des facteurs de virulence secrétés lors de la phase post-exponentielle. B : Structure de la paroi de *S. aureus*. C : Ancrage des MSCRAMMs dans le peptidoglycane. D'après Gordon et al [84].

3.2. Régulation par le système *agr*

Le système *agr* est un régulateur global contrôlant l'expression séquentielle de la plupart des facteurs de virulence de *S. aureus* en fonction de la densité bactérienne et de l'état de croissance. Quand la densité bactérienne est faible *in vitro*, le système *agr* n'est pas activé et la synthèse des protéines d'adhésion prédomine sur celle des exoprotéines. A l'inverse quand la densité bactérienne augmente en phase post-exponentielle de croissance, le système *agr* réprime l'expression des protéines d'adhésion et induit l'expression d'un grand nombre d'exoprotéines.

Le modèle admis d'activation du système *agr* met en jeu un système de stimulation de type densité cellulaire («quorum sensing»). Ce système code un peptide AgrD

maturé en un peptide auto-inducteur (PAI) sous l'effet d'AgrB. Ce peptide est secrété dans l'environnement extracellulaire et son accumulation progressive au cours de la croissance bactérienne conduit, à partir d'un certain seuil, à l'activation d'un système de transduction du signal à deux composants. Le premier composant est une protéine senseur AgrC sensible à la concentration du peptide autoinducteur. L'autre composant est un régulateur de réponse appelé AgrA dont l'activation entraîne la production de l'effecteur du système qui est un ARN non codant : l'ARNIII (Figure 16) [85].

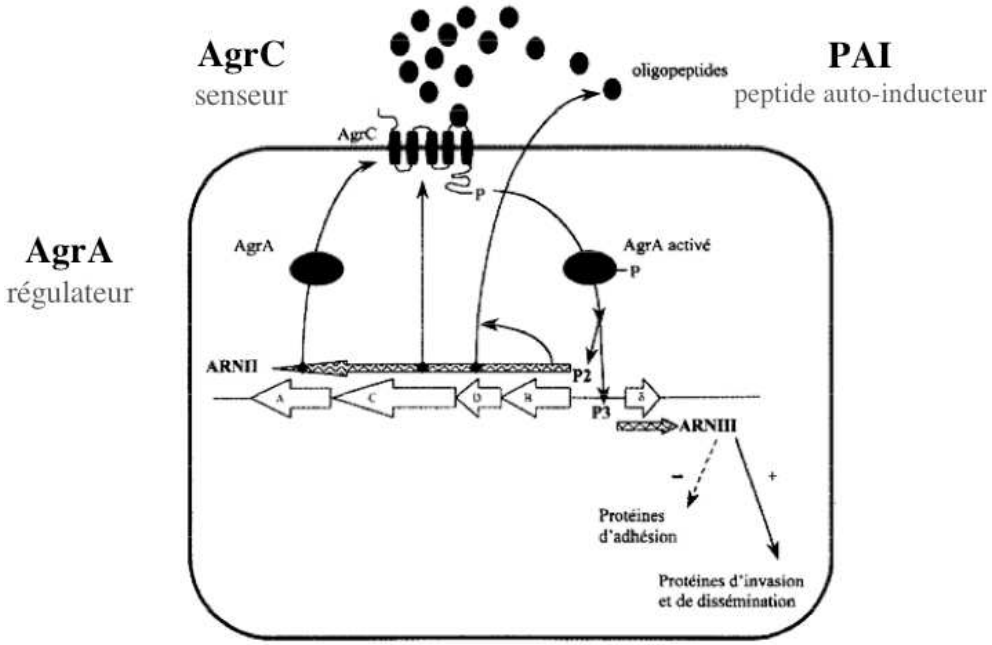


Figure 16. Activation du sytème *agr*. D'après Dufour et al [86]

Le polymorphisme au niveau de la séquence en acides-aminés du peptide autoinducteur et de son récepteur AgrC permet de différencier 4 allèles (*agr*1-4). Chaque allèle est caractérisé par un octapeptide capable d'activer la réponse *agr* des souches de même allèle et d'inhiber celles des autres souches.

La plupart des souches de *S. aureus* productrices d'exfoliatines sont *agr* 4. Ces souches *agr* 4 ont une activation très précoce de la réponse *agr*, dès la phase exponentielle de croissance soit au moins 2 heures plus tôt que dans les autres groupes [87].

3.3. Sar A et homologues

Les protéines de la famille de SarA (staphylococcal accessory regulator A) constituent un ensemble de protéines ayant la capacité de lier l'ADN et donc de se fixer aux séquences promotrices de gènes cibles dont elles régulent la transcription. Elles comprennent notament SarA, SarR, SarS, SarT, SarU et Rot (repressor of toxins). Ces protéines modulent l'expression des facteurs de virulence à la fois de façon directe et indirecte en agissant sur d'autres protéines régulatrices [85].

Chapitre III - Infections à *S. aureus*

La pathogénie de *S. aureus* est originale par sa diversité. On peut diviser les infections à staphylocoques en deux groupes principaux: les infections suppuratives qui dépendent avant tout de la prolifération du pathogène et les infections toxiniques dues à la diffusion d'une toxine secrétée par *S. aureus*.

1. Infections suppuratives à *S. aureus*

Les infections suppuratives sont soit primitives, l'exemple type est le furoncle, soit secondaires où une porte d'entrée, généralement une effraction cutanée ou une intervention chirurgicale précède l'infection. Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion puis la destruction des tissus de l'hôte, la réponse inflammatoire locale et systémique. *S. aureus* est donc présent au niveau du site infectieux.

1.1. Infections superficielles cutanéo-muqueuses

Les infections suppuratives de la peau sont les infections à *S. aureus* le plus fréquemment rencontrées. Il s'agit le plus souvent d'autoinfestation à partir de la flore endogène [88]. Parmi ces infections, on distingue:

(i) la folliculite (infection limitée au follicule pileux) ayant l'aspect d'une pustule jaunâtre avec une étroite zone marginale rouge.

(ii) le furoncle, infection nécrotique profonde du follicule pileux, douloureux, souvent accompagné de fièvre (Figure 17).

(iii) l'anthrax (groupe de furoncles), lésion nécrotique accompagnée de malaise général et de fièvre.

(iv) le panaris, abcès péri-unguéal douloureux avec inflammation périphérique siégeant sur la phalange distale (Figure 17).

S. aureus est également à l'origine d'infections des muqueuses : conjonctivite purulente, otite, laryngite, phlegmon de l'amygdale et sinusite [88].

Figure 17. Infections cutanées *à S. aureus*. A gauche, furoncle (Photo, Y. Gillet communication personnelle), à droite, panaris, (Photo http//:www.pudendalsite.com)

1.2. Infections profondes

1.2.1. Infections des tissus mous

Ces infections peuvent faire suite à une extension locorégionale d'une infection superficielle de la peau à *S. aureus* [88]. On reconnaît parmi ces infections plusieurs entités dont :

(i) La staphylococcie maligne de la face qui correspond à l'extension loco-régionale d'un furoncle manipulé de l'aile du nez. Elle affecte plus souvent les sujets jeunes et se caractérise par un placard inflammatoire rapidement extensif autour du furoncle initial, associé à une altération de l'état général et une fièvre élevée. Cette infection gravissime s'accompagne souvent de septicémie. Dans de rares cas elle peut évoluer vers une cellulite orbitraire [89]. En l'absence de traitement, son évolution est spontanément mortelle par thrombophlébite des sinus caverneux et une atteinte méningée.

(ii) La fasciite nécrosante qui est une infection profonde de l'hypoderme avec atteinte de l'aponévrose superficielle (Figure 18). Cette pathologie gravissime nécessite un drainage chirurgical.

(iii) La pyomyosite qui est une inflammation musculaire profonde d'origine septique évoluant vers l'abcédation. Elle est surtout rencontrée dans les pays en voie de développement [90].

Ces trois pathologies sont rares et majoritairement liées à des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline. Toutefois, l'incidence de ces pathologies augmente du fait de la diffusion des clones de SARM communautaires qui possèdent la leucocidine de Panton Valentine. De nombreux cas incriminant la souche communautaire américaine appartenant au clone USA300 sont rapportés [91].

Figure 18. Fasciite nécrosante extensive de la jambe à SASM producteur de PVL. D'après Lee 2005 [92].

1.2.2. Autres infections profondes

Les autres infections profondes à *S. aureus* bien que parfois primitives surviennent principalement par diffusion hématogène de la bactérie. Pratiquement toutes les localisations peuvent être observées mais les prévalences varient en fonction des

sites. *S. aureus* peut être alors responsable de septicémies, d'endocardites, d'ostéomyélites, d'arthrites, de pneumopathies, de méningites ou encore d'infections urinaires [12, 93-95].

2. Infections toxiniques

Les infections toxiniques ne sont pas dues à l'action bactérienne directe mais sont dues à la sécrétion de toxines. Ces toxines agissent le plus souvent à distance du foyer infectieux. Elles sont produites par un nombre limité de souches et provoquent un syndrome spécifique.

2.1. Les syndromes d'exfoliations

Les syndromes d'exfoliation staphylococcique sont dus à des souches produisant des exfoliatines A et B (ETA, ETB). Ces syndromes restent l'apanage des enfants. Une explication probable est l'absence d'anticorps protecteurs vis à vis des exfoliatines chez les enfants en bas âge [48].

2.1.1. Impétigo bulleux

Il s'agit d'un syndrome d'exfoliation localisé dû à *S. aureus* porteur d'ETA (Figure 19)[48]. L'impétigo bulleux débute par des taches érythémateuses sur lesquelles surviennent des bulles à liquide clair. Le contenu des bulles devient purulent et elles laissent place à des croûtes jaunâtres. On retrouve *S. aureus* au niveau du contenu des bulles. Bien que l'impétigo bulleux puisse être primitif, le point de départ est habituellement une surinfection d'une lésion cutanée (surinfection de varicelle ou de plaie). Certaines souches de SARM communautaires ayant acquis le gène codant ETA et responsables d'impétigo bulleux ont été isolées au Japon en 2002 et en Suisse en 2004 [96, 97].

Figure 19. Impétigo bulleux. (Photo http://spiral.univ-lyon1.fr).

2.1.2. Syndrome d'exfoliation généralisée

Le syndrome d'exfoliation généralisée (*Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS*) est encore appelé syndrome de Ritter chez le nouveau-né ou syndrome de la peau ébouillantée chez le jeune enfant. Ce syndrome complique le plus souvent une infection primitive à *S. aureus* (Figure 20)[48]. Ce syndrome complique plus rarement une lésion cutanée préexistante. Cette infection survient surtout chez l'enfant avant 15 ans. Dans sa forme grave, elle entraîne une épidermolyse pouvant atteindre 90% de la surface corporelle, responsable de bulles étendues à contenu clair dans lequel on ne retrouve pas *S. aureus*. Le syndrome clinique associe de la fièvre et des macules initialement limitées au pourtour des yeux, des narines et des lèvres rapidement suivies par une éruption scarlatiniforme généralisée prédominante au niveau des plis. En 24-48h, des lésions bulleuses avec décollement de la peau apparaissent. Ces bulles se rompent facilement, laissant apparaître une peau rouge et vernissée. L'aspect est comparable à une brûlure superficielle étendue du second degré. Ce syndrome est du à des exfoliatines ETA et ETB, plus particulièrement ETB. Elles agissent par clivage des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales épidermiques (cf chapitre II, paragraphe 2.5.2)(Figure 7). Ce clivage induit un décollement intraépidermique (signe de Nikolsky positif). Ni le derme, ni l'hypoderme

ne sont atteints, et il n'y a pas de réaction inflammatoire. L'absence d'atteinte des muqueuses est un élément important permettant d'établir un diagnostic différentiel avec les autres dermatoses bulleuses graves comme le syndrome de Lyell ou le syndrome de Stevens-Johnson. Le taux de mortalité est faible, <5%. Des épidémies ont été décrites dans des services de néonatologie, imposant des mesures d'isolement. Le traitement du syndrome d'exfoliation est avant tout symptomatique associé à une antibiothérapie conventionnelle pour éradiquer le foyer de l'infection. Quelques observations chez l'adulte ont été rapportées notamment chez des patients immunodéprimés et chez des patients insuffisants rénaux ces derniers éliminant mal les toxines. Le taux de mortalité chez l'adulte est beaucoup plus élevé (entre 40% et 60%) [98].

Figure 20. Syndrome d'exfoliation généralisée, à gauche, infection primitive, à droite, surinfection de varicelle (Photos Y. Gillet, communication personnelle)

2.2. Pathologies liées aux exotoxines superantigéniques

2.2.1. Les toxi-infections alimentaires à Staphylocoques

Elles sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant une toxine préformée. Les toxines responsables sont les entérotoxines [88]. L'incubation est généralement brève de 3h en moyenne puis le patient est atteint de vomissements, de diarrhée et

plus rarement d'un collapsus. L'évolution est généralement favorable en quelques heures, les formes graves étant l'apanage des terrains particuliers. L'antibiothérapie ne semble pas influencer l'évolution. Les produits laitiers et les viandes sont les plus souvent en cause, contaminés par un personnel porteur de staphylocoques. La recherche de toxines n'a pas d'intérêt chez le patient. Dans un contexte fréquent de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) la recherche de toxine peut être demandée dans les vomissements et dans les aliments suspects. Dans le cas de TIAC, la recherche d'un portage de souches de *S. aureus* toxinogènes est effectuée chez le personnel en contact avec les aliments.

2.2.2. Le choc toxique staphylococcique

Il s'agit d'une affection aiguë associant de la fièvre, un rash scarlatiniforme cutané évoluant vers une desquamation secondaire, un choc et des signes d'atteinte multiviscérale. Le diagnostic s'effectue sur la base de critères de choc, d'atteinte polyviscérale et paracliniques (six critères au total) définis par le *Center of Disease Control* (CDC). La présence de cinq critères sur six permet de définir les cas probables de choc toxique staphylococcique (CTS), celle de six des critères permet de définir les cas confirmés de CTS) (Tableau 3).

Le CTS est surtout connu depuis sa description chez des femmes lors des périodes menstruelles en association significative avec l'utilisation de tampons vaginaux [99, 100]. Le CTS est dû soit à la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1) soit à des entérotoxines. Ces toxines ont une activité superantigénique, c'est à dire qu'elles sont capables d'activer de façon polyclonale les lymphocytes T indépendamment de leur spécificité antigénique. De cette activation, découle la majorité des effets biologiques expliquant la survenue des signes cliniques du choc toxique staphylococcique : (i) la libération massive de cytokines, de lymphokines et d'interféron, la sensibilisation des monocytes aux endotoxines et les lésions de l'endothélium sont à l'origine d'une augmentation de la perméabilité capillaire et d'une fuite massive de liquide dans le secteur interstitiel responsable du choc, (ii) l'expression de molécules d'adressage des lymphocytes activés vers la peau explique les signes cutanés [101, 102].

Tableau 3. Critères diagnostiques du CDC d'un choc toxique staphylococcique. Un CTS est probable si 5 des 6 critères sont positifs. Un CTS est confirmé si tous les critères sont positifs. (http://cdc.gov/epo/dphsi/casedef/toxicsscurrent.htm)

1. Fièvre > 38°8

2. Eruption : érythrodermie maculaire diffuse

3. Desquamation cutanée : 1 à 2 semaines après le début des symptômes, particulièrement au niveau des mains et de la plante des pieds

4. Hypotension :
- Pression systolique ≤ à 90 mmHg
- Baisse ≥ à 15 mmHg de la pression diastolique à l'othostatisme
- Syncope à l'orthostatisme

5. Atteinte multisystémique (positive si ≥ 3 critères)
- Gastrointestinale : diarrhée, vomissements
- Musculaire : myalgie ou CPK > 2N
- Muqueuse : hyperhémie vaginale, conjonctivale ou oropharyngée
- Rénale : hyperuricémie > 2N ou créatininémie >2N ou pyurie aseptique
- Hépatique : ASAT >2N ou ALAT >2N ou bilirubine >2N
- Hématologique : plaquettes < 100 G/L
- Système nerveux central : désorientation ou trouble de conscience sans focalisation

6. Critères paracliniques
- Hémocultures (sauf pour *S. aureus*), cultures sur prélèvement de gorge ou sur LCR négatives
- Sérologie *Rickettsia rickettsii,* leptospirose, rougeole,

Les CTS menstruels surviennent en dehors de toute infection, au cours des menstruations lors de l'utilisation de tampons périodiques à fort pouvoir absorbant ou lors du port de stérilet, colonisés par une souche de *S. aureus* productrice de TSST-1. La TSST-1 traverse la muqueuse vaginale et atteint la circulation systémique. Elle est responsable à elle seule de l'intégralité des signes cliniques et biologiques du choc toxique menstruel [101, 102]. Le taux d'incidence des CTS menstruels aux USA a diminué entre 1980 et 1996, suite à la limitation du pouvoir absorbant des tampons [103]. La prévention de la récidive du CTS menstruel repose sur la contre-indication ultérieure à utiliser des tampons absorbants.

Les CTS non-menstruels sont rencontrés à la suite d'infections staphylococciques suppuratives superficielles ou profondes, le plus souvent post-opératoires [101, 102]. Les premières observations de CTS non menstruels ont été décrites chez des enfants en 1978 par Todd et al [104]. Actuellement la majorité des cas de CTS sont d'origine non-menstruels. La mortalité des CTS non-mentruels est plus élevée [105].

La TSST-1 est détectée dans moins de 50% des souches responsables de CTS non menstruel mais au moins une entérotoxine est retrouvée (enterotoxine B ou C) [105]. Les hémocultures sont parfois positives, ce qui n'est pas le cas lors de CTS menstruel. Le CTS non-menstruel s'associe donc à une infection focale et parfois à une bactériémie. Il est alors difficile d'attribuer l'intégralité des symptômes cliniques, et notamment l'état de choc, seulement à l'exotoxine superantigénique. Le CTS non-menstruel semblerait être une forme composite à la frontière entre le choc toxique et le choc septique [105]. La réponse pro-inflammatoire serait liée dans ces cas, non seulement à la toxémie mais aussi à la prolifération bactérienne et à la bactériémie [64].

Le traitement du choc toxique staphylococcique fait appel à l'antibiothérapie anti-staphylococcique classique mais également à des antibiotiques antitoxiniques comme le Linézolid ou la clindamycine [106].

2.2.3. *Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease* (NTED)

Le NTED est une maladie toxinique émergente du nouveau-né. Décrit pour la première fois au Japon en 1992, ce syndrome est dû à des souches de SARM productrices de TSST-1 [107, 108]. Cette maladie associe fièvre, thrombocytopénie et exanthème mais sans la survenue de choc ni de desquamation. Le NTED est plutôt de bon pronostic. Cependant certains nouveau-nés prématurés peuvent développer des complications et succomber à cette maladie [109]. Des épidémies dans des maternités ont été décrites au Japon [110]. L'incidence de cette maladie dans les services de soins intensifs de néonatalogie est passée de 25.7% en 1995 à 85.6% en 1999 [109]. Mimant le plus souvent une infection virale, les symptômes sont difficiles à reconnaître rendant difficile le diagnostic clinique. La recherche d'une expansion du répertoire Vβ2 peut être recherchée mais peut s'avérer négative en phase très précoce de l'infection [109, 111]. En phase très précoce de la maladie, Takahashi et al recomandent de rechercher les lymphocytes T positifs pour le Vβ2 exprimant un marqueur d'activation lymphocytaire : CD45RO. En effet, chez les

nouveau-nés, ce marqueur n'est normalement pas exprimé au niveau des lymphocytes T encore naïfs [109].

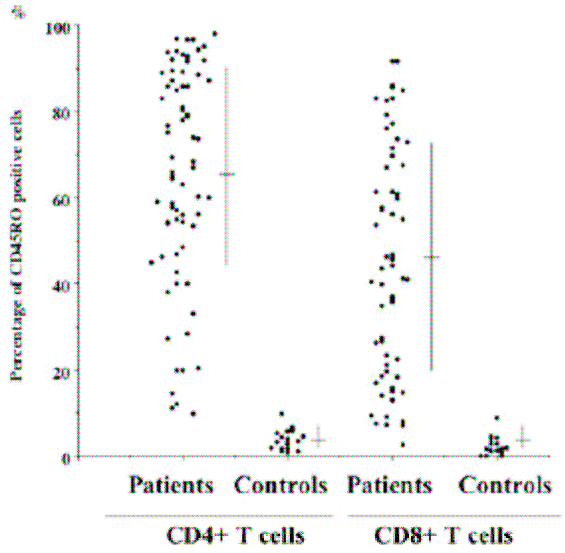


Figure 21. Pourcentage d'expression du marqueur CD45RO au niveau des cellules $CD4^+$ $V\beta\ 2^+$ et $CD8^+$ $V\beta\ 2^+$ chez des patients atteints de NTED d'après Takahashi et al [109].

2.2.4. La maladie de Kawasaki

Il existe un certain nombre de maladies de cause réputée inconnue, touchant en particulier les enfants pour lesquelles une activation polyclonale des lymphocytes, est observée. Cette activation polyclonale suggère l'intervention d'un superantigène. La maladie de Kawasaki possède des signes cliniques très proches de ceux du choc toxique staphylococcique. Des études ont démontré une expansion du répertoire Vβ2 chez les patient atteints de maladie de Kawasaki [112]. D'autres études ont montré l'association entre la survenue de la maladie de Kawasaki et la colonisation par une souche de *S. aureus* productrice de TSST-1[113].

2.3. Pneumonie nécrosante

La pneumonie nécrosante a été décrite pour la première fois en 2002 [114]. Ce syndrome est associé à des souches de *S. aureus* produisant la leucocidine de Panton et Valentine et survient chez l'adulte jeune (âge médian 14,8 ans), le plus

souvent en l'absence d'antécédents pathologiques. Exceptionnelle il y a quelques années, la pneumonie nécrosante est devenue une pathologie émergente. Bien que la prévalence des SARM dans cette entité clinique reste faible, la diffusion épidémique des clones SARM communautaires producteurs de PVL augmente le risque de survenue de pneumonie nécrosante staphylococcique [115]. Le début est brutal, mais souvent précédé de signes d'infection respiratoire d'allure virale. Les malades sont d'emblée en unité de soins intensifs avec des signes de détresse respiratoire et de choc. Survient une pneumonie sévère rapidement progressive avec détresse respiratoire, atteinte pleurale, leucopénie (<500 Giga éléments/L), hémoptysie. La radiographie pulmonaire montre des signes de pneumonie localisée ou diffuse sous forme d'infiltrats multinodulaires et/ou avec des signes d'épanchement pleural (Figure 22). Malgré une antibiothérapie adaptée 75% des patients décèdent dans un tableau de choc incontrôlable et d'hypoxémie réfractaire (médiane de survie de 4,3 jours). L'autopsie met en évidence des lésions de nécrose intéressant l'ensemble de l'épithélium bronchique, qui est recouvert d'un véritable tapis de cocci à Gram positif, alors que le parenchyme est le siège de lésions d'hémorragie alvéolaire massive avec une destruction des septums interalvéolaires [114].

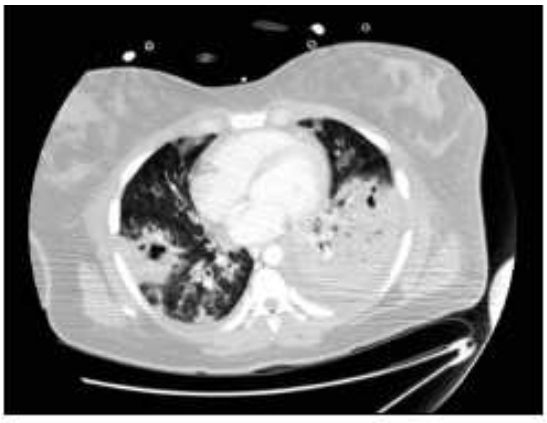


Figure 22. Imagerie (scanographie) d'un patient atteint de pneumonie nécrosante [115]

La physiopathologie de la pneumonie nécrosante fait intervenir différents facteurs de virulence:

(i) La leucocidine de Panton et Valentine. Elle serait responsable de la nécrose des septa alvéolaires et de la survenue d'hémorragie alvéolaire [45]. Les gènes de la PVL induiraient une surproduction de la protéine A, qui du fait de son action agoniste sur le TNFR-1 favoriserait le recrutement des polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire [116].

(ii) Des facteurs d'adhésion. Tristan et al ont montré que les souches PVL positives ont une adhésion significativement augmentée aux protéines de la matrice extracellulaire présentes au niveau du poumon [47]. L'infection virale qui précède la pneumonie favoriserait le contact entre *S. aureus* et la membrane basale de l'épithélium respiratoire en détruisant les cellules de l'épithélium respiratoire.

(iii) L'hémolysine alpha serait impliquée selon certains auteurs dans la physiopathologie de la pneumonie nécrosante [115]

Chapitre IV- L'émergence des SARM

S. aureus a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. La plasticité de son génome lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, notamment d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que d'établir des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotique [117].
Les premières souches résistantes à la pénicilline sont apparues les années suivant son introduction en thérapeutique en 1941, grâce à l'acquisition d'une bétalactamase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. La résistance à la pénicilline, à l'origine hospitalière, a très vite diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement 97% des souches de *S. aureus*. Pendant les années 1950 sont apparues des souches de *S. aureus* multirésistantes, car à la résistance à la pénicilline, était associée la résistance à la streptomycine, à l'érythromycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol ainsi qu'aux sulfamides. L'introduction en 1959 de la méticilline, dérivé hemi-synthétique de la pénicilline, pour le traitement des infections à staphyloccoques a soulevé un grand espoir. Mais à peine un an plus tard les premières souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont apparues dans un hôpital de Grande-Bretagne [117, 118].

1. Le gène *mec*A support de la résistance à la méticilline

Le temps zéro de l'évolution des SARM est l'acquisition du gène *mec*A, fragment d'ADN de 2.1 kb, codant une *protéine liant la pénicilline* additionnelle (PLP 2a)[119]. Cette transpeptidase PLP2a a une affinité faible vis-à-vis des bétalactamines. Le gène *mec*A confère donc la résistance à l'ensemble de la famille des bétalactamines, notamment à la méticilline ou oxacilline. Le gène *mec*A est inclus dans un élément génétique mobile: la cassette staphylococcique *mec* "*staphylococcal cassette chromosome mec*" (SCC*mec*). Cette cassette s'insère au niveau d'un site spécifique du chromosome: le site *att*B_{scc} (ou encore appelé ISS pour *integration site sequence*)

situé à l'extrémité 3' d'une séquence à cadre de lecture ouvert désignée sous le nom de *orf*X dont la fonction demeure inconnue. La séquence *orf*X est située près de l'origine de réplication du chromosome [15, 120]

2. La cassette de résistance à la méticilline SCC*mec*

La cassette SCC*mec* comporte deux éléments essentiels: le complexe du gène *mec*A et un complexe de gènes codant des recombinases *ccr* (*cassette chromosome recombinase*) assurant les phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette. Elle est dotée de séquences terminales répétées inversées et directes. La cassette SCC*mec* comporte également des éléments dits accessoires comme des séquences d'insertion (IS1272*,* IS431*)*, des transposons (Tn554 et ψTn554) ou des copies de plasmides (pUB110, pT181, pI258) portant des gènes de résistance à des métaux lourds ainsi qu'à des antibiotiques autres que les bétalactamines [15, 17, 120]. Ces éléments accessoires sont localisés dans trois régions dites régions J (*joining-region*) de la cassette SCC*mec* : J1 située entre l'extrémité droite de la cassette et le complexe *ccr*, J2 située entre le complexe *ccr* et le complexe *mec*, J3 située entre le complexe *mec* et l'extrémité gauche de la cassette.

2.1. Le complexe *mec*

2.1.1. Structure

Le complexe *mec* est constitué du gène *mec*A, d'une copie de la séquence d'insertion IS*431* et quand ils sont présents, des gènes régulateurs du gène *mec*A: *mec*I et *mec*R1. Ces gènes régulateurs peuvent être intacts ou tronqués. Les mutations survenant au niveau de ces gènes régulateurs peuvent affecter le niveau de résistance à la méticilline. A ce jour, cinq classes de complexe *mec* (A à E) ont été décrites chez les Staphylocoques (Figure 23)[121-123]. Cependant au sein de ces cinq classes de complexes, différents variants ont été décrits, la nouvelle nomenclature exige qu'ils soient désignés par un chiffre. Par exemple un variant du

complexe *mec* de classe B a été récemment décrit : B2. Ce complexe B2 posséde un transposon Tn4001 codant la résistance aux aminosides [124].

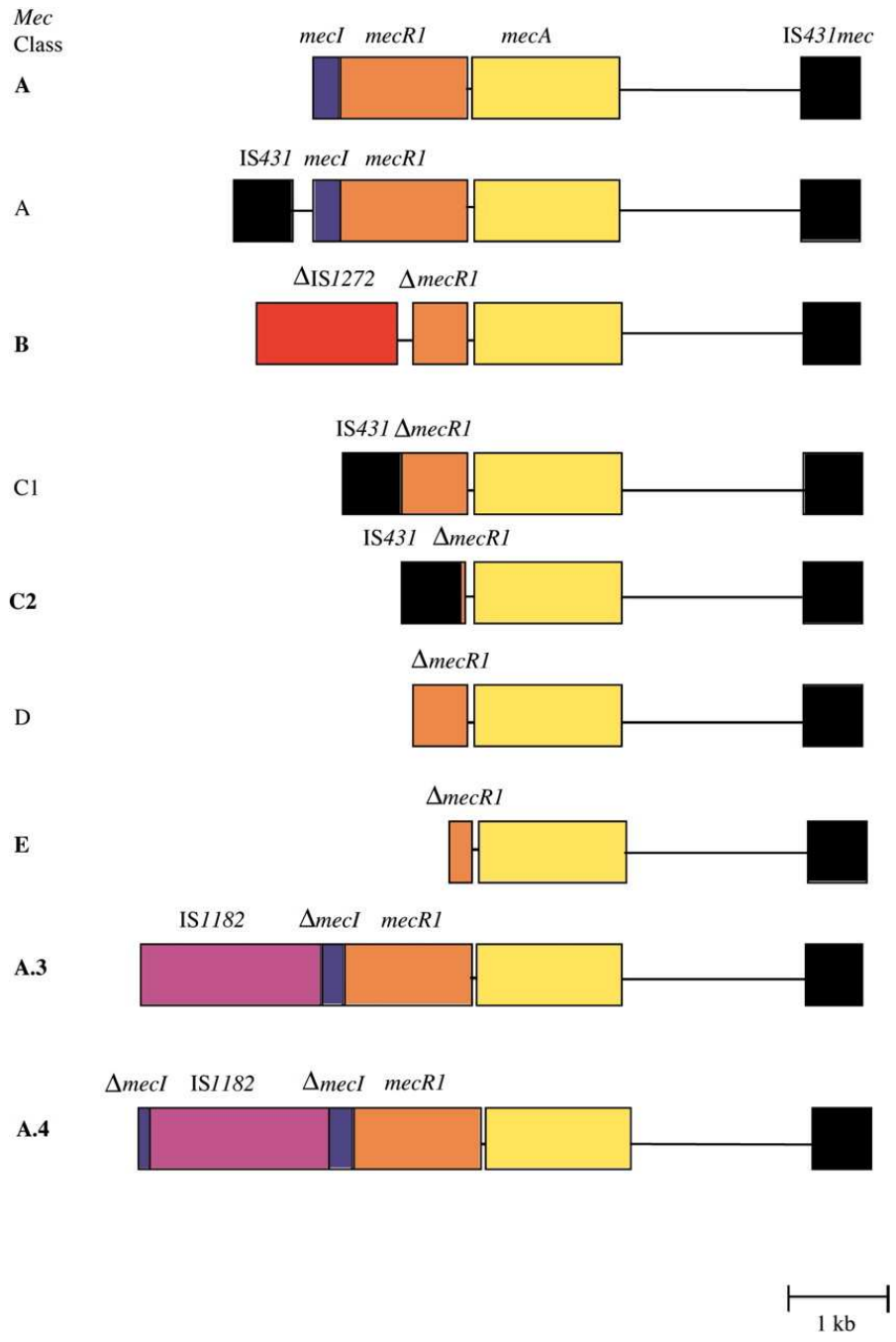


Figure 23. Organisation génétique des différents complexes *mec* chez les staphylocoques. D'après Shore et al. [121].

2.1.2. Rôle des gènes régulateurs *mec*I et *mec*RI

Le gène *mec*I code un régulateur transcriptionnel du gène *mec*A. Le gène *mec*R1 code une protéine transmembranaire de transduction de signal. La protéine *mec*R1 détecte la présence de bétalactamine grâce à son domaine extracellulaire. Elle se lie à l'antibiotique, ce qui entraîne l'activation de son domaine intracellulaire par protéolyse partielle. Un des fragments issus de la protéolyse vient réprimer le gène *mec*I empêchant ainsi la synthèse du répresseur. Le gène *mec*A n'est alors plus réprimé. A l'inverse en absence de bétalactamine, la protéine *mec*R1 n'est pas activée, le gène *mec*I est alors exprimé. Le répresseur est synthétisé et vient alors inhiber la transcription du gène *mec*A [125]. Le gène *mec*A est également régulé par le système *bla*I-*bla*R1 régulateur du gène *bla*Z situé sur un plasmide et codant la penicillinase. Il s'avère que la majorité des SARM ont un système *mec*I-*mec*R1 non fonctionnel, les gènes étant bien souvent mutés, délétés ou tronqués. Le système *bla*I-*bla*R1 prend alors le contrôle du gène *mec*A et la transcription de ce gène devient inductible [126].

2.2. Le complexe des gènes des recombinases

Le complexe des gènes des recombinases est constitué soit d'une paire de gènes, *ccr*A et *ccr*B combinés (4 allotypes décrits *ccr*AB1-4), soit d'un gène unique *ccr*C retrouvé au niveau de la cassette SCC*mec* de type V. Les recombinases sont responsables de la mobilité de la cassette. Les gènes *ccr* sont entourés de séquences à cadre de lecture ouvert (ORF) dont la plupart n'ont pas de fonctions identifiées [120].

Un groupe de travail international travaille actuellement sur la classification des cassettes SCC*mec*. Ce groupe a publié des recommandations concernant la nomenclature des recombinases. Un nouveau type de gène de recombinase *ccr* doit être défini sur la base d'une homologie nucléotidique ≤ 50%. Un nouvel allotype au sein d'un type *ccr* est défini sur la base d'un pourcentage de parenté oscillant entre 50% et 85%. Enfin les complexes des gènes *ccr* doivent être numérotés dans l'ordre chronologique de leur description. Cinq types de complexes de recombinases ont été jusque là identifiées [120](Tableau 4).

2.3. Les différents types SCC*mec*

La combinaison des différentes classes de complexe *mec* et des 5 types de complexes de recombinases permet de définir à ce jour 8 types de cassettes (I-VIII) Ces huit types diffèrent d'une part, par leur structure et leur taille (20 à 66 kb) et d'autre part, par leur répertoire de résistances aux antibiotiques [127] [122, 128-130].

Tableau 4. Les huit types SCC*mec* d'après la nouvelle classification et nomenclature établie par le groupe de travail IWG-SCC (International Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Element)[120]

Type SCC*mec*[1]	Complexe *mec*	Complexe des gènes de recombinases *ccr*	Taille(kb)
I (1B)	Classe B	1 (*ccr*A1B1)	34
II (2A)	Classe A	2 (*ccr*A2B2)	52
III (3A)	Classe A	3 (*ccr*A3B3)	66[2]
IV (2B)	Classe B	2 (*ccr*A2B2)	20 à 24
V (5C2)	Classe C2	5 (*ccr*C)	28
VI (4B)	Classe B	4 (*ccr*A4B4)	22
VII (5C1)	Classe C1	5 (*ccr*C)	33
VIII (4A)	Classe A	4 (*ccr*A4B4)	32

[1] Nomenclature des types SCC*mec*: chiffre romain suivi par le type de complexe de gènes de recombinases et le type de complexe *mec* entre parenthèses

[2] Le type SCC*mec* III a été révisé, initialement il avait été décrit comme étant le plus grand élement SCC*mec* (66 kb) mais il s'agit en fait d'un élément composite constitué d'une cassette SCC*mec* III et d'une cassette SCCHg. L'élement SCC*mec* III a donc une taille inférieure.

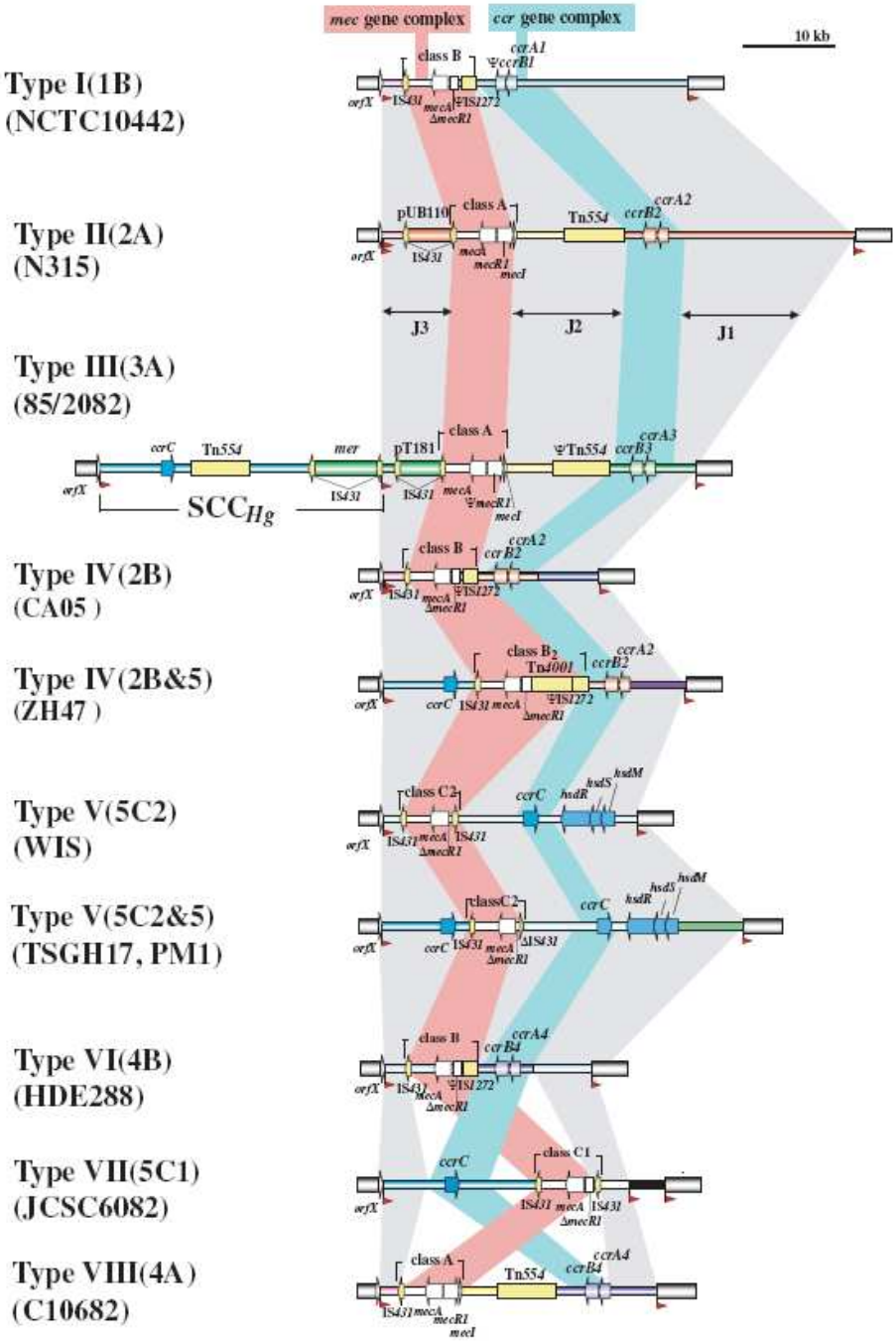


Figure 24. Organisation structurale des huit types SCC*mec*, d'après IWG-SCC [120]. L'organisation structurale de la cassette SCC*mec* est région accessoire J3 - complexe *mec* - région accessoire J2 - complexe *ccr* - région accessoire J1.

2.4. Les différents sous-types SCC*mec*

Des cassettes SCC*mec* ayant le même type de recombinase et le même type de complexe *mec* sont obligatoirement de même type SCC*mec* mais peuvent appartenir à des sous-types différents.

Les sous-types SCC*mec* sont définis à partir des régions accessoires J1, J2 et J3 comportant divers éléments génétiques mobiles véhiculant des gènes de résistance aux antibiotiques notamment :

(i) Plasmide PUB110 portant le gène *aad*D responsable de la résistance enzymatique à la kanamycine et à la tobramycine

(ii) Transposon Tn554 codant *erm*A responsable de la résistance constitutive aux macrolides

(iii) Transposon PT181 portant le gène *tet*K de résistance aux tétracyclines

A l'heure actuelle, la liste des nouveaux variants SCC*mec* ne cesse de s'allonger [120]. Plusieurs nomenclatures ont été employées pour désigner ces différents sous-types : (i) par des lettres minuscules (ii) par des lettres majuscules (iii) par 3 chiffres pour désigner le variant de chaque région J. Afin d'homogénéiser cette nomenclature un logiciel permettant d'assigner automatiquement un nom à un nouveau sous-type est en cours de développement (http://SCCmec.org)[120].

3. Autres éléments SCC

3.1. SCC non – *mec*

3.1.1. Définition

Des éléments génétiques SCC peuvent exister chez les staphylocoques indépendamment du gène *mec*A. En effet, ces cassettes SCC appelées SCC non-*mec* convoient d'autres gènes de résistance à des antibiotiques ou des gènes de facteurs de virulence [131]. Elles partagent des caractéristiques communes avec la cassette SCC*mec* notamment la présence de gènes de recombinases, la présence

de séquences inversées et répétées situées à l'extrémité de la cassette ainsi que le point d'insertion au niveau du chromosome bactérien, le site ISS [120].
La nouvelle nomenclature exige de nommer ces cassettes par le suffixe SCC suivi du nom du gène de facteur de virulence ou de résistance aux antibiotiques, convoyé par cette cassette. Si toutefois aucun gène n'est identifiable, il est alors recommandé de nommer cet élément SCC suivi du numéro de la souche dans laquelle il a été détecté [120].

3.1.2. Exemples

Différentes cassettes SCC non-*mec* ont été décrites comme SCC*cap*1, SCC*fur* ou SCCHg [1, 120, 131]. SCC*cap*1 contient le gène codant la capsule polysaccharidique de type 1. Cette capsule accroît la résistance à la phagocytose chez *S. aureus*. Toutefois SCC*cap*1 n'est pas mobilisable en raison de l'absence du gène *ccr*A et de la présence d'un gène *ccr*B défectif. SCC*fur* convoie le gène de résistance à l'acide fusidique. SCCHg convoie l'opéron responsable de la résistance au Mercure.

3.2. Pseudo –SCC éléments

Les pseudo-SCC éléments n'ont pas de gènes de recombinases. Ils sont parfois intégrés en tandem avec la SCC*mec*. L'élément ΨSCC ACME (*arginine catabolic mobile element*) a été identifié dans les souches de SARM communautaire américaines de type USA 300 [46]. Cet élément est très fréquent chez *S.epidermidis*. ACME porte deux clusters de gènes *Opp*-3 (oligopeptide permease operon) et *arc codant* une arginine désaminase. L'arginine désaminase a été identifiée chez *Streptococcus pyogenes* comme un facteur de virulence. ACME favoriserait la croissance et la survie de la bactérie au sein de l'hôte notamment en participant à la déplétion de la réponse immunitaire de l'hôte [46].

3.3. SCC composite

Récemment des cassettes SCC*mec* comportant deux complexes de gènes de recombinases ont été identifiés. Parmi ces SCC composites, une cassette dotée

d'une paire de gènes de recombinases *ccr*AB-2 et du gène *ccr*C, a été identifiée dans une souche de fond génétique ST100 isolée en Suisse ($MRSA_{ZH47}$) [124]. Une autre SCC composite possédant cette fois deux gènes *ccr*C a été détectée dans une souche de SARM communautaire de fond génétique ST59 isolée à Taiwan [132]. La SCC*mec* de type 3A détectée dans la souche HU25 est désormais considérée comme une SCC composite puisqu'elle comporte à la fois SCC*mec* III et SCCHg (cf Figure 24). On retrouve également des SCC composites chez les staphylocoques à coagulase négative. Un tel élément a été décrit dans la souche de *S. epidermidis* ATCC 12228 qui comporte deux paires de gènes recombinase (type 2 et type 4). Cette SCC composite contient un élément SCCpbp4 doté d'un gène homologue à celui codant la PLP4 [131, 133].

4. Hypothèses sur l'acquisition de la cassette SCC*mec*

L'origine de la cassette SCC*mec* demeure inconnue. Cependant différents indices comme la présence d'un gène *mec*A homologue chez *Staphylococcus sciuri* ou la présence de la séquence d'insertion IS1272 chez *Staphylococcus haemolyticus* retrouvée dans le type I et IV de SCC*mec* orientent vers la piste d'un échange horizontal entre *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative [134] [135, 136]. De nombreux exemples tendent à suggérer que les stapylocoques à coagulase négative transmettent le gène *mec*A à *S. aureus* [137, 138]. Ce type de phénomène a été observé chez un nouveau-né. Une souche de SASM épidémique et par la suite une souche de SARM de même profil en électrophorèse en champ pulsé ont été isolées chez ce patient. La souche de SARM hébergait une cassette SCC*mec* identique à celle retrouvée dans une souche de *S. épidermidis* isolé chez ce même patient mais différente de celles classiquement identifiées chez les SARM [139].
Jusqu'à aujourd'hui la cassette SCC*mec* n'a été retrouvée que dans le genre *Staphylococcus*. Cependant le séquençage d'une souche de *Macrococcus caseolyticus* résistante à la méticilline a révélé l'existence d'un complexe *mec*, *mec*IRA_m, qui pourrait être un précurseur de l'actuel complexe *mec* de *S. aureus* [140].

Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer l'origine des SARM. Kreiswirth et al ont proposé le modèle suivant lequel tous les SARM descendraient d'un ancêtre unique qui aurait acquis le gène *mec*A [141]. Ce scénario semble peu probable car à l'opposé d'autres études plus récentes tendent à montrer des divergences dans la population des SARM ce qui impliquerait un transfert horizontal du gène *mec*A entre différentes lignées [118].

Chapitre V - Les outils de description des SARM

La recrudescence d'infections dues à des SARM impose la caractérisation des souches ainsi que des investigations épidémiologiques. Pour ces applications, de nombreux outils sont à notre disposition. Ils autorisent soit un typage définitif soit un typage seulement comparatif et doivent répondre à un certain nombre de critères: typabilité, reproductibilité, stabilité, pouvoir discriminant, praticabilité ainsi que facilité d'interprétation ou lisiblité [142-145].

1. Outils de typage phénotypique

En raison de sa capacité de typage incomplète, de son faible pouvoir discriminant et de sa mauvaise reproductibilité, le typage phénotypique, ne constitue pas la meilleure approche pour les études épidémiologiques des SARM.
La lysotypie, longtemps utilisée, qui est basée sur la capacité ou la résistance d'une souche à être lysée par un phage, est aujourd'hui abandonnée [144].
L'antibiotypie exploitant les données de l'antibiogramme, présente de nombreux inconvénients: d'une part, l'influence des facteurs environnementaux, et d'autre part, l'acquisition de plasmide ou un réarrangement moléculaire, entraînent des variations de la susceptibilité aux antibiotiques chez une même souche [146]. Toutefois l'émergence d'un nouveau phénotype multirésistant constitue fréquemment un signal d'alerte suggérant la dissémination d'un clone épidémique. Blanc et al ont obtenu des résultats intéressants par l'analyse multivariée des diamètres d'inhibition de croissance chez *S. aureus* [147].
Le typage capsulaire est basé sur l'utilisation d'immunsérums dirigés contre les polysaccharides capsulaires exprimés par *S. aureus*, principalement les types 5 et 8 [24, 25].

2. Outils de typage moléculaire

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a constitué un véritable progrès pour le typage des SARM, permettant d'une part, de définir le fond génétique des souches et d'autre part, de caractériser les gènes accessoires comme le gène *mec*A.

2.1. Détermination du fond génétique

Pour l'épidémiologie locale ou dite à court terme, les techniques utilisées doivent être très discriminantes afin de pouvoir détecter des variations génétiques mineures. Par contre, dans le cadre de l'épidémiologie globale ou dite à long terme, comme l'étude de souches éloignées géographiquement ou les études phylogéniques, les techniques doivent pouvoir s'affranchir des variations génétiques mineures et ne détecter que les variations qui se sont accumulées lentement pendant l'évolution (Figure 25).

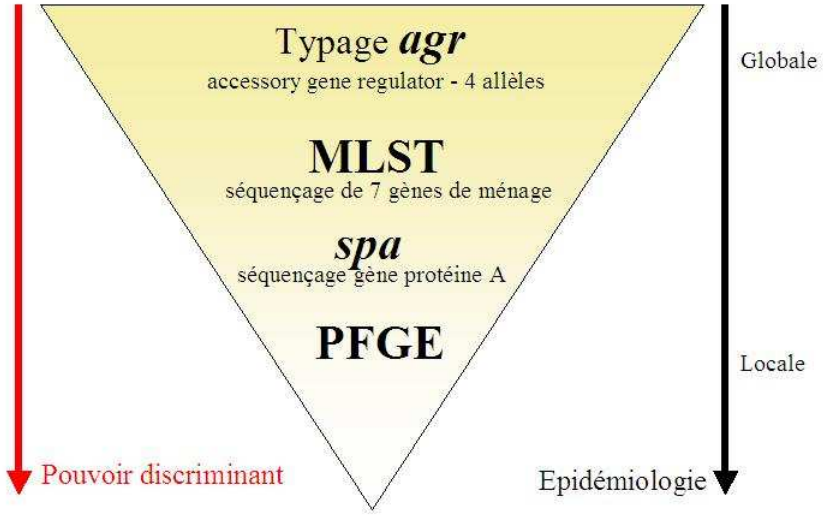


Figure 25. Pouvoir discriminant des outils moléculaires de description des SARM.

2.1.1. Electrophorèse en champs pulsés

L'ADN de *S. aureus* est extrait puis clivé par une endonucléase à sites de coupure rares (*Sma*I), générant ainsi un nombre limité de longs fragments d'ADN (10-800 Kb). Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse en champs pulsés (ECP), grâce à des champs électriques complexes qui empêchent la formation de structures et d'enroulements secondaires gênant la migration. Le profil de macrorestriction obtenu est appelé pulsotype. L'analyse des pulsotypes s'effectue par la construction de dendogramme suivant la méthode de groupement par la distance moyenne ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Matching Analysis*).

Très discriminante et très répandue, l'ECP constitue la méthode de référence dans l'investigation des épidémies locales ou à court terme bien que cette technique ait été employée avec succès pour typer des souches éloignées géographiquement [148]. Cependant, elle est jugée trop discriminante pour les études globales car elle détecte les variations génétiques survenues rapidement ainsi que les changements mineurs comme les mutations ponctuelles [149].

Enfin en l'absence de standardisation, les résultats demeurant seulement comparatifs ne sont pas échangeables entre les laboratoires [145]. Cependant le groupement européen HARMONY dont l'objectif est d'harmoniser les méthodes de typage des pathogènes nosocomiaux, ont mis au point un protocole standardisé d'ECP (http://www.phls.co.uk/International/Harmony/microtyping.htm) [150].

Aux Etats-Unis, le CDC a établi un nouveau système de nomenclature des souches de *S. aureus* basée sur les profils en ECP communément rencontrés parmi les souches américaines (Figure 26)[14]. Les différents pulsotypes correspondent à des types dits « USA » (USA100 à USA1200). Ces types USA concernent à la fois des souches de SASM et de SARM hormis les types USA 900 et USA 1200 qui ne concernent que des SASM.

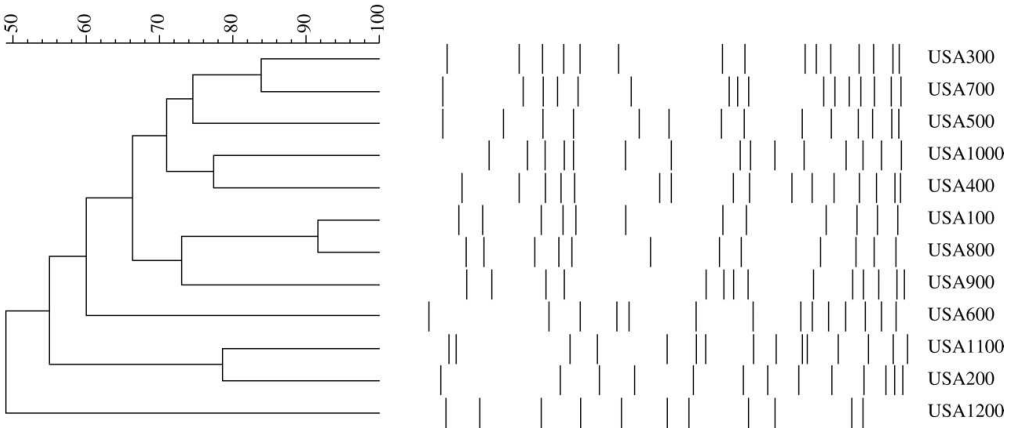


Figure 26. Dendogramme construit à partir des profils en ECP des différents types «USA». Les profils USA900 et USA1200 ne concernent que des SASM. D'après Tenover et al [14].

2.1.2. Le typage *agr*

Il existe une étroite relation entre le type *agr* et le fond génétique [151]. La détermination du type *agr* s'effectue grâce à l'utilisation d'amorces s'hybridant au niveau d'une région d'*agrC* spécifique à chacun des 4 groupes *agr*.

2.1.3. Le séquençage multilocus (Multi Locus Sequence Typing, MLST)

Le MLST est une technique dérivée de l'électrophorèse des isoenzymes, "*multi enzyme electrophoresis*" (MLEE). L'analyse de la mobilité des électromorphes est remplacée par celle du séquençage nucléotidique de fragments internes de 7 gènes de ménages (*arcC*, *aroE*, *glpF, gmk, pta, tpi, yqiL*) impliqués dans le métabolisme cellulaire de base et conservés au sein de *S. aureus* (Figure 27) [152]. Les variations de séquence sont nombreuses pour chacun des 7 gènes mais ne sont pas pondérées. Qu'elles proviennent d'une mutation ponctuelle ou d'une large recombinaison, chaque séquence différente constitue un allèle distinct désigné par un numéro arbitraire. Pour une souche donnée, la combinaison de 7 numéros constitue le profil allélique dit *"sequence type*" (ST) qui est désigné également par un numéro arbitraire. Les avantages du MLST par rapport aux techniques usuelles de

typage consistent en la précision et la reproductibilité des données du séquençage, et en l'accessibilité de celles-ci grâce à des bases de données disponibles via internet à l'adresse http://saureus.mlst.net. En travaillant sur des gènes de ménage, le MLST détecte les variations qui sont survenues lentement, ce qui en fait actuellement l'outil le plus performant pour l'épidémiologie globale et les études de phylogénie chez *S. aureus* [152, 153].

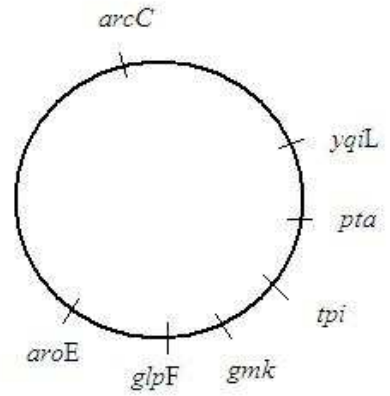


Figure 27. Disposition des 7 gènes de ménage séquencés en MLST sur le chromosome de *S. aureus* : *arcC* : carbamate kinase, *aroE* : shikimate déshydrogénase, *glpF* glycérol kinase, *gmk* guanylate kinase, *pta* : phosphate acétyltransférase, *tpi* : triosephosphate isomérase, *yqiL* : acétyl coenzyme A acétyltransférase.

Le MLST peut être étendu à des gènes codant des protéines de surface (*sas* gènes). Ces gènes ont la particularité d'être bien conservés au sein de l'espèce mais de suivre une évolution plus rapide que celle des gènes de ménage. Le séquençage conjoint de 7 gènes de ménage et de 7 gènes codant des protéines de surface aboutit à un MLST dit haute résolution, mis au point par l'équipe d'Enright et al et utilisé dans les études phylogéniques [154].

L'algorithme eBURST (Based upon related sequence types) développé par Ed Feil permet d'analyser les données issues du MLST [155]. Cet outil est disponible sur internet à l'adresse http://www.eburst.mlst.net. La finalité de cet algorithme est d'apporter une information sur l'évolution des souches et sur les relations phylogéniques qu'elles entretiennent entre elles, ce que les représentations

traditionnelles, comme le classique dendrogramme, n'offrent pas. Les souches possédant au moins 5 loci identiques sur 7 sont regroupées au sein d' un complexe clonal (CC). eBURST permet de prédire le *sequence type* (ST) du clone ancestral ainsi que d'établir le cheminement de l'évolution des clones au sein du complexe clonal. Le génotype ancestral est défini comme le génotype qui diffère, au niveau d'un seul locus sur 7, du plus grand nombre des autres génotypes appartenant au même complexe clonal.

Dans la représentation graphique les différents ST sont représentés par des points. Les ST sont reliés entre eux par un trait unique lorsqu'ils diffèrent par un seul allèle. Le nombre de traits représentent le nombre d'allèles différents. Les ST non affiliés à un complexe clonal sont dits «singletons» (Figure 26).

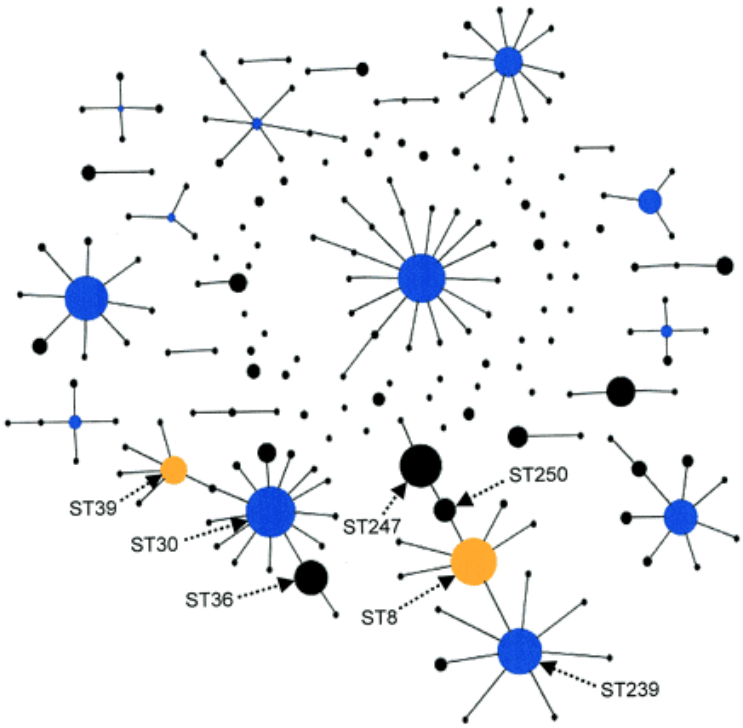


Figure 28. Représentation en "ciel étoilé" de la population de *S. aureus* par un diagramme eBURST d'après Feil et al [155]. Le clone ancestral (CA) est positionné au centre (ex ST8); le CA est relié par un trait aux clones qui ont un seul allèle de différence (ex ST250); le CA est relié par deux traits aux clones qui ont deux allèles de différence (ex ST 247).

2.1.4. Le séquençage de la région polymorphique du gène de la protéine A (s*pa typing*)

Cette technique est beaucoup plus simple que le MLST car elle est basée sur le séquençage d'un seul locus : la région variable dite région X du gène de la protéine A (*spa*). La région X située à l'extrémité 3' du gène codant la protéine A, est composée de séquences répétées en tandem (VNTRs) de 24 pb (voir exceptionnellement de 21 pb) [156].

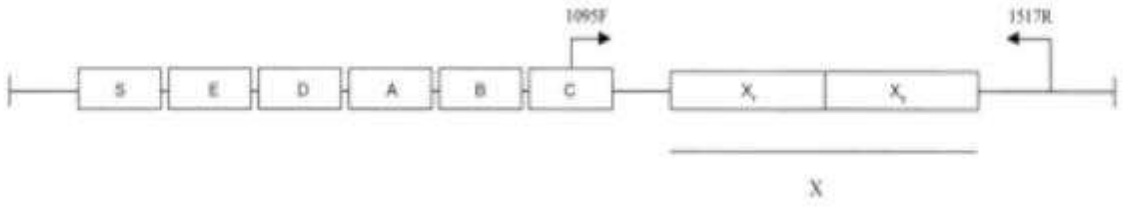


Figure 29. Séquençage du gène de la protéine A. Les amorces s'hybrident au niveau de séquences conservées encadrant une région variable dite région X.

Chaque séquence répétée diffère l'une de l'autre par une mutation ponctuelle. Ces différentes séquences autrefois désignées par une lettre (A à Z, A2, B2, *etc*.), sont maintenant désignés par un numéro (r01, r02, *etc*.). L'organisation de ces différentes séquences répétées au sein de la région X se traduit donc par une succession de chiffres (ou de lettres dans l'ancienne nomenclature). A chaque combinaison de chiffres est assigné un numéro de *spa type* (t001, t002 *etc*…). En pratique, les séquences sont analysées grâce au logiciel Ridom Staph Type software® (Ridom GmbH, Germany) qui assigne alors le type *spa*. La base de données est consultable sur le site internet: http://www.ridom.de/spaserver.

Le typage *spa* est une méthode très discriminante qui reflète à la fois les macro et les micro-variations génétiques dans la population de *S. aureus* [157]. Cependant, du fait d'une trop grande variabilité au niveau des types *spa*, elle était surtout utilisée à l'investigation d'épidémies à court terme [158].

L'algorithme BURP (*Based Upon Repeat Pattern*) a été développé pour analyser les données du *spa* typing [159, 160]. Dans la même logique que l'algorithme eBURST

pour les données du MLST, BURP permet de regrouper les *spa* types au sein de complexes clonaux et renseigne sur l'évolution clonale des souches de *S. aureus*. Il a élargi l'utilisation du spa typing aux études épidémiologiques globales ou à long terme [161].

La correspondance entre les données du typage *spa* et du MLST est excellente (97%). Cependant des rares cas des discordances ont été observés entre les données du typage *spa* et les données du MLST [161]. Ces discordances s'expliqueraient par la survenue de phénomènes de recombinaison intergénomiques comprenant le locus du gène de la protéine A au sein des lignées phylogéniques de SARM. Ce phénomène a notamment été décrit pour les lignées ST239 et ST34 [162].

Dans le cadre de la surveillance des SARM en Europe, un réseau européen (composé de 44 laboratoires dédiés à la médecine humaine ou vétérinaire) a élaboré une base de donnée SeqNet.org exploitant les données du *spa* typing (http://www.SeqNet.org) [163].

2.2. Détermination des gènes accessoires par PCR

2.2.1. Typage de la cassette staphylococcique SCC*mec*

La caractérisation complète des SARM requiert non seulement l'identification du fond génétique mais aussi la caractérisation de la cassette SCC*mec.*

Différentes techniques de typage SCC*mec* sont disponibles mais en raison de l'émergence constante de nouveaux variants elles peuvent échouer. Le choix de la stratégie doit être orienté en fonction de l'objectif de l'étude notamment s'il s'agit d'une surveillance globale ou locale des SARM [1].

Le séquençage *ccr*B est basée sur le séquençage d'un fragment du gène de recombinase *ccr*B [164]. Ce séquençage s'intègre facilement aux protocoles de séquençage du *spa* et du MLST. Une base de donnée des séquences est disponible sur internet pour déposer et consulter les séquences *ccr*B (http://ccrbtyping.net) [165]. Cet outil permet d'étudier l'évolution des cassettes SCC*mec* au sein de la population de SARM mais également des staphylocoques à coagulase négative.

La PCR multiplex de Milheiro et al utilise 20 amorces venant s'hybrider au niveau de loci spécifiques à chaque type de cassette (loci dispersés dans toute la cassette y compris dans les régions J accessoires)[166]. Elle est basée sur un profil de bandes spécifique à chaque type de cassette (2 à 5 bandes). Cette technique est pratique mais facilement mise en échec par la survenue de nouveaux variants. D'ailleurs elle se limite à la caractérisation des cassettes I à VI. Elle peut être complétée par une PCR dédiée à l'identification des sous-types au sein du type IV basée sur les variations de la région J1[167].

La PCR multiplex de Kondo utilise 6 jeux d'amorces dont l'un sert à la caractérisation du complexe *mec* et l'autre à la caractérisation du complexe *ccr*. Bien qu'étant assez fastidieuse, cette technique a l'avantage d'être informative sur le type de complexe *mec* et sur le type de recombinases [168].

Par ailleurs Chen et al ont récemment développé une technique rapide de typage SCC*mec* en PCR en temps réel [169].

2.2.2. Toxinotypie

Les facteurs de virulence peuvent être considérés comme des produits de gènes accessoires, non indispensables pour la croissance ou la division cellulaire, mais qui confèrent un avantage sélectif dans certains environnements. La plupart de ces produits sont codés par des éléments génétiques mobiles. La détermination de l'habillage toxinique comporte la recherche des gènes d'entérotoxines, de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), des exfoliatines ETA, ETB et ETD, des hémolysines β, γ et γ variant, des leucocidines LuE-LukD et LukM et de la leucocidine de Panton-Valentine

Chapitre VI - Evolution moléculaire des SARM

1. Un nombre limité de clones pandémiques de SARM nosocomiaux

1.1. Historique

1.1.1. Données de l'électrophorèse en champ pulsé

Dans le cadre de la surveillance internationale des SARM menée par le CEM/NET (*Center for molecular Epidemiology and International Network*), Oliveira et *al* ont analysé par ECP et par l'étude du polymorphisme de restriction du gène *mec*A et du transposon Tn*554,* près de 3000 souches isolées de différents pays [170].
Cinq types clonaux ont pu être individualisés sur la base de leur pulsotype: le clone Ibérique, le clone Brésilien, le clone Hongrois, le clone New York/Japon et le clone Pédiatrique. Ces différents clones représentaient 70% de l'ensemble des souches de SARM étudiées [170].

1.1.2. Données du MLST

Le pulsotype est un marqueur très discriminant et qui donne une vision détaillée du fond génétique pouvant masquer la similarité entre deux clones qui sont temporellement ou géographiquement éloignés. Afin d'avoir une vision plus globale du fond génétique des 5 clones pandémiques précédemment identifiés, le séquençage multilocus (MLST) a été réalisé. Les données du MLST ont permis d'identifier deux fonds génétiques : (i) le fond génétique ST5 commun aux clones New York/Japon et Pédiatrique, (ii) le fond génétique commun aux clones Brésilien et Hongrois (ST 239) mais aussi commun au clone Ibérique (ST247) qui ne différait que par deux allèles [170].
Dans le même esprit, l'application du MLST à des clones de SARM épidémiques (EMRSA), jusque là individualisés sur la base de leur pulsotype, a permis de

regrouper certains d'entre eux. Ainsi les clones EMRSA-2,-6,-7,-12,-13 et 14 ont été réunis au sein du même *sequence type*, ST8 [118].

L'approche par MLST a ainsi révélé l'existence d'un nombre limité de clones pandémiques de SARM, démontrant ainsi la structure très clonale de la population des SARM nosocomiaux. Par opposition, l'application du MLST à des souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) a révélé une grande diversité allélique [152].

1.2. Identification de cinq lignées phylogéniques de SARM

Afin d'établir la relation phylogénique entre les différents clones de SARM et de découvrir leurs ancêtres, Enright et al ont appliqué l'algorithme BURST (ancienne version du eBURST) à un grand nombre de souches de SASM et de SARM, préalablement analysées par MLST [118]. Les souches possédant au moins 5 loci identiques sur 7 en MLST, ont été regroupées au sein d'un même complexe clonal (CC). La majorité des SARM était répartie au sein de 5 complexes clonaux qu'Enright et al ont assimilés à cinq grandes lignées phylogéniques (Tableau 5) :

(i) Complexe clonal CC5 comprenant les clones Pédiatrique et NewYork/Japon

(ii) Complexe clonal CC22 représenté par le clone épidémique EMRSA-15 isolé en Allemagne

(iii) Complexe clonal CC30 représenté par le clone EMRSA-16 (ST36) isolé en Angleterre

(iv) Complexe clonal CC45 représenté par le clone Berlin

(v) Complexe clonal CC8 regroupant les clones Ibérique, Brésilien et Hongrois, ainsi que le clone V (type USA500), clone épidémique isolé aux Etats-Unis. Le complexe CC8 comprend également le clone Archaïque correspondant aux premières souches de SARM isolées en 1961 au Danemark et en Angleterre [117, 171]. Les équipes de Crisostomo et d'Enright ont essayé de retracer l'évolution des SARM au sein de ce complexe clonal CC8. Un clone de SASM épidémique isolé au Danemark dans les années 1950 possédait le même *sequence type* (ST250) et le même antibiogramme (hormis la résistance à la méticilline) que les

premières souches de SARM isolées en 1961 (résistant à la pénicilline, streptomycine et à la tétracycline)[171]. Le tout premier clone de SARM (clone Archaïque) serait donc issu de ce clone de SASM ST250 qui aurait acquis la cassette SCC*mec* de type I (Figure 30) [118].

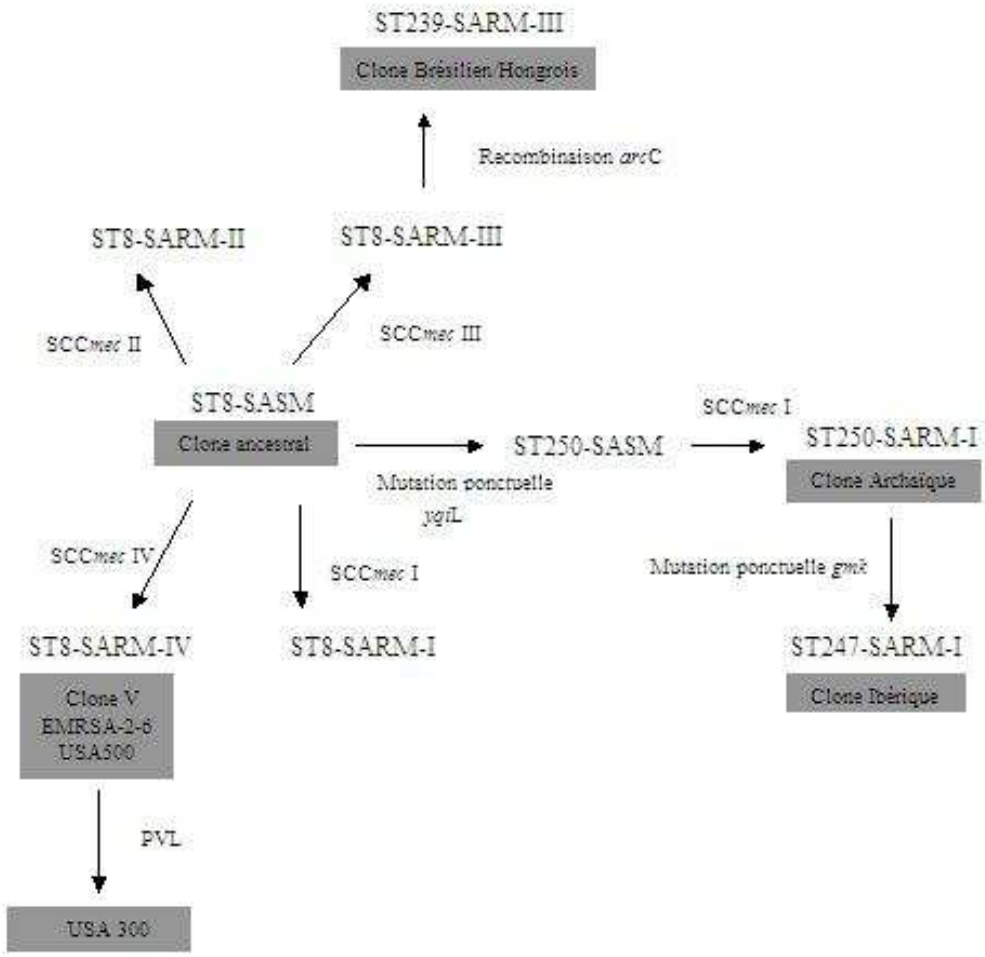


Figure 30. Origine et évolution des clones de SARM au sein du complexe clonal CC8. Les clones Archaïque, Brésilien, Hongrois, Ibérique, le clone V et le clone de SARM communautaire américain USA 300 appartiennent à ce complexe clonal [14, 118].

Tableau 5. Les clones pandémiques de SARM nosocomiaux. D'après Deurenberg et al [172].

Clone	MLST profile	ST	CC	SCC*mec*	*spa* type[a]	Geographical spread[b]
Archaic	3-3-1-1-4-4-16	250	8	I	**t008**, t009, t194	Ast, Den, Ger, Swi, Uga, UK, USA
Southern Germany	1-4-1-4-12-24-29	228	5	I	**t001**, t023, t041, t188, t201	Bel, Den, Ger, Ita, Slo, Spa, Swi
UK EMRSA-3	1-4-1-4-12-1-10	5	5	I	**t001**, **t002**, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Arg, Nor, Pol, Slo, UK
Iberian	3-3-1-12-4-4-16	247	8	I	**t008**, **t051**, t052, t054, t200	Bel, Cro, Cze, Den, Fin, Fra, Ger, Ita, Net, Pol, Po Slo, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Irish-1	3-3-1-1-4-4-3	8	8	II	**t008**, t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Ire, UK, USA
New York/Japan	1-4-1-4-12-1-10	5	5	II	**t001**, **t002**, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Fra, Ger, Ire, Jap, Kor, Mex, Sin, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-16	2-2-2-2-3-3-2	36	36	II	**t018**, t253, t418, t419	Ast, Bel, Can, Den, Fin, Gre, Ire, Mex, Nor, Spa, Swe, Swi, UK, USA
Brazilian/Hungarian	2-3-1-1-4-4-3	239	8	III	t030, **t037**, t234, t387, t388	Alg, Arg, Ast, Aus, Bra, Chi, Chn, Cze, Fin, Ger, Gre, Ind, Ids, Kor, Mon, Net, Pol, Por, Sin, Slo, Spa, Sri, Swe, Tha, UK, Uru, USA, Vie
Berlin	10-14-8-6-10-3-2	45	45	IV	**t004**, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t230, t390	Arm, Ast, Bel, Fin, Ger, Hun, Net, Nor, Spa, Swe, Swi, USA
Paediatric	1-4-1-4-12-1-10	5	5	IV	**t001**, **t002**, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alg, Arg, Ast, Bra, Col, Den, Fra, Kor, Nor, Pol, Por, Spa, Swe, Uru, UK, USA
UK EMRSA-2/-6	3-3-1-1-4-4-3	8	8	IV	**t008**, t024, t064, t190, t206, t211	Ast, Bel, Fin, Fra, Ger, Ire, Net, Nor, Tai, UK, USA
UK EMRSA-15	7-6-1-5-8-8-6	22	22	IV	t005, t022, **t032**, t223, t309, t310, t417, t420	Ast, Bel, Cze, Den, Ger, Ire, Kuw, NZ, Nor, Por, Sin, Spa, Swe, UK

Le clone UK EMRSA-16 est de séquence type ST36 mais appartient au CC30.

2. Emergence des SARM à plusieurs reprises dans une lignée phylogénique donnée

L'étude de ces lignées phylogéniques de SARM a permis de mettre en évidence deux phénomènes. Tout d'abord, une même lignée phylogénique peut avoir différents types de cassette SCC*mec*. Par exemple la lignée de *sequence type* ST5 a pu acquérir 4 types de cassette. Dans cette lignée nous retrouvons le clone NewYork/Japon doté de la cassette SCC*mec* de type II et le clone Pédiatrique doté du type IV (Figure 31)[118].

Par ailleurs, un même type de cassette est retrouvé au niveau de fonds génétiques différents. Par exemple la cassette SCC*mec* de type II est commune au clone New York/Japon de *sequence type* ST5 et au clone EMRSA-16 de *sequence type* ST36.

Ces faits suggèrent, soit l'acquisition indépendante de la cassette SCC*mec* par ces deux lignées, soit un transfert horizontal de la cassette entre ces deux lignées [117].
Ainsi le type SCC*mec* IV est retrouvé au niveau de trois fonds génétiques différents, ainsi que chez les SARM communautaires. La mobilité accrue de ce type de cassette peut s'expliquer d'une part, par sa petite taille et d'autre part, par l'absence de gènes superflus (notamment l'absence d'autres gènes de résistance)[173].
Au total, ces données viennent réfuter l'hypothèse selon laquelle tous les SARM descendraient d'un ancêtre commun [118]. La diffusion mondiale de SARM semble due à la dissémination d'un petit nombre de clones pandémiques dans lesquels l'élément SCC*mec* a trouvé un fond génétique doté d'un bon «fitness» pour la virulence et la diffusion épidémique [170, 174].

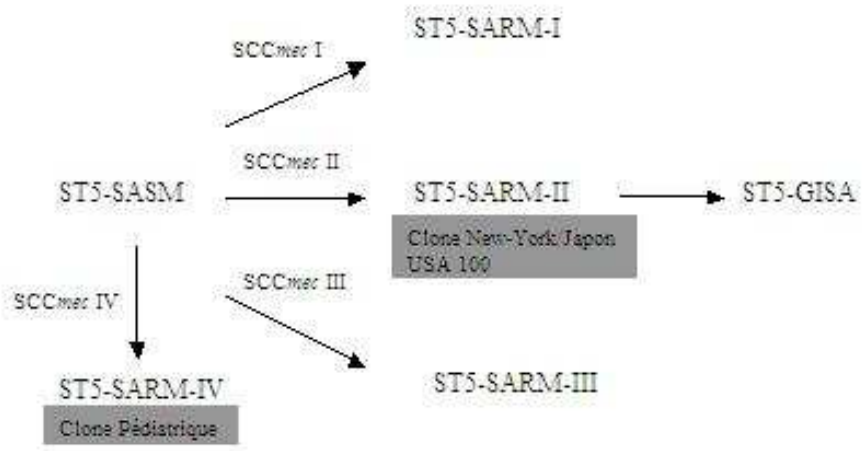


Figure 31. Origine et évolution des SARM au sein du complexe clonal CC5 [118].

3. Facteurs limitant le phénomène d'acquisition de la cassette SCC*mec*

D'après Katayama et al, tous les fonds génétiques de *S. aureus* ne sont pas disposés à recevoir, ni à maintenir la cassette SCC*mec* [175]. Certains fonds génétiques posséderaient une barrière naturelle empêchant l'insertion de la cassette SCC*mec* [176]. Le mécanisme et la base génétique de cette barrière ne sont pas élucidés à ce jour mais son existence contribue certainement à la limitation du

nombre de lignées de SARM. D'après Lindsay et al, le système de restriction-modification Sau1 pourrait être impliqué dans ce phénomène en bloquant le transfert horizontal de la cassette SCC*mec* [177]. D'après d'autres auteurs, le site d'insertion de la cassette sur le chromosome est un lieu de prédilection pour l'insertion d'éléments génétiques mobiles, en particulier ceux codant pour la résistance aux antibiotiques. Ce site pourrait être alors occupé par d'autres éléments que la cassette SCC*mec* empêchant ainsi l'insertion de cette dernière [178].

4. Dynamique évolutive et dissémination des clones de SARM hospitaliers

Les SARM sont vite devenus une des premières causes d'infections nosocomiales dans les hôpitaux du monde entier (figure 32).

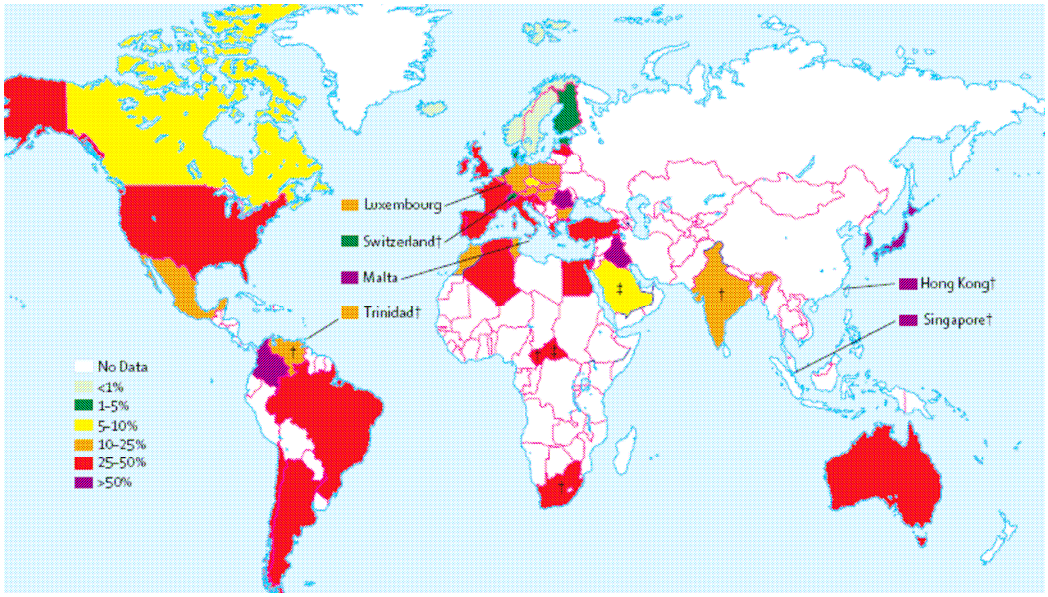


Figure 32. Prévalence par pays des SARM hospitaliers. D'après Grundmann et al **[179]**.

L'épidémiologie des SARM hospitaliers est en perpétuelle évolution. Dans une zone géographique donnée les clones de SARM émergent, diffusent puis disparaissent et sont remplacés par d'autres. Ce phénomène de remplacement des clones par vagues épidémiques a été bien documenté en Grèce, en Hongrie, en France, au

Royaume Unis ou encore en Italie (Figure 33)[174, 180-183]. Ainsi le clone Ibérique résistant à la gentamicine a occupé les hôpitaux français jusqu'en 1992 puis a été remplacé par le clone Lyon [184]. La diminution de la pression antibiotique avec la baisse de l'utilisation thérapeutique de la gentamicine a dû contribuer à ce phénomène [185].

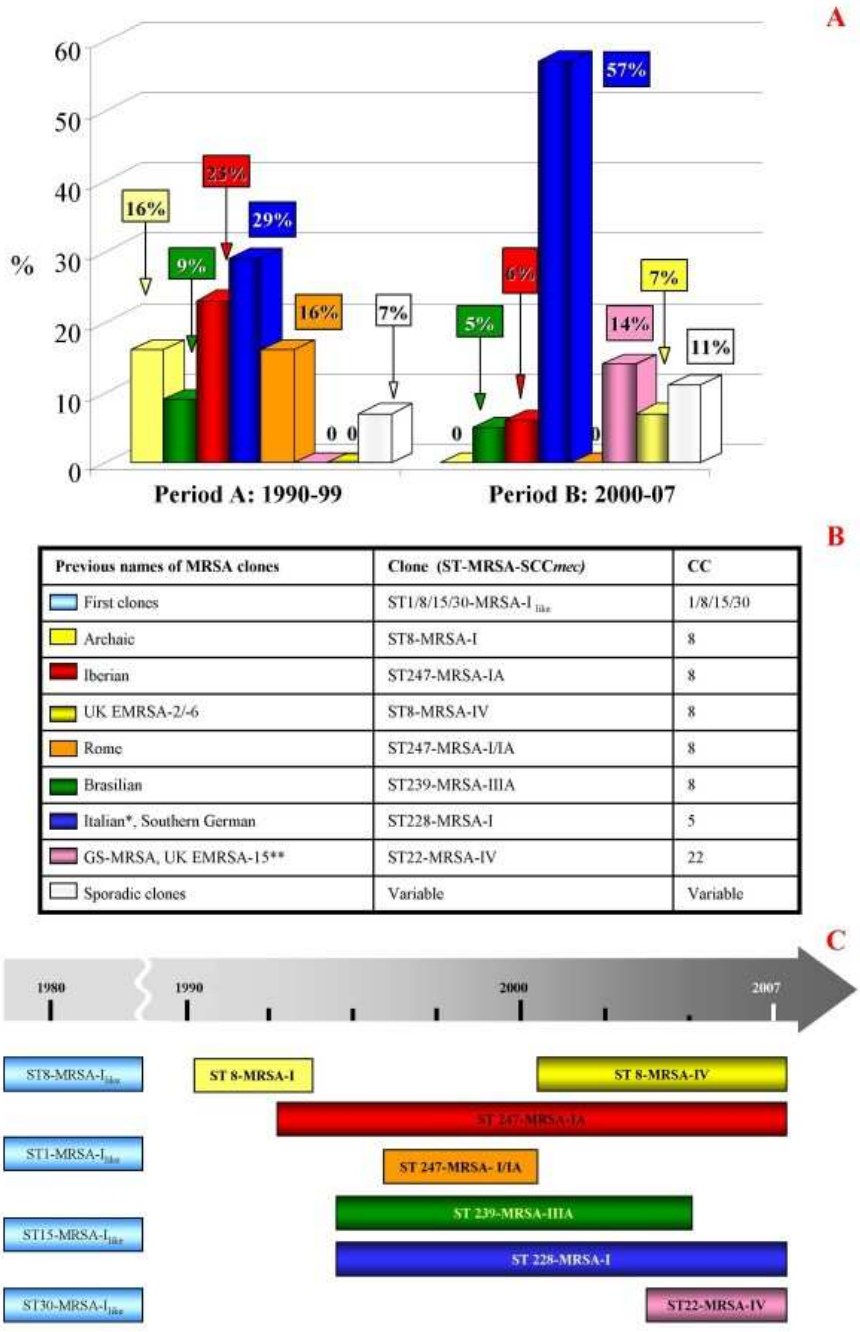


Figure 33. Succesion des clones hospitaliers en Italie. D'après Campanile et al [182].

5. Emergence des SARM résistants à la vancomycine

Les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) sont une famille d'antibiotiques à disposition depuis une quarantaine d'années; cette famille constitue la référence pour le traitement des infections à SARM. Hiramatsu et al ont isolé au Japon la première souche de sensibilité diminuée à la vancomycine (Souche Mu50) [2]. La détection de souches de *S. aureus,* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ou (VISA pour *vancomycin intermediate S. aureus*) a été rapportée un peu partout dans le monde. Ces souches présentent un épaississement de leur paroi dont le déterminsme génétique reste à élucider [21]. L'expression de cette résistance peut être hétérogène (hétéro-VISA). L'emergence de la résistance à la vancomycine constitue une menace certaine. Elle se propage parmi les souches de SARM, d'ailleurs certaines souches VISA ont été détectées parmi des isolats cliniques du clone de SARM communautaire USA300 [14]. La résistance aux glycopeptides concerne surtout les souches de SARM soumises à une exposition prolongée à la vancomycine comme dans le cas des infections osseuses. Cette résistance réduit considérablement les possibilités thérapeutiques des SARM.

Par ailleurs des souches résistantes à la vancomycine (VRSA) par acquisition du gène *van*A des entérocoques, ont été isolées aux Etats-Unis. Heureusement ces cas restent rares, au total neuf souches ont été détectées [186]. Des recherches ont montré qu'un peptide secrété par *S. aureus,* staph-cAM373, aurait une action de phéromone et stimulerait le transfert conjuguatif de plasmide provenant d'*Enterococcus faecalis*. Ce phénomène contribuerait à l'acquisition du plasmide portant le gène Van A des entérocoques [187].

L'analyse par MLST et typage de la cassette SCC*mec* des premières souches GISA isolées, de la souche japonaise Mu50 et des deux premières souches de VRSA isolées aux Etats-Unis ont révélé leur émergence au niveau du *sequence type* ST5 (Figure 29)[118].

6. Les SARM communautaires

6.1. Emergence

Les SARM d'acquistion communautaires peuvent avoir deux origines distinctes : soit (i) il s'agit d'une dissémination des SARM nosocomiaux hors de l'environnement hospitalier, notamment par les transferts de service de patients colonisés et par l'augmentation des soins à domicile, soit (ii) il s'agit de l'émergence d'un clone distinct, "natif" strictement du milieu communautaire, en dehors de tout lien avec l'hôpital [188, 189].

Les infections dues à des SARM nosocomiaux, en milieu communautaire surviennent principalement chez des patients ayant des facteurs de risque comme le port d'un cathéter au long cours, des hémodialyses ou des antécédents d'hospitalisation. Ces SARM nosocomiaux d'acquisition communautaire sont isolés dans une population plutôt agée mais peuvent diffuser dans l'entourage de ces patients.

Les premiers cas d'infections communautaires chez des patients en dehors de tout lien avec l'hôpital ont été décrits chez les aborigènes du Nord-ouest de l'Australie dans les années 1980 [190](Figure 34). Parallèlement, aux Etats Unis, des cas d'infections communautaires à SARM ont été observés, notamment lors de l'épidémie de Détroit qui concernait majoritairement des toxicomanes par voie intraveineuse [191]. En 1997, un programme de surveillance des infections à SARM, supposées être d'acquisition communautaire, a été établi dans les états du Minnesota et du Dakota du Nord. Trois cents cas d'infections cutanées à SARM vraisemblablement communautaires ont été rapportés en deux ans. Quatre décès sont survenus chez des enfants *à priori* sans aucun facteur de risque d'acquisition d'un SARM [192] Le typage des souches par ECP a révélé que les souches incriminées étaient épidémiologiquement reliées mais différentes des souches de SARM hospitaliers diffusant habituellement dans ces états [193]. A la suite de cette investigation, une étude concernant des souches de *S. aureus* isolées de la communauté indienne rurale à laquelle appartenaient ces quatre enfants a été menée. Elle a montré d'une part la forte prévalence de souches de SARM parmi

cette communauté et d'autre part que ces souches étaient clonales [194, 195]. D'autres cas d'épidémies communautaires d'infections à SARM ont ensuite été rapportés concernant des communautés spécifiques comme les équipes sportives, la population carcérale, les camps militaires [115, 196-198]. Ces communautés fermées se caractérisent par la promiscuité et souvent par des défauts d'hygiène. Enfin, des cas de pneumonies nécrosantes à SARM ont été rapportés en France et aux Etats-Unis chez des enfants ou des sujets jeunes dépourvus de tout facteur de risque [114, 115].

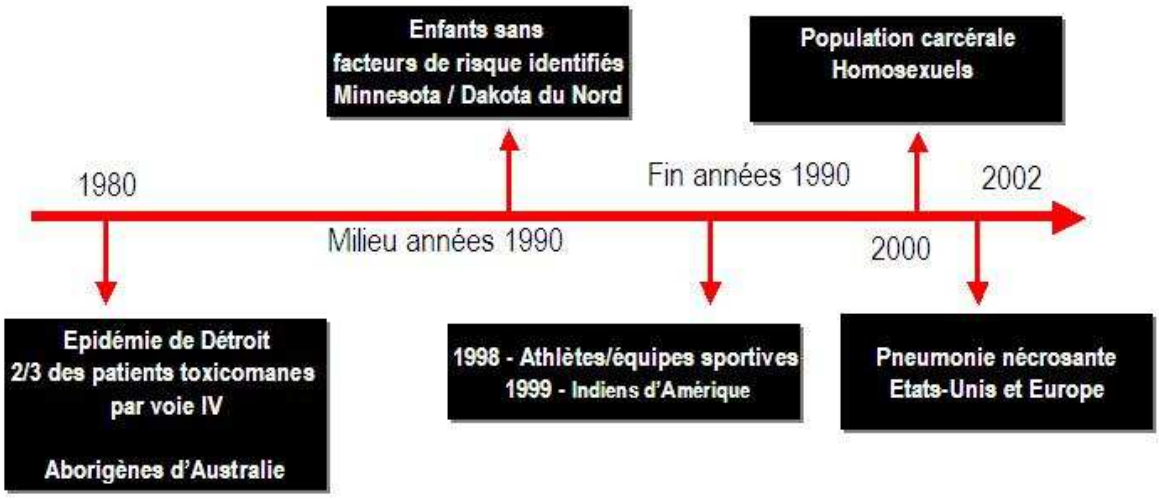


Figure 34. Emergence des SARM communautaires.

6.2. Epidémiologie

Les vrais SARM d'acquisition communautaire (SARM-C) qui ont été caractérisés à ce jour portent une cassette SCC*mec* type IV ou V et sont fortement associés aux gènes codant la leucocidine de Panton-Valentine, alors que le fond génétique et la distribution des autres gènes est spécifique à chaque continent [199]. Il n'y a pas de restriction à un fond génétique particulier puisque l'on retrouve les SARM-C dans 3 des 4 types *agr*. Contrairement aux SARM hospitaliers les SARM-C se caractérisent donc par une diversité clonale [199].

Les SARM-C sont majoritairement responsables d'infections suppuratives de la peau et des tissus mous parfois sévères comme des fasciites nécrosantes [84] [115]. Ils sont également impliqués dans des cas de pneumonies nécrosantes.

En Europe, le clone prédominant est le clone de SARM-C ST 80 dit clone Européen. Il possède une cassette SCC*mec* de type IV et son profil de résistance aux antibiotiques est caractéristique: pénicilline, oxacilline, kanamycine, tétracycline et acide fusidique. En fait ce clone est doté d'un plasmide pUB102 qui porte les gènes : *far*1 (codant la résistance à l'acide fusidique), *tet*K (codant la résistance aux tétracyclines) et *bla*Z (codant la pénicillinase) [200]. Les SARM-C des autres continents avaient été initialement décrits comme n'ayant pas de résistances associées. Cependant la tendance semble s'inverser notamment avec le clone américain de SARM-C USA 300 qui s'avère être de plus en plus résistant [14].

On assiste aujourd'hui à des échanges intercontinentaux des différents clones. Le clone ST8 (USA300) diffuse en Europe, en Australie, en océanie, en Asie [14]. Le clone ST59 diffuse depuis les Etats-Unis vers l'Asie [132, 199]. Enfin le clone Européen ST80 diffuse vers l'Asie. Ces échanges intercontinentaux semblent beaucoup plus rapides que ceux des SARM hospitaliers. Les SARM hospitaliers diffusent en effet lors du déplacement du patient d'un service à l'autre. En revanche, les SARM-C diffusent eux, d'un continent à l'autre très rapidement probablement *via* les moyens de transport, ce qui explique que les grands carrefours d'échanges internationaux, comme l'Asie, soient particulièrement touchés [199].

Le clone ST80 a diffusé vers le Nord de l'Europe qui était jusque là épargné et qui présente le plus bas taux de SARM hospitaliers (<1%)[179]. Les données du réseau de surveillance SeqNet.org le classe à la 7ème place des clones les plus fréquemment détectés en Europe [163]. Enfin certains clones apparaissent d'emblée multicontinentaux comme le clone ST377, porteur de la cassette SCC*mec*V, retrouvé en Europe mais également en Australie [201].

Les SARM-C peuvent également diffuser en milieu hospitalier. Le clone ST80 est d'ailleurs endémique dans les hôpitaux d'Alger [202]. Ce même phénomène est observé avec le clone de SARM-C USA300 qui envahit les hôpitaux américains [14].

2EME PARTIE : ARTICLES DE REVUE

SARM: données épidémiologiques récentes et évolution de la résistance

Anne Tristan, **Géraldine Durand**, François Durupt, Tristan Ferry, Michèle Bes, Marie-Elisabeth Reverdy, Hélène Meugnier, François Vandenesch, Jerome Etienne

Revue Française des Laboratoire 2005; 376:75-79

SARM : DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES RÉCENTES ET ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE

Anne Tristan [a], Géraldine Durand [a], François Durupt [a], Tristan Ferry [a], Michèle Bes [a], Marie-Elisabeth Reverdy [a], Hélène Meugnier [a], François Vandenesch [a], Jérôme Etienne [a,*]

Résumé

Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont responsables d'environ 30 % des infections nosocomiales. Les SARM diffusent de façon épidémique et il existe un clone majoritaire français dont les caractéristiques moléculaires sont proches du clone V. D'autres clones de SARM hospitaliers peuvent être plus rarement isolés comme le clone ibérique correspondant aux souches résistantes à la gentamicine ou des souches proches du clone pédiatrique. Les SARM hospitaliers sont aussi responsables d'infections communautaires chez des patients ayant des facteurs de risque comme des antécédents d'hospitalisation. Les vraies infections communautaires à SARM surviennent chez des patients jeunes et sont dues à des souches contenant principalement la leucocidine de Panton Valentine. Ces souches sont surtout responsables d'infections cutanées suppuratives et parfois de pneumonies nécrosantes.

***Staphylococcus aureus* – infections communautaires – résistance à la méticilline.**

Summary : The epidemiology and evolution of MRSA clones

Methicillin resistant Staphylococcus aureus *(MRSA) are responsible for 30% of the hospital-acquired infections in France. A major epidemic clone is detected throughout France and is related by its molecular characteristics to the pandemic clone V. Minor hospital-acquired MRSA clones are also recovered in France, such as the Iberic clone corresponding to the gentamicin-resistant strains, or the Pediatric clone. SARM with hospital origin spread within the community and are responsible for infections in patients with risk factors such as a past-history of hospitalization. True MRSA community-acquired infections occurred in younger patients and are mainly associated with Panton Valentine leukocidin positive strains. These strains are most often responsible for skin and soft-tissue infections and sometimes for necrotizing pneumonia.*

***Staphylococcus aureus* – community-acquired infections – methicillin resistance.**

[a] Faculté de médecine Laennec
INSERM E0230, IFR62
7, rue Guillaume-Paradin
69372 Lyon cedex 08

*Correspondance
jetienne@univ-lyon1.fr

article reçu le 19 mai, accepté le 25 mai 2005.

© Elsevier SAS.

1. Introduction

En 1960, la première souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) est apparue en Angleterre, puis les SARM se sont répandus de façon épidémique dans les hôpitaux à partir des années 70, pour devenir vers 1980 multi-résistants aux antibiotiques et pandémiques [31, 33, 34]. Ils ne sont généralement pas retrouvés en dehors de l'hôpital sauf chez certains patients ayant des facteurs de risque établis. Aux alentours des années 2000, les SARM n'ont plus été limités au secteur hospitalier, mais de nouveaux clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires. Ces SARM communautaires contiennent le plus souvent les gènes de la leucocidine de Panton Valentine et occasionnent des infections cutanées suppuratives et nécrosantes [8, 11, 24, 37, 39]. Ces nouvelles souches sont hautement épidémiques et constituent un problème de santé publique émergent au niveau mondial. Ces données nouvelles bouleversent l'épidémiologie de *S. aureus*.

2. Les outils de description des grands clones de SARM

Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de réaliser des études d'épidémiologie globale (ou macro-épidémiologie), de donner des noms aux grands clones pandémiques de SARM et de montrer leur diffusion au niveau national et international [31]. L'appartenance d'une souche de SARM à un clone est démontrée en caractérisant la souche successivement par :

– le séquençage de 7 gènes de ménage (en anglais, MLST pour *multilocus sequence typing*) [35]. Les séquences sont analysées dans une base de données accessible sur le site www.mlst.net. Un type de séquence (ou en anglais, *sequence type*) est attribué à chaque souche analysée ;

– la caractérisation du nombre et de la structure des répétitions présentes dans la séquence codante de la protéine A de *S. aureus* (*spa typing*) [16]. L'analyse de ces répétitions par PCR multiplex permet d'attribuer à chaque souche un profil (*spa type*) dont la définition et la nomenclature sont standardisées au niveau international à partir du site www.seqnet.org ;

– la caractérisation de la cassette contenant le gène de résistance *mec*A à la méticilline (SCC*mec* pour *staphylococcal chromosomal cassette*) [19, 29]. Il existe 5 grands types de cassettes et certains sous-types ;

– le type d'allèle *agr* de chacun des grands clones pandémiques [22]. Le gène *agr* est un régulateur global de l'expression des exoprotéines et il existe 4 types d'allèle *agr* qui reflètent le fond génétique de la souche analysée.

D'autres outils sont utilisés pour typer les souches de SARM comme le profil de restriction de l'ADN chromosomique par électrophorèse en champ pulsé. Cet outil est d'un grand intérêt pour les études de micro-épidémiologie. Ces études permettent de démontrer le lien entre les souches isolées dans un espace spatio-temporel étroit. Son trop fort pouvoir discriminant et sa faible reproductibilité inter-laboratoires ne permettent pas son utilisation exclusive pour des études d'épidémiologie globale.

3. Différence entre les SARM hospitaliers et communautaires

Initialement, les SARM étaient tous dérivés d'un clone hospitalier responsable d'infections nosocomiales (SARM d'origine hospitalière ou SARM-H). Des SARM-H sont occasionnellement isolés hors de l'hôpital chez des sujets colonisés au cours d'une hospitalisation ou d'un acte de soin. Ces patients ont généralement des facteurs de risque en rapport avec l'origine hospitalière des souches de SARM : hospitalisation ou chirurgie récente, pathologie chronique, âge élevé, membre de l'entourage travaillant dans un système de soin. Les infirmières à domicile ont récemment été incriminées dans la propagation de ces souches hors de l'hôpital.

Depuis la fin des années 1990, des souches de SARM sont régulièrement isolées hors de l'hôpital chez des patients ne présentant aucun de ces facteurs de risque. Dans la littérature, ces nouveaux SARM (SARM d'origine communautaire ou SARM-C) ont parfois été confondus ou rattachés aux SARM-H isolés dans la communauté chez les sujets à risque.

4. Les SARM hospitaliers

4.1. Description des principaux clones mondiaux de SARM-H

En fonction des caractéristiques génétiques obtenues par le MLST, le *spa typing*, la détermination du SCC*mec* et du type *agr*, différents clones de SARM-H ont été décrits dans le monde *(tableau I)*. On isole actuellement en France de rares souches de SARM proches du clone ibérique, surtout des souches proches du clone V et l'émergence de souches proches du clone pédiatrique.

Le clone ibérique a d'abord été retrouvé en Espagne, puis dans tous les pays de l'Europe dont la France [17, 30]. Il s'agit d'un clone relativement ancien qui a commencé à disparaître de France à partir de 1992. Il correspond aux souches de SARM multi-résistantes aux antibiotiques dont la gentamicine, la tobramycine et la kanamycine. Les souches du clone ibérique correspondent également aux quelques souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (souches GISA) décrites en France. Ce clone est rarement isolé en France actuellement (moins de 5 % des souches hospitalières de SARM).

Le clone V est un clone retrouvé en milieu hospitalier à New York en 1996 [6, 30]. Le clone majoritaire décrit en France depuis 1992 qui correspond aux souches sensibles à la gentamicine, résistantes à la kanamycine et à la tobramycine et aux fluoroquinolones, peut être assimilé au clone V. En effet, il possède en commun avec le clone V, un *sequence type* de type 8, un allèle *agr* de type 1, le gène de l'entérotoxine A (*sea*), l'absence du locus egc (*enterotoxin gene cluster* codant les entérotoxines G, I, M, N et O) et du gène de la toxine du choc toxique staphylococcique ou TSST-1 (*tst*), et une cassette SCC*mec* de type IV. Il existe cependant une légère variation de cette cassette SCC*mec* entre les clones, avec un SCC*mec* IVA pour les souches française alors que le clone V est de type IV strict. De même, le *spa type* est sensiblement différent mais les types observés (8, 68 et 64) sont phylogénétiquement très proches.

Le clone pédiatrique est un clone hospitalier de *sequence type* 5 qui a été isolé dans les hôpitaux pédiatriques du Portugal en 1992 où il représentait 6 % des souches pandémiques isolées jusqu'en 1998 [6, 28, 30]. Ce clone présente une résistance hétérogène à la méticilline et possède une cassette SCC*mec* de type IV. Un clone proche du clone pédiatrique est retrouvé également notamment chez les enfants et les jeunes adultes en France. Les souches de ce clone ont en commun avec ce clone un *sequence type* 5, un allèle *agr* de type 2, le locus *egc*, l'absence de sea et la présence d'une cassette SCC*mec* de type IV. Le gène *tst* de la toxine du choc toxique staphylococcique est souvent présent. Les souches ont une résistance hétérogène à l'oxacilline, sont résistantes à la tobramycine, la kanamycine et la tétracycline et ont une résistance intermédiaire à l'acide fusidique.

Tableau I / Caractéristiques des principaux clones de SARM isolés en France

Dénomination du clone	Souche de référence	Séquence type	Type spa	Type agr	Type de SCCmec	Gène de SEA	Gènes de l'egc	Gène de la TSST-1	Gènes de la PVL	Clones détectés en France	Principales résistances aux antibiotiques
Clone archaïque	COL	250	8	1	I	—	—	—	—	Non	
Clone ibérique	PER34	250	51	1	IA	+	—	—	—	Clone minoritaire hospitalier notamment des souches GISA	Kanamycine, tobramycine, gentamicine, ± macrolides, quinolones
Clone pédiatrique	HDE288	5	311	2	IV	—	+	— (+ en France)	—	Clone minoritaire hospitalier et communautaire avec souvent le gène de la TSST-1	Kanamycine, tobramycine, tétracyclines, acide fusidique
Clone V	BK2529	8	64	1	IV	+	—	—	—	Clone majoritaire hospitalier	Kanamycine, gentamicine, ± macrolides, quinolones
Clone PVL 80-IV	HT 2002 0213	80	40	3	IV	—	—	—	+	Clone majoritaire communautaire	Kanamycine, tétracyclines, acide fusidique

Abréviations : *spa* : gène de la protéine A ; *agr* : accessory gene regulator ; SCC*mec* : staphylococcal chromosomal cassette ; SEA : entérotoxine A ; TSST-1 : toxine du choc toxique staphylococcique ; PVL : leucocidine de Panton Valentine ; *egc* : enterotoxin gene cluster.

4.2. Données épidémiologiques des SARM-H en France

Les données françaises sur l'épidémiologie des SARM sont rapportées en incidence rapportée au total des souches de *S. aureus* isolées, en taux d'attaque pour 100 admissions ou en incidence pour 1 000 journées d'hospitalisation. L'étude EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) qui ne prend en compte que les souches isolées d'hémocultures, retrouve pour la France en 2001 et 2002, 33 % de SARM avec un intervalle de 21 % à 51 % selon les centres (http://www.earss.rivm.nl/). Les données des enquêtes RAISIN ne concernent que les infections nosocomiales. Dans l'enquête de prévalence nationale (un jour donné) RAISIN 2001 qui concernait 1 533 établissements, *S. aureus* représentait 19,8 % des infections nosocomiales dont 64,2 % de SARM. L'enquête RAISIN 2002 (478 établissements, 167 988 lits) concernait 8 000 souches de SARM avec une incidence de 0,68 pour 1 000 journées d'hospitalisation (0,47 à 0,81 selon les régions) (http://www.invs.sante.fr/publications/2002/raisin_oct_2002/). Les résultats globaux de l'enquête RAISIN 2003 ne sont pas encore rendus publics, mais les résultats pour le C-CLIN Sud-Est (http://cclin-sudest.univ-lyon1.fr/) sont les suivants :

- 31.9 % de SARM (pour 7 053 *S. aureus*) : 27.5 % en courts séjours dont 23.9 % en réanimation et 56.2 % en longs séjours ;
- incidence pour 1 000 jours d'hospitalisation : 0,67 ; 0,81 en courts séjours dont 2,9 en réanimation et 0,46 en longs séjours ;
- le taux d'attaque était de 0,47 pour 100 admissions en courts séjours.

Depuis les années 90, la proportion des SARM dans les hôpitaux français était croissante passant de 23 % (3-34) en 1990 à 30 % (6,7-48,3) en 1998, avec une incidence pour 100 admissions de 0,37 en 1990 à 0,55 en 1998 et une incidence pour 1 000 journées d'hospitalisation de 0,40 en 1990 à 0,56 en 1998 [25]. Depuis 4 ans, une baisse de l'incidence des SARM est rapportée pour les services de réanimation, de l'AP-HP, du C-CLIN Paris-Nord (hors AP-HP) et du C-CLIN Sud-Est [21], témoignant de l'efficacité des règles d'hygiène pour limiter la transmission croisée. Le problème restant étant celui de la diffusion des SARM dans la communauté, et leur réintroduction dans l'hôpital par ce biais.

5. Les SARM communautaires

5.1. Description des principaux clones mondiaux de SARM-C

Depuis la fin des années 90, on assiste à l'émergence de nouveaux clones de SARM responsables d'infections strictement communautaires. Ces clones ont une spécificité continentale (Europe, Amérique du Nord et Asie/Océanie). Compte tenu des échanges internationaux, on observe maintenant une diffusion mondiale de ces clones.

Le principal clone actuel de SARM communautaires en France est le clone PVL ST80-IV européen [38]. Son fonds génétique est totalement différent de celui des SARM-H et il correspond à des souches de *sequence type* 80 contenant les gènes de la leucocidine de Panton Valentine. Ce clone contient la cassette de résistance à la méticilline SCC*mec* de type IV et l'allèle *agr* de type 3 [39]. Les souches ont une résistance hétérogène à l'oxacilline, sont résistantes à la kanamycine et la tétracycline et ont une résistance intermédiaire à l'acide fusidique [39].

D'autres clones de SARM-C peuvent être isolés en France. Ils peuvent contenir également les gènes de la leucocidine de Panton Valentine ; il s'agit par exemple d'un clone ayant un allèle *agr* 1 et un sequence type 152/377. Le clone de SARM-H de type *agr* 2 et contenant le gène de la toxine du choc staphylococcique peut également être responsable d'infections communautaires : c'est un contre-exemple démontrant que la spécificité nosocomiale ou communautaire des clones n'est pas totale.

5.2. Infections cliniques associées aux SARM-C.

Les infections à SARM-C sont majoritairement des infections suppuratives de la peau et des tissus mous [27], parfois graves. Depuis 2002, la littérature médicale rapporte de nombreux cas de furoncles, d'abcès, de dermohypodermites infectieuses à SARM-C chez des sujets jeunes [4, 7, 11, 20, 27, 39]. La présentation clinique est inhabituelle avec un aspect initial pouvant simuler des piqûres d'araignée [10, 13, 18]. Ces infections sont généralement nécrotiques et collectées et le traitement antibiotique seul est souvent insuffisant. Le recours à la chirurgie est donc fréquent : incision et drainage évacuateur des lésions pour les furoncles et les abcès, débridement chirurgical large, parfois complété d'une greffe de peau pour les dermohypodermites [26, 36]. Certaines infections se compliquent d'infections systémiques : bactériémie, endocardite, ostéomyélite. Les SARM-C sécréteurs de leucocidine de Panton Valentine ont été également impliqués dans des cas de pneumonies nécrosantes dont le taux de mortalité est voisin de 80 % (14).

5.3. Caractéristiques épidémiologiques des sujets infectés par les SARM-C

Le manque d'hygiène semble associé à l'acquisition d'une infection à SARM-C. Les études chez les militaires, les sportifs ou les prisonniers ont montré que les difficultés d'accès aux douches et au savon étaient associées aux épidémies de SARM-C. En outre, les patients infectés par les SARM-C n'appartiennent pas aux mêmes groupes sociaux que les porteurs de SARM-H. L'étude américaine de Naimi et al. comparant les patients porteurs de SARM-C aux porteurs de SARM-H met en évidence des différences significatives entre les 2 groupes [27]. Les SARM-C sont associés à des patients plus jeunes (23 versus 68 ans, $p < 0.001$), plus pauvres, et appartenant à des minorités ethniques (Indiens d'Amérique, Asiatiques, Hispaniques ; $p < 0.001$). Bien que non identifiée statistiquement, l'appartenance à une communauté fermée semble constituer un facteur de risque.

5.4. Diffusion épidémique des SARM-C

Le gène *mec*A majore la transmission épidémique de *S. aureus*. Aussi, les infections cutanées à SARM-C surviennent souvent de façon épidémique à plus ou moins grande échelle. La transmission intrafamiliale des SARM-C semble fréquente et on assiste parfois à des cas familiaux d'infections à SARM-C [9, 10]. La diffusion épidémique des SARM-C se fait également à plus large échelle, réalisant des épidémies à taux d'attaque élevé dans les communautés où la promiscuité entre individus est importante : communautés primitives (Indiens d'Amérique [37], communautés rurales d'Alaska [1], Aborigènes [15], toxicomanes [5], homosexuels masculins, équipes de sports [2, 23], camps militaires [3, 12, 40], prisons. La transmission entre individus peut être directe (au contact des lésions) ou indirecte (transmission par du matériel).

La pénétration de *S. aureus* dans la peau est favorisée par les blessures cutanées. Les lésions cutanées (furoncles ou dermabrasions) non protégées par des pansements ont été clairement identifiées comme facteurs de transmission des SARM-C dans les sports avec contact (rugby, football américain, sports de combat), dans les prisons et les camps militaires [23]. Le rasage corporel (torse, jambes, pubis) a également été incriminé lors d'épidémies d'abcès cutanés chez les sportifs [2]. L'incision des furoncles par les prisonniers eux-mêmes et les lacérations cutanées (volontaires ou non) participent à la transmission des SARM-C par contact cutané direct dans les prisons amé-

ricaines. La transmission indirecte liée au partage de matériel (rasoirs, savons, serviettes de toilettes, maillots, casques, appareils de musculation) a été rapportée dans toutes les communautés fermées. L'eau peut aussi être vecteur. Cela a été montré dans un club de sports (contamination du jacuzzi) et lors du lavage du linge dans les collectivités. Le lavage du linge à la main (en prison) ou en machine à température basse a été incriminé.

5.5. Données épidémiologiques des SARM-C en France

On ne dispose pas d'études françaises ayant déterminé l'incidence des SARM-C dans une population de malades ayant des infections communautaires à *S. aureus*. Le recueil de souches de SARM à partir des laboratoires de ville permet de collecter surtout des souches de SARM-H chez des personnes âgées (données personnelles du CNR des staphylocoques non publiées). Cette observation sous entend que les prélèvements microbiologiques ne sont le plus souvent pas réalisés lors des infections à SARM-C, les seules infections décrites étant les plus graves survenues chez des patients hospitalisés.

Si on mesure, comme dans le travail rétrospectif de l'ONERBA de 2000-2003, l'incidence des SARM-C ayant le phénotype de résistance aux antibiotiques comme décrit pour le clone PVL ST80-IV, celle-ci représenterait entre 0,5 et 1 % de la totalité des souches de SARM [32].

6. Conclusion

La caractérisation au niveau phénotypique et moléculaire des souches de SARM permet de reconnaître des grands clones majoritaires. Cette description est un outil précieux pour définir l'origine plutôt hospitalière des souches de SARM, reconnaître un clone hospitalier diffusant en dehors de l'hôpital, ou au contraire décrire les caractères des clones strictement communautaires. Le travail des réseaux mesurant d'abord l'incidence des SARM en France, puis leur caractérisation au plan moléculaire par des laboratoires spécialisés, permet une caractérisation complète de la situation épidémiologique et un suivi dans le temps.

Références

[1] Baggett H.C., Hennessy T.W., Rudolph K., Bruden D., Reasonover A., Parkinson A., Sparks R., Donlan R.M., Martinez P., Mongkolrattanothai K., Butler J.C., Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska, J. Infect. Dis. 189 (2004) 1565-1573.

[2] Begier E.M., Frenette K., Barrett N.L., Mshar P., Petit S., Boxrud D.J., Watkins-Colwell K., Wheeler S., Cebelinski E.A., Glennen A., Nguyen D., Hadler J.L., A high-morbidity outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a college football team, facilitated by cosmetic body shaving and turf burns, Clin. Infect. Dis. 39(10) (2004) 1446-1453.

[3] Campbell K.M., Vaughn A.F., Russell K.L., Smith B., Jimenez D.L., Barrozo C.P., Minarcik J.R., Crum N.F., Ryan M.A., Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 4050-4053.

[4] Carleton H.A., Diep B.A., Charlebois E.D., Sensabaugh G.F., Perdreau-Remington F., Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA, J. Infect. Dis. 190 (2004) 1730-1738.

[5] Charlebois E.D., Perdreau-Remington F., Kreiswirth B., Bangsberg D.R., Ciccarone D., Diep B.A., Ng V.L., Chansky K., Chambers H.F., Origins of community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Clin. Infect. Dis. 39 (2004) 47-54.

[6] Chung M., Dickinson G., De Lencastre H., Tomasz A., International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 542-547.

[7] Cohen P.R., Grossman M.E., Management of cutaneous lesions associated with an emerging epidemic: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections, J. Am. Acad. Dermatol. 51 (2004) 132-135.

[8] Diep B.A., Sensabaugh G.F., Somboona N.S., Carleton H.A., Perdreau-Remington F., Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 2080-2084.

[9] Dietrich D.W., Auld D.B., Mermel L.A., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England children, Pediatrics 113 (2004) 347-352.

[10] Dominguez T.J., It's not a spider bite, it's community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Am. Board Fam. Pract. 17 (2004) 220-226.

[11] Dufour P., Gillet Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Floret D., Etienne J., Richet H., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin, Clin. Infect. Dis. 35 (2002) 819-824.

[12] Ellis M.W., Hospenthal D.R., Dooley D.P., Gray P.J., Murray C.K., Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers, Clin. Infect. Dis. 39 (2004) 971-979.

[13] Fagan S.P., Berger D.H., Rahwan K., Awad S.S., Spider bites presenting with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* soft tissue infection require early aggressive treatment, Surg. Infect. (Larchmt) 4 (2003) 311-315.

[14] Gillet Y., Issartel B., Vanhems P., Fournet J.C., Lina G., Bes M., Vandenesch F., Piemont Y., Brousse N., Floret D., Etienne J., Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients, Lancet 359 (2002) 753-759.

[15] Gosbell I.B., Mercer J.L., Neville S.A., Crone S.A., Chant K.G., Jalaludin B.B., Munro R., Non-multiresistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired infections, Med. J. Aust. 174 (2001) 627-630.

[16] Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothganger J., Turnwald D., Vogel U., Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 5442-5448.

[17] Heym B., Le Moal M., Armand-Lefevre L., Nicolas-Chanoine M.H., Multilocus sequence typing (MLST) shows that the 'Iberian' clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin, J. Antimicrob. Chemother. 50 (2002) 323-329.

[18] Isbister G.K., Whyte I.M., Suspected white-tail spider bite and necrotic ulcers, Intern. Med. J. 34 (2004) 38-44.

[19] Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K., Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 2637-2651.

[20] Iyer S., Jones D.H., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection: a retrospective analysis of clinical presentation and treatment of a local outbreak, J. Am. Acad. Dermatol. 50 (2004) 854-858.

[21] Jarlier V., Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : des premiers indicateurs au réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) n°32-33/2004 148-151, BEH 32-33 (2004) 148-151.

[22] Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F., Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease, Infect. Immun. 70 (2002) 631-641.

[23] Kazakova S.V., Hageman J.C., Matava M., Srinivasan A., Phelan L., Garfinkel B., Boo T., McAllister S., Anderson J., Jensen B., Dodson D., Lonsway D., McDougal L.K., Arduino M., Fraser V.J., Killgore G., Tenover F.C., Cody S., Jernigan D.B., A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 468-475.

[24] Le Thomas I., Mariani-Kurkdjian P., Collignon A., Gravet A., Clermont O., Brahimi N., Gaudelus J., Aujard Y., Navarro J., Beaufils F., Bingen E., Breast milk transmission of a Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 728-729.

[25] Lepelletier D., Richet H., Surveillance et contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans les hôpitaux français, BEH 6 (2001).

[26] Miller L.G., Perdreau-Remington F., Rieg G., Mehdi S., Perlroth J., Bayer A.S., Tang A.W., Phung T.O., Spellberg B., Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 1445-1453.

[27] Naimi T.S., LeDell K.H., Como-Sabetti K., Borchardt S.M., Boxrud D.J., Etienne J., Johnson S.K., Vandenesch F., Fridkin S., O'Boyle C., Danila R.N., Lynfield R., Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, JAMA 290 (2003) 2976-2984.

[28] O'Brien F.G., Lim T.T., Chong F.N., Coombs G.W., Enright M.C., Robinson D.A., Monk A., Said-Salim B., Kreiswirth B.N., Grubb W.B., Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 3185-3190.

[29] Oliveira D.C., de Lencastre H., Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. Agents Chemother. 46(7) (2002) 2155-2161.

[30] Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre H., The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements, Microb. Drug. Resist. 7 (2001) 349-361.

[31] Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre H., Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet Infect. Dis.3 (2002) 180-189.

[32] Robert J., Etienne J., Bertrand X., Antibiotiques Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003, Clin. Microbiol. Infect. (2005) in press.

[33] Robinson D.A., Enright M.C., Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2003) 3926-3934.

[34] Robinson D.A., Enright M.C., Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. J. Bacteriol. 186 (2004) 1060-1064.

[35] Robinson D.A., Enright M.C., Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Clin. Microbiol. Infect. 10 (2004) 92-97.

[36] Ruiz M.E., Yohannes S., Wladyka C.G., Pyomyositis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 1488-1489.

[37] Stemper M.E., Shukla S.K., Reed K.D., Emergence and spread of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Wisconsin, 1989 to 1999, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 5673-5680.

[38] Urth T., Juul G., Skov R., Schonheyder H.C., Spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80-IV clone in a Danish community, Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 26 (2005) 144-149.

[39] Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdy M.E., Etienne J., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence, Emerg. Infect. Dis. 9 (2003) 978-984.

[40] Zinderman C.E., Conner B., Malakooti M.A., LaMar J.E., Armstrong A., Bohnker B.K., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits, Emerg. Infect. Dis. 10 (2004) 941-944.

Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Anne Tristan, Tristan Ferry, **Geraldine Durand**, Olivier Dauwalder, Michèle Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Jerome Etienne

Journal of Hospital infection 2007;65(S2):105-109

Journal of Hospital Infection (2007) 65(S2) 105–109

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

www.elsevierhealth.com/journals/jhin

Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Anne Tristan*, Tristan Ferry, Geraldine Durand, Olivier Dauwalder, Michele Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Jerome Etienne

INSERM E0230, Lyon; Université Lyon 1, Centre National de référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Lyon, France

KEYWORDS
Staphylococcus aureus;
Virulence factors;
Superantigenic toxins;
Panton Valentine leukocidin;
Meticillin resistance

Summary *Staphylococcus aureus* produces many virulence factors, most of which act in a synergistic and coordinated fashion. Some appear to be specifically associated with certain severe infections and are produced by meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones distributed worldwide. Superantigenic exotoxins appear to be major virulence factors in hospital MRSA clones (HA-MRSA), and staphylococcal enterotoxin A (SEA) may be involved in the physiopathology of septic shock. Panton Valentine Leucocidin (PVL) has emerged as a major virulence factor in community-acquired *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) infections. In particular, the leukotoxic action of PVL is responsible for the high mortality rate associated with necrotizing pneumonia. CA-MRSA can also harbour the toxic shock toxin 1 (TSST-1) and rarely the exfoliative toxin.
© 2007 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Two categories of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are now recognized: hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) – the leading cause of HA-infections worldwide, particularly in intensive care units – and community-acquired MRSA (CA-MRSA). Molecular epidemiological studies show that a few pandemic clones are responsible for most MRSA infections worldwide.[1] Successful MRSA clones may have acquired virulence factors in order to compensate for the loss of fitness associated with antibiotic resistance.[2] Superantigenic toxins are especially detected in hospital-acquired MRSA clones,[3] whereas the Panton Valentine leukocidin genes are mostly associated with CA-MRSA.[4]

In this review, we examine current data on *Staphylococcus aureus* virulence factors associated with HA- and CA-MRSA and their clinical implications.

HA-MRSA clones and virulence determinants

Population genetics studies based on multilocus sequence typing (MLST) have shown that major MRSA clones have emerged from five clonal complexes (CCs): CC5, CC8, CC22, CC30 and CC45.[5]

* Corresponding author. A. Tristan. Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, 7 rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France.
Tel.: +33 04 78 77 86 57; fax: +33 04 78 77 86 58.
E-mail: anne.tristan@chu-lyon.fr (A. Tristan).

0195-6701/$ - see front matter © 2007 The Hospital Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Genetic characteristics of pandemic MRSA clones and other MRSA clones newly described

Clone	Origin	CC	ST	*agr* type	Virulence determinants			
					sea	*egc*	*tst*	*luk*S/*luk*F-pv
Pediatric clone	H	5	5	2	–	+	–	–
New-York/Japan clone	H	5	5	2	–	+	+	–
German clone	H	5	228	2	–	+	–	–
TSST-1-MRSA	H/C	5	5	2	–	+	+	–
European minor clone	C	5	5	2	–	+	–	+
Archaic clone	H	8	250	1	–	–	–	–
New-York clone V	H	8	8	1	+	–	–	–
Hungarian clone	H	8	239	1	+	–	–	–
Brazilian clone	H	8	239	1	–	–	–	–
Iberian clone	H	8	250	1	+	–	–	–
Lyon clone	H	8	8	1	+	–	–	–
USA 300	C	8	8	1	–	–	–	+
EMRSA-15	H	22	22	1	–	+	–	–
European minor clone	C	22	22	1	–	+	–	+
EMRSA-16	H	30	36	3	+	+	+	–
Oceania clone	C	30	30	3	–	+	+/–	+
Berlin clone	H	45	45	1	–	+	–	–
European clone	C	singleton	80	3	–	–	–	+

ST, sequence type; *sea*, staphylococcal enterotoxin A; *egc*, enterotoxin gene cluster; *tst*, toxin shock syndrome toxin 1 gene; *luk*S/*luk*F-pv, Panton Valentine leukocidin encoding genes; CC, clonal complexes (CCs were assigned according to the MLST database at http://www.mlst.net); *agr*, accessory gene regulator; H, hospital origin; C, community origin.

Within each CC, prevalent clones (such as Archaic, Iberian, German and Lyon clone) have been genetically characterized by sequence type (ST), *spa* type, and SCC*mec* cassette.[1]

All representatives of MRSA clones belonging to CC5 (German clone, New-York/Japan clone and Pediatric clone), to CC22 (EMRSA-15), and to CC45 (Berlin clone) shared the enterotoxin gene cluster locus (*egc*) encoding five superantigenic enterotoxin genes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) and occasionally the *tst* gene, encoding the toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). The representative strain of the EMRSA-16 clone, which represents CC30, shared both the *sea* gene, encoding the staphylococcal enterotoxin A (SEA) and the *egc* locus. MRSA belonging to CC8 (Archaic clone, New-York clone V, Hungarian clone, Brazilian clone, Iberian clone, Lyon clone) mainly harbored the *sea* gene (except Archaic clone and Brazilian clone). The Brazilian clone was the only clone that lacked all the tested superantigenic toxin genes (Table 1).

Ferry *et al.*[3] have shown that the presence of *sea* gene is associated with septic shock in patients with *S. aureus* bloodstream infection. These data have led to the hypothesis that proinflammatory responses triggered by superantigenic toxins such as SEA may co-exist during *S. aureus* bloodstream infection, leading to "mixed shock".[3] Dauwalder *et al.*[6] have shown that the severity of *S. aureus* sepsis is positively associated with SEA and negatively associated with *egc* locus. They postulated that the variable, clinical severity of *S. aureus* sepsis might be a result of differences in the inflammatory properties of staphylococcal superantigens. They demonstrated that SEA products more important proinflammatory effect than SEG.

In conclusion, with the exception of the Brazilian clone, all pandemic HA-MRSA clones contain at least one gene encoding a superantigenic toxin. Superantigenic toxins could partly account for the virulence of hospital-acquired MRSA infections.

CA-MRSA clones and virulence determinants

Panton Valentine leukocidin positive MRSA

Community-acquired meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) clones contain the Panton Valentine leukocidin (PVL) genes and harbour a type IV staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) element, but some isolates with the SCC*mec* V element have been reported.[7] Infections

occur mainly in previously healthy young patients[8] and are predominantly represented by skin and soft-tissue infection, but deep-seated infections such as necrotizing pneumonia or disseminated invasive osteomyelitis are described.[9] CA-MRSA clones spread during outbreaks of skin abscesses, that have been observed in various geographic regions and community settings.[4,10] Direct airway transmission can also occur.[11]

The PVL positive MRSA belong to different clones that have spread throughout the world.[10] In a study published in 2003,[10] the number of described clones and their geographical distribution were limited. Schematically, ST80 was detected in Europe, ST8 and ST1 in the USA and ST30 in Oceania. We observe today what appears to be the result of intercontinental exchanges of the various clones: (i) from the USA towards Europe with ST8 clone (USA 300); (ii) from the USA towards Europe and Asia with ST1 clone (USA 400); (iii) from the USA towards Asia with ST59 clone (USA 1000); (iv) from Europe towards Asia with ST80 clone;[12] (v) from Oceania towards Europe with ST30 clone. Countries with numerous international exchanges were those for which we detected higher clone diversity (e.g. Singapore).

Some new clones have been detected only since 2003. ST22, recently described, has been found in Europe only. Moreover, a new clone ST766, that belongs to the same clonal group CC22 as ST22 was found in Singapore.[12] Clone ST377 (with a type V SCC*mec*) was described, at the same time, in Europe and in Australia.[7] Conversely, clone ST5 has been detected in Europe only. Clone ST93, described in Australia before 2003, has not been detected in other countries. Currently PVL positive MRSAs are progressively becoming responsible for hospital-acquired infections in countries where the prevalence of CA-MRSA is high, such as in the USA. Kourbatova *et al.*[13] reported nine prosthetic joint infections that occurred over a 13-month period, at the Grady Memorial Hospital of Atlanta: five (56%) were associated with PVL-positive CA-MRSA, three with PVL-negative MSSA and no bacteria were cultured in the last infection.

Panton Valentine leukocidin (PVL), together with γ-haemolysin and other leukocidins, belongs to the family of "bicomponent synergohymenotropic toxins".[14,15] These leukocidins form a family of two-component pore-forming toxins that act in synergy to lyse host cell membranes.[4,16] The two active proteins are designated S and F. PVL is encoded by two contiguous and cotranscribed genes, *lukF-PV* and *lukS-PV*, that are borne by several different phages.[4,16] PVL is active on human polymorphonuclear neutrophils (PMN), monocytes and macrophages.[4,16] It induces calcium channels to open, leading to calcium influx and massive release of inflammatory mediators such as leukotriene B4, IL-8 and histamine.[4,16] PVL induces severe inflammatory lesions when injected intradermally to rabbits, with capillary dilation, chemotaxis, PMN infiltration, PMN karyorrhexis, and skin necrosis. The degree of necrosis depends on the dose of PVL. None of these effects occur in rabbits immunized against LukS-PV and LukF-PV.[17] Community-onset necrotizing pneumonia due to *S. aureus* carrying PVL is a worrying emerging infection with a frequently fatal outcome.[18] Given the capacity of PVL to cause cell damage in vitro, PVL may play a major role in the inflammation and necrosis of the respiratory epithelium and parenchyma. PVL is also the most likely cause of peripheral leucopenia in this setting.

Exfoliative toxins positive MRSA

The study of Yamaguchi *et al.*[19] in 2002 raises the question of whether new exfoliative toxin A (with the *eta* gene) and exfoliative toxin B (with the *etb* gene) positive MRSA groups are emerging world-wide. In 2003, Liassine *et al.*[20] reported CA-MRSA harbouring exfoliative toxins genes in Switzerland. The Japanese exfoliative toxin-producing CA-MRSA strains were all associated with bullous impetigo, whereas the strains from Switzerland were isolated from patients with impetigo. Three exfoliative toxins (ETA, B and D) cause exfoliation of the epidermis without necrolysis or inflammatory response of the skin. These exfoliative toxins act as epidermolytic proteases that specifically cleave desmoglein 1, a desmosomal protein connecting epidermal cells predominant in granular layer of epidermis.[21]

TSST-1 positive HA- and CA-MRSA clones

Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) is a superantigenic toxin secreted by some *S. aureus* isolates. TSST-1, encoded by the *tst* gene, is a major virulence factor in toxic shock syndrome, staphylococcal scarlet fever, and neonatal toxic shock-like exanthematous diseases described in Japan and France.[22-24] *tst*-positive MRSA strains appear to be highly virulent and to cause a variety of illness, ranging from toxic shock syndrome to various suppurative infections.

MRSA clones harboring *tst* gene have been detected in France and in Switzerland since 2002. The *tst*-positive MRSA belonged to two clones: a major clone with ST5 and *agr*2 and a minor clone with ST30 and *agr*3. MRSA clones

were associated with both hospital-acquired and nosocomial-acquired infections.[25] The MRSA clones were mainly isolated from children (overall median age, 3 years). They caused a variety of clinical syndromes, including toxic shock syndrome and suppurative infections. Both clones were found to harbor SCC*mec* IV cassette. The origin of these clones is unclear. The *tst*-positive *agr*2 MRSA clone has the same ST as two pandemic nosocomial clones (Pediatric clone and New-York/Japan clone).

TSST-1 is also produced by an MRSA clone that predominates in Japan and is now spreading through Europe. This clone is responsible for outbreaks of nosocomial toxic shock syndrome and for an emergent toxin-related disease called neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (or NTED).[26] This clone has also been detected in France and may be associated with bloodstream infections.[3] As for *sea*-positive *S. aureus* bloodstream infections, this *tst*-positive clone may lead to a "mixed shock".

References

1. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;**2**:180–189.
2. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, *et al*. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002;**359**:1819–1827.
3. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, *et al*. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clin Infect Dis* 2005;**41**:771–777.
4. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, *et al*. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;**29**:1128–1132.
5. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;**47**:3926–3934.
6. Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, *et al*. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *J Leukoc Biol* 2006 Oct;**80**:753–758.
7. Garnier F, Tristan A, Francois B, *et al*. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis* 2006;**12**:498–500.
8. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, *et al*. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Am Med Assoc* 2003;**290**:2976–2984.
9. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Jr., Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics* 2006;**117**:433–440.
10. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:978–984.
11. Chalumeau M, Bidet P, Lina G, *et al*. Transmission of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* to a physician during resuscitation of a child. *Clin Infect Dis* 2005;**41**:e29–30.
12. Hsu LY, Tristan A, Koh TH, *et al*. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Singapore. *Emerg Infect Dis* 2005;**11**:341–342.
13. Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, Ray SM, White N, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. *Am J Infect Control* 2005;**33**:385–391.
14. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Curr Infect Dis Rep* 2002;**4**:400–410.
15. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;**13**:16–34.
16. Finck-Barbancon V, Duportail G, Meunier O, Colin DA. Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993;**1182**:275–282.
17. Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 1992;**185**:175–180.
18. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, *et al*. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002;**359**:753–759.
19. Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, *et al*. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *J Infect Dis* 2002;**185**:1511–1516.
20. Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, Bes M, Vandenesch F and Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:825–828.
21. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999;**12**:224–242.
22. Kikuchi K, Takahashi N, Piao C, Totsuka K, Nishida H, Uchiyama T. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:3001–3006.
23. Floret D. [Clinical aspects of streptococcal and staphylococcal toxinic diseases]. *Arch Pediatr* 2001;**8**(Suppl 4):762s–768s.
24. van der Mee-Marquet N, Lina G, Quentin R, *et al*. Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. *J Clin Microbiol* 2003;41:4883–4884.
25. Durand G, Bes M, Meugnier H, *et al*. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol* 2006;44:847–853.
26. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, *et al*. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2002;70:4987–4996.

3EME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

Introduction au travail personnel

Grâce à la plasticité de son génome *S. aureus* peut acquérir des gènes de facteurs de virulence mais aussi des gènes de résistance aux antibiotiques notamment la cassette de résistance à la méticilline SCC*mec*. La résistance à la méticilline est d'abord apparue dans des souches hospitalières à l'origine de grands clones pandémiques nosocomiaux. Elle a ensuite émergé en milieu communautaire chez des souches possédant la leucocidine de Panton Valentine.

Notre travail de thèse s'est intégré dans la surveillance des SARM en France. Nous avons notamment participé à l'élaboration de nouveaux outils contribuant à la caractérisation des SARM : (i) méthode de typage capsulaire, (ii) technique de typage de la cassette SCC*mec*. Le Centre National de Référence des staphylocoques ayant observé en 2002 un nombre croissant d'infections hospitalières et communautaires dues à des souches de SARM possédant le gène de la TSST-1, la deuxième partie de notre travail s'est focalisée sur la caractérisation de ces souches. Nous avons recensé toutes les souches de *S. aureus* de la collection du CNR des staphylocoques possédant le gène *tst*, reçues sur la période 2000-2003. Nous avons ensuite procédé à la complète caractérisation phénotypique et moléculaire des souches *tst*$^+$ reçues durant la période 2002-2003. Nos travaux ont abouti sur la description d'un nouveau clone de SARM *tst*$^+$. La troisième partie de notre travail a été consacrée à l'étude de l'épidémiologie du clone SARM *tst*$^+$ et notamment à la surveillance de sa prévalence en France. Enfin, dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons exploré le pouvoir pathogène de ce clone en recherchant les propriétés génétiques qui lui confèrent une telle virulence et épidémicité et notamment en investiguant le rôle de la TSST-1.

I- Elaboration d'outils pour la caractérisation des SARM

1. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests

Isabelle Verdier, **Géraldine Durand**, Michèle Bes, Kimberly L Taylor, Gerard Lina, François Vandenesch, Ali I. Fattom et Jerome Etienne.

Soumise le 30/07/2006, acceptée le 17/12/2006.

Journal of Clinical Microbiology 2007; 45(3):725-729.

De nombreux facteurs de virulence tels que les adhésines, les cytotoxines, les superantigènes, les exoenzymes et les polysaccharides contribuent à la pathogénie des staphylocoques. Le polysaccharide capsulaire encore appelé capsule est un composant de la paroi cellulaire qui protège la bactérie de la phagocytose et qui favorise la virulence. Bien que 11 polysaccharides capsulaires aient été décrits, seulement 2 types, les types 5 et 8 sont cliniquement prédominants [25]. Cette prédominance a conduit au développement d'un vaccin conjugué bivalent StaphVAX (Nabi Biopharmaceuticals, Rockville, MD) dirigé contre ces deux types capsulaires [203, 204].

L'objectif de cette étude était de caractériser d'un point de vue phénotypique et moléculaire la capsule de 195 isolats de *S. aureus* responsables d'infections variées représentatives de tous les tableaux cliniques rencontrés à l'hôpital ou bien en ville. Ces souches ont été isolées principalement en France entre Janvier 2001 et Décembre 2004. Parmi les 195 isolats, 35% étaient des SARM.

La caractérisation phénotypique par sérotypage capsulaire a révélé que les isolats cliniques exprimaient le type 5 (42%) ou le type 8 (45%) tandis que 13% demeuraient non typables. En fait, ces isolats non typables par sérotypage exprimaient l'antigène 336 à la surface de leur paroi cellulaire. Cet antigène 336 est un polyribitol phosphate N-acetylglucosamine ressemblant à l'acide teichoïque de la paroi cellulaire.

Le sérotype 5 était prédominant parmi les SARM (64% des isolats de SARM), alors que les SASM étaient plutôt de sérotype 8 (60% des isolats de SASM).

La caractérisation moléculaire par PCR a montré que les isolats de *S. aureus* investigués dans cette étude possédaient tous, soit le gène *cap*5 (codant la capsule de type 5), soit le gène *cap*8 (codant la capsule de type 8). En fait les souches non typables par sérotypage possédaient mais n'exprimaient pas les gènes codant la capsule (*cap*5 ou *cap*8). Par ailleurs l'absence de capsule chez ces souches autorise l'expression de l'antigène 336 à la surface de la paroi cellulaire.

Un vaccin bivalent dirigé contre le type 5 et le type 8 protègent contre 87% des souches de *S. aureus*, l'addition de l'antigène 336 à ce vaccin pourrait accroître la couverture vaccinale jusqu'à 100%.

Nous avons contribué à cette étude en réalisant le sérotypage et le typage par PCR sur une partie de la collection des souches de SARM.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2007, p. 725–729 Vol. 45, No. 3
0095-1137/07/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01572-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Identification of the Capsular Polysaccharides in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests[▽]

Isabelle Verdier,[1] Geraldine Durand,[1] Michele Bes,[1] Kimberly L. Taylor,[2] Gerard Lina,[1] François Vandenesch,[1] Ali I. Fattom,[2] and Jerome Etienne[1]*

INSERM, E0230, Lyon, F-69008, France, and Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Lyon, F-69008 France,[1] and W. W. Karakawa Microbial Pathogenesis Laboratory, Nabi Biopharmaceuticals, 12280 Wilkins Avenue, Rockville, Maryland 20852[2]

Received 30 July 2006/Returned for modification 23 October 2006/Accepted 17 December 2006

***Staphylococcus aureus* is a major cause of nosocomial and community-acquired infections. The predominance of two capsular polysaccharides, types 5 and 8, on the surface of clinical isolates led to the development of a conjugate vaccine (StaphVAX) based on capsular polysaccharides types 5 and 8 conjugated to a carrier protein. We have studied the capsular phenotypes and genotypes of 195 isolates representative of all clinical syndromes that encompassed both hospital and community-acquired infections. These isolates were mainly detected in France between January 2001 and December 2004. In this population, most of clinical isolates (87%) expressed either capsular polysaccharide type 5 (42%) or 8 (45%), whereas 13% were nontypeable by the serotyping method with antibodies specific to capsular polysaccharide type 5 or 8. These 26 nontypeable strains were further serotyped and were demonstrated to express the cell wall surface antigen 336, a polyribitol phosphate *N*-acetylglucosamine, which resembles cell wall teichoic acid. Among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, we found a predominance of serotype 5 for 64% of strains, whereas MSSA isolates were predominantly capsular serotype 8 (60%). All *S. aureus* clinical isolates included in the present study have been investigated by PCR method, demonstrating that all isolates carried either the *cap5* or the *cap8* locus.**

Staphylococcus aureus is a major cause of nosocomial and community-acquired infections. The adaptation of *S. aureus* to the environment has been marked by the acquisition of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and the emergence of multiantibiotic resistance. At first, MRSA were described as hospital-acquired MRSA (HA-MRSA), but in recent years community-acquired MRSA (CA-MRSA) strains have been reported worldwide (4). With the emergence of this multiantibiotic resistance, including resistance to vancomycin, the antibiotic of last resort, new strategies are needed to manage staphylococcal infections.

Many virulence factors, including surface-associated adhesins, cytotoxins, superantigens, exoenzymes, and capsular polysaccharides, contribute to the pathogenesis of staphylococcal infections. The capsular polysaccharide or capsule is a cell wall bacterial component that protects bacterium from phagocytic uptake and enhances microbial virulence. Although 11 capsular polysaccharide types are described, only two types, type 5 and type 8, are clinically relevant in that they are predominant among clinical infection isolates of varied geographic origin (1, 10, 12, 16, 19, 20, 23). Although most *S. aureus* clinical infection isolates are capsular type 5 or 8, a capsule-based vaccine, StaphVAX (Nabi Biopharmaceuticals, Rockville, MD), is being developed as a new tool for staphylococcal infection prevention (5, 21, 22). StaphVAX is an *S. aureus* capsular polysaccharide bivalent conjugate vaccine, in which type 5 and type 8 capsular polysaccharides are chemically conjugated to a carrier protein.

Although the majority of *S. aureus* infection isolates are type 5 or 8, the remaining 10 to 20% of clinical isolates, which are nontypeable by serotyping methods, are serotype 336 (1, 10, 23). Type 336 isolates do not express capsule but do express cell surface polysaccharide or the 336 polysaccharide (336PS), which resembles *S. aureus* cell wall teichoic acid (14, 17). Thus, the determination of the 336 serotype prevalence among clinical isolates is important for vaccine development and a *S. aureus* 336-conjugate vaccine is currently under development (Nabi Biopharmaceuticals).

The aim of the present study was to characterize the capsular phenotype of 195 *S. aureus* isolates from diverse clinical diseases mainly from France. Capsular phenotypes were tested by a conventional serotyping method using antibodies specific to type 5 and type 8 capsule. Moreover, the agglutination test with 336 polysaccharide antibodies was included in the study for nontypeable strains by the serotyping method. In parallel, a PCR technique was developed to characterize the *S. aureus* isolates' capsular genotype. Analysis of the data was conducted to determine whether an association between capsular or 336 phenotype and capsular genotype exists.

MATERIALS AND METHODS

Collection of specimens. The French National Reference Center for Staphylococci (Lyon, France) collects more than 1,000 isolates yearly from patients with toxemic and nontoxemic staphylococcal diseases throughout France. For the present study, we selected a subset of 195 *S. aureus* isolates isolated between January 2001 and December 2004 mainly from France (179 of 195). The other isolates were from Japan ($n = 5$), the United States ($n = 2$), Algeria ($n = 2$), Spain ($n = 2$), China ($n = 2$), Romania ($n = 1$), Germany ($n = 1$), and Togo ($n = 1$). Among these strains, 126 were methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) (65%) and 69 were MRSA (35%). The isolates classified by clinical syndromes

* Corresponding author. Mailing address: Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Université Lyon 1, Lyon F-69008, France. Phone: 33478778657. Fax: 33478778658. E-mail: jetienne@univ-lyon1.fr.

▽ Published ahead of print on 3 January 2007.

TABLE 1. Distribution of capsular serotype determined by serotyping method among 195 clinical isolates by clinical disease[a]

Clinical disease	No. (%) of isolates												*P*
	MSSA				MRSA				Total				
	No.	Type 5	Type 8	NT	No.	Type 5	Type 8	NT	No.	Type 5	Type 8	NT	
Suppurative infections	113	36 (32)	64 (57)	13 (11)	59	37 (63)	10 (17)	12 (20)	172	73 (42.5)	74 (43)	25 (14.5)	NS
Skin and soft tissues	12	4	6	2	13	9	3	1	25	13	9	3	NS
Muskuloskeletal	12	7	4	1	8	4	1	3	20	11	5	4	NS
Genitourinary tract infection	2	1	1	0	1	0	0	1	3	1	1	1	NS
Non-necrotizing pneumonia	7	1	6	0	7	5	0	2	14	6	6	2	NS
Necrotizing pneumonia	46	8	34	4	6	1	4	1	52	9	38	5	<0.001
Infected endocarditis	3	1	1	1	0	0	0	0	3	1	1	1	NS
Multifocal infection	3	2	1	0	0	0	0	0	3	2	1	0	NS
Bacteremia	28	12	11	5	24	18	2	4	52	30	13	9	0.003
Toxin-associated infections	11	0 (0)	11 (100)	0	8	6 (75)	1 (12.5)	1 (12.5)	19	6 (32)	12 (63)	1 (5)	NS
Bullous impetigo	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	NS
Toxic shock syndrome	5	0	5	0	1	0	1	0	6	0	6	0	0.023
Scarlet fever	5	0	5	0	2	1	0	1	7	1	5	1	NS
NTED	0	0	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	0.027
Colonization	2	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2	1 (50)	1 (50)	0 (0)	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)	NS
Total	126	37 (29.3)	76 (60.3)	13 (10.3)	69	44 (64)	12 (17)	13 (19)	195	81 (42)	88 (45)	26 (13)	

[a] NT, nontypeable by serotyping with capsular type 5 and 8 antibodies; non-type 5 and non-type 8. NS, not significant.

were as follows. A total of 172 strains were involved in suppurative or invasive infections (52, necrotizing pneumonia; 52, associated with bacteremia; 25, skin and soft tissue infections; 20, musculoskeletal infections; 14, non-necrotizing pneumonia; 3, infected endocarditis; 3, genitourinary tract infections; 3, multifocal infections), 19 strains were involved in toxin-associated infections (13, scarlet fever or toxic shock syndrome; 5, neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease [NTED]; 1, bullous impetigo), and 4 strains were isolated from asymptomatic carriers (Table 1). The strains involved in NTED were all isolated in Japan (24).

Identification of *Staphylococcus aureus* isolates. Species were identified by colony and microscopic morphology, coagulase activity on rabbit plasma (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and production of clumping factor (Slidex Staph Plus; bioMérieux).

Capsular and surface polysaccharide typing. Capsular serotyping was performed for all strains. The strains were grown for 24 h at 37°C on Columbia agar plates containing 2% $MgCl_2$ and 0.5% $CaCl_2$. Several colonies of each strain were suspended in 0.9% saline and tested by slide agglutination with rabbit polyclonal antibodies specific to capsular polysaccharide types 5 and 8 (Nabi Biopharmaceuticals). Nontypeable strains (strains that did not react with antibodies specific to type 5 and type 8 capsular polysaccharide) were further tested with 336 polyclonal antibodies (Nabi Biopharmaceuticals). Sera for 336 serotyping was generated by immunizing New Zealand White rabbits with a 50-μg 336-rEPA conjugate vaccine in Freund adjuvant. Animals were bled, and the sera were stored at −70°C. Slide agglutination was determined to be positive if positive agglutination or clumping was observed in less than 20 s.

DNA extraction. Strains were grown on brain heart infusion agar or in brain heart infusion at 37°C overnight. Genomic DNA was extracted with a standard phenol-chloroform procedure as described elsewhere (3). Amplification of *gyrA* was used to confirm the quality of each DNA extract and the absence of PCR inhibitors.

Detection of capsular genotype by PCR method. Genomic DNA was used as a template for PCR amplification with the primers Cap5 k1 (5′-GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG-3′) and Cap5 k2 (5′-ACTTCGAATATAAACTTG AATCAATGTTATACAG-3′) located in *cap5k* for capsular type 5 and the primers Capsule 8 k1 (5′-GCCTTATGTTAGGTGATAAACC-3′) and Capsule 8 k2 (5′-GGAAAAACACTATCATAGCAGG-3′) located in *cap8I* for capsular type 8. Amplification was carried out on a PE-9600 thermocycler (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) under the following conditions: an initial 5-min denaturation step at 94°C, followed by 25 cycles of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 55°C, and 1 min of extension at 72°C; with a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels (Sigma, France). The sizes of the amplicons were 361 bp for capsular type 5 and 173 bp for capsular type 8.

Detection of the *mecA* gene. The *mecA* gene coding for methicillin resistance was detected by PCR as described by Murakami et al. (15).

Identification of *agr* alleles. The *agr* group (*agr-1* to *-4*) was determined by PCR as previously described (11).

Detection of toxin genes. Sequences specific for staphylococcal enterotoxin genes (*sea*), the toxic shock syndrome toxin gene (*tst*), and PVL genes (*lukS*-PV–*lukF*-PV) were detected by PCR as described elsewhere (11).

Statistical analysis. We used the chi-squared test to compare distribution of capsular polysaccharide types 5 and 8 and nontypeable strains among the clinical syndromes using SPSS software version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Capsular serotype distribution. When using rabbit polyclonal antibodies specific to capsular polysaccharide types 5 and 8, 81 of the 195 isolates were capsular serotype 5 (T5) (42%), 88 were capsular serotype 8 (T8) (45%), and 26 (13%) were nontypeable (Table 1). The 126 MSSA strains had a capsular serotype 8 in 60.3% (76 of 126) and a capsular serotype 5 in 29.3% (37 of 126). Conversely, the 69 MRSA isolates that belonged to various hospital or community clones had more frequently a T5 for 64% of isolates (44 of 69) than a T8 for 17% of the isolates (12 of 69). The distribution of capsular serotype was classified according to the different *S. aureus* clinical diseases. For suppurative and/or invasive infections, the number of cases for each syndrome was relatively weak, but there was no significant difference between capsular type 5 and 8 for each clinical entity excepted for necrotizing pneumonia, for which 38 isolates were T8 and 9 isolates were T5 ($P < 0.001$) and bacteremia for which 30 isolates were T5 and 13 isolates were T8 ($P = 0.003$). For toxin-associated infections there were a significant difference for toxic shock syndrome, which had all T8 ($P = 0.023$) and for NTED which had all a T5 ($P = 0.027$) (Table 1).

Surface polysaccharide typing. Twenty-six isolates which did not react with T5 or T8 specific antibodies reacted positively with 336 polyclonal antibodies (Table 2); thus, these isolates

TABLE 2. Characteristics of 26 nonserotypeable isolates with antibodies specific for capsular polysaccharide type 5 or 8

Isolate no.	Capsular genotype	336 serotype	Infection characteristic	Clinical disease	*agr* type	Presence (+) or absence (−) of gene(s)			
						mecA	*lukS*-PV and *lukF*-PV	*tst*	*sea*
HT 2003 0151	5	+	Nosocomial	Muskuloskeletal infection	1	+	−	−	+
HT 2004 0020	5	+	Nosocomial	Muskuloskeletal infection	1	+	−	−	+
HT 2004 0230	5	+	Nosocomial	Urinary infection	1	+	−	−	+
HT 2004 0133	5	+	Nosocomial	Non-necrotizing pneumonia	1	+	−	−	+
HT 2004 0291	5	+	Nosocomial	Bacteremia	1	+	−	−	+
HT 2004 0231	5	+	Nosocomial	Bacteremia	1	+	−	−	+
HT 2002 0338	8	+	Community	Necrotizing pneumonia	3	+	+	−	−
HT 2001 0541	8	+	Unknown	Skin and soft tissues infection	3	+	+	+	−
HT 2003 0074	8	+	Unknown	Bacteremia	3	+	+	−	−
HT 2002 0665	8	+	Nosocomial	Muskuloskeletal infection	3	+	−	+	+
HT 2003 0039	8	+	Nosocomial	Bacteremia	3	+	−	−	+
HT 2002 0417	5	+	Unknown	Non-necrotizing pneumonia	2	+	−	+	−
HT 2004 0081	5	+	Unknown	Scarlet fever	1	+	−	−	−
A 98 0642	8	+	Community	Necrotizing pneumonia	3	−	+	−	+
HT 2002 0044	8	+	Community	Necrotizing pneumonia	3	−	+	−	−
HT 2002 0769	8	+	Community	Necrotizing pneumonia	3	−	+	−	−
HT 2001 0522	8	+	Unknown	Skin and soft tissues infection	3	−	+	−	−
HT 2003 0658	8	+	Community	Necrotising pneumonia	1	−	+	−	−
HT 2002 0602	8	+	Community	Muskuloskeletal infection	1	−	+	−	−
HT 2004 0145	8	+	Nosocomial	Bacteremia	1	−	−	−	−
HT 2001 0306	8	+	Community	Infected endocarditis	1	−	−	−	−
HT 2004 0238	8	+	Nosocomial	Bacteremia	1	−	−	−	−
HT 2004 0243	8	+	Nosocomial	Bacteremia	1	−	−	−	−
HT 2004 0112	8	+	Unknown	Bacteremia	2	−	−	−	−
HT 2004 0015	8	+	Unknown	Bacteremia	3	−	−	−	+
HT 2002 0072	8	+	Community	Skin and soft tissue infection	4	−	−	−	−

were defined as having the 336 serotype. These 26 isolates (13 MRSA and 13 MSSA) were involved in various infections: bacteremia ($n = 9$), necrotizing-pneumonia ($n = 5$), musculoskeletal infection ($n = 4$), skin or soft tissue infection ($n = 3$), non-necrotizing pneumonia ($n = 2$), urinary infection ($n = 1$), scarlet fever ($n = 1$), and infected endocarditis ($n = 1$). Six of MRSA strains had an *agr* type 1, harbored the *sea* gene, were associated with hospital-acquired infections, and corresponded to the Lyon clone, which is spreading in France (6). One strain corresponded to the major PVL-positive community-acquired MRSA (CA-MRSA) clone *agr-3* that spreading in Europe (25) and 1 isolate corresponded to a new emerging MRSA clone *tst*-positive *agr-2* responsible for either hospital- or community-acquired infections (3). MSSA isolates agglutinated by 336 antibodies were also associated with a diversity of infections: bacteremia ($n = 5$), necrotizing pneumonia ($n = 4$), skin or soft tissue infection ($n = 2$), infected endocarditis ($n = 1$), and musculoskeletal infection ($n = 1$), and they belonged to the four *agr* groups.

Capsular genotype. A PCR method was developed to detect capsular type of *S. aureus* isolates since serotyping method allowed typing of only 87% of strains (169 of 195). All strains included in the present study have been investigated by PCR method. PCR method allowed genotyping of 100% of strains, and all strains carried either the *cap5* (46% of cases) or *cap8* locus (54% of cases) (Table 3) and demonstrated that the capsular phenotype that was determined by serotyping method was confirmed by PCR. However, all 336 serotype strains ($n = 26$), strains that reacted specifically with 336 antibodies but not with capsular polysaccharide type 5 or 8 antibodies, carried the *cap8* or *cap5* genes (18 and 8 isolates) (Table 2).

Typing French MRSA strains. The present study included 69 MRSA isolates, and 61 of these were from France. The 61 French MRSA isolates belonged to various clones. Twenty-eight MRSA isolates corresponded to the major *sea*-positive *agr-1* MRSA clone spreading in French hospitals (6). Five MRSA isolates were PVL-positive *agr-3* and belonged to the major ST80 CA-MRSA clone spreading all over Europe (25).

TABLE 3. Determination of capsular polysaccharide type 5 or 8 by agglutination tests (serotype) and PCR (genotype) among 195 clinical isolates (126 MSSA and 69 MRSA)

Method	Isolate group	No. (%) of isolates		
		Capsular type 5	Capsular type 8	Nontypeable[c]
Agglutination[a]	MSSA isolates	37 (29.3)	76 (60.3)	13 (6.5)*
	MRSA isolates	44 (64)	12 (17)	13 (6.5)*
	Total isolates	81 (42)	88 (45)	26 (13)*
PCR[b]	MSSA isolates	37 (29.3)	89 (71)	0
	MRSA isolates	52 (75)	17 (25)	0
	Total isolates	89 (46)	106 (54)	0

[a] Serological typing by agglutination with antisera specific to capsular type 5 or type 8.
[b] Detection of capsule genotype with primers located in specific locus cap5 or cap8.
[c] *, Nontypeable by agglutination with antibodies specific for capsular polysaccharide type 5 or 8 but reacted positively with 336 polyclonal antibodies, and all carried the *cap8* or *cap5* genes.

Five others PVL-positive MRSA isolates belonged to various CA-MRSA clones rarely detected in France (ST1, ST5, ST30, ST37, and ST377) described elsewhere (8, 25). Eleven strains corresponded to a new emerging *tst*-positive *agr-2* MRSA clone responsible for either hospital- or community-acquired infections (3). Twelve remaining French MRSA isolates corresponded to minor clones (five strains had *agr* allele type 1, five strains had *agr* allele type 3, and two strains had *agr* allele type 2).

DISCUSSION

This study was designed to characterize the capsular phenotype of 195 *S. aureus* isolates from diverse clinical diseases which encompassed both hospital- and community-acquired infections. These isolates were mainly from France, and 35% were MRSA strains. The majority of these strains were involved in suppurative or invasive infections (172 strains), and among these strains necrotizing-pneumonia was strongly represented (30%) because of the gravity of this pathology (Table 1) (9). However, the present study included tests for surface polysaccharide 336 that were previously unavailable.

In this population most of clinical isolates (87%) expressed either capsular polysaccharide T5 (42%) or T8 (45%), and 13% of the clinical isolates were nontypeable with antibodies specific for capsular polysaccharide types 5 or 8. This distribution of serotype is similar to that observed in previous studies from diverse strain collections representing several geographic regions (1, 7, 10, 16, 23). Na'was et al. studied 254 strains involved in nosocomial infections (238 MSSA and 16 MRSA) and found that 43% were T5, 45% were T8, and 12% were nontypeable (16). Fournier et al. reported a similar distribution (43% were T5, 40% were T8, and 17% were nontypeable) among 406 clinical isolates from six French hospitals (7).

When we considered MRSA strains, 64% were T5, whereas 29.3% of the MSSA strains were T5 (Table 1). These results are in agreement with previous reports noting the predominance of the type 5 serotype among MRSA isolates (7, 16, 19). We also noted that the MSSA strains had a strong association with the type 8 serotype. For suppurative and/or invasive infections, when clinical isolates were classified by clinical syndrome there was a relative equal distribution of the capsular type for each clinical entity except for necrotizing pneumonia, for which we noted a significant predominance of T8, and for bacteremia, for which we noted a significant predominance of T5. These significant differences were not associated with an overrepresentation of clonal MRSA since most of the isolates from necrotizing-pneumonia were MSSA and since there was an approximately equal repartition of MRSA and MSSA isolates from bacteremia. Watts et al. showed that a T5 strain survived preferentially in the bloodstream of infected mice challenged with a mixed inoculum containing T5 and T8 strains (26). Na'was et al. showed in a previous study that capsular type 8 was the prevalent type in MSSA involved in non-necrotizing pneumonia (16). Isolates associated with toxin-associated syndromes, in particular strains involved in NTED, had all a T5. These strains isolated in Japan all corresponded to the New York/Japan clone. Strains involved in TSSS had all a T8, like previous results which showed that toxic shock syndrome toxin 1-positive strains were predominantly T8 (13). Thus, we confirm that capsular polysaccharide T5 and T8 are predominant among clinical isolates.

Although the type 5 and type 8 serotyping method allowed typing of only 87% of the strains (169 of 195), we developed a PCR method to characterize *S. aureus* capsular types at the molecular level. The *cap5* or *cap8* locus was present in all clinical isolates including the 26 strains found to be nontypeable by the serotyping method. Cocchiaro et al. observed the same results and showed that nontypeable strains positive for the *cap5* or *cap8* locus present a lack of capsule expression (2). Three mechanisms can account for the lack of capsule expression by *S. aureus* isolates that carry the *cap5* or *cap8* locus but fail to produce capsular polysaccharide: random point mutations in essential *cap* genes may result in nonfunctional biosynthetic enzymes; mutations in regulatory loci can also result in a capsular polysaccharide-negative phenotype and mutation in promoter can affect capsular polysaccharide production at the transcriptional level (2). Cocchiaro et al. suggest that only four capsular serotypes exist (1, 2, 5, and 8), although some of the older literature suggests that 11 serotypes exist (18, 23). These data are important for vaccine development because although 80 to 90% of clinical isolates produce capsular polysaccharide type 5 or 8, a type 5/type 8 capsular vaccine would be inadequate for 10 to 20% of strains that are nontypeable or noncapsular. These nonencapsulated strains can express the 336 polysaccharide. Antigen 336 has been described as a polyribitol-*N*-acetylglucosamine containing polymer that resembles cell wall teichoic acid (14, 17). In the present study, all nontypeable strains were demonstrated to have the 336 phenotype (Table 2). If we considered our results, while a capsular type 5 and 8 vaccine protects against 87% of *S. aureus* infection isolates, the addition of the 336 antigen to this vaccine should increase the coverage to 100% of all *S. aureus* infection isolates. Thus, a future generation of the vaccine to prevent staphylococcal infection could include antigen 336.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the clinicians and microbiologists who sent us clinical data and isolates. We thank Caroline Bouveyron, Christine Courtier, Christine Gardon, Lys Mayor, Celine Spinelli, and Lauren Tornetta for technical assistance.

REFERENCES

1. **Arbeit, R. D., W. W. Karakawa, W. F. Vann, and J. B. Robbins.** 1984. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **2**:85–91.
2. **Cocchiaro, J. L., M. I. Gomez, A. Risley, R. Solinga, D. O. Sordelli, and J. C. Lee.** 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **59**:948–960.
3. **Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J. Clin. Microbiol. **44**:847–853.
4. **Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, and B. G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:7687–7692.
5. **Fattom, A. I., G. Horwith, S. Fuller, M. Propst, and R. Naso.** 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *Staphylococcus aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. Vaccine **22**:880–887.
6. **Ferry, T., M. Bes, O. Dauwalder, H. Meugnier, G. Lina, F. Forey, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones. J. Clin. Microbiol. **44**:2642–2644.
7. **Fournier, J. M., A. Bouvet, A. Boutonnier, A. Audurier, F. Goldstein, J.**

Pierre, A. Bure, L. Lebrun, and H. K. Hochkeppel. 1987. Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **25**:1932–1933.

8. **Garnier, F., A. Tristan, B. Francois, J. Etienne, M. Delage-Corre, C. Martin, N. Liassine, W. Wannet, F. Denis, and M. C. Ploy.** 2006. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. Emerg. Infect. Dis. **12**:498–500.
9. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, J. C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piemont, N. Brousse, D. Floret, and J. Etienne.** 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet **359**:753–759.
10. **Hochkeppel, H. K., D. G. Braun, W. Vischer, A. Imm, S. Sutter, U. Staeubli, R. Guggenheim, E. L. Kaplan, A. Boutonnier, and J. M. Fournier.** 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. J. Clin. Microbiol. **25**:526–530.
11. **Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. **70**:631–641.
12. **Karakawa, W. W., J. M. Fournier, W. F. Vann, R. Arbeit, R. S. Schneerson, and J. B. Robbins.** 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **22**:445–447.
13. **Lee, J. C., M. J. Liu, J. Parsonnet, and R. D. Arbeit.** 1990. Expression of type 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **28**:2612–2615.
14. **Ma, J., J. Cocchiaro, and J. C. Lee.** 2004. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. J. Dairy. Sci. **87**:178–182.
15. **Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe.** 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **29**:2240–2244.
16. **Na'was, T., A. Hawwari, E. Hendrix, J. Hebden, R. Edelman, M. Martin, W. Campbell, R. Naso, R. Schwalbe, and A. I. Fattom.** 1998. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. J. Clin. Microbiol. **36**:414–420.
17. **O'Brien, C. N., A. J. Guidry, A. Fattom, S. Shepherd, L. W. Douglass, and D. C. Westhoff.** 2000. Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. J. Dairy Sci. **83**:1758–1766.
18. **O'Riordan, K., and J. C. Lee.** 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin. Microbiol. Rev. **17**:218–234.
19. **Roghmann, M., K. L. Taylor, A. Gupte, M. Zhan, J. A. Johnson, A. Cross, R. Edelman, and A. I. Fattom.** 2005. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. J. Hosp. Infect. **59**:27–32.
20. **Sau, S., N. Bhasin, E. R. Wann, J. C. Lee, T. J. Foster, and C. Y. Lee.** 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. Microbiology **143**:2395–2405.
21. **Shinefield, H., S. Black, A. Fattom, G. Horwith, S. Rasgon, J. Ordonez, H. Yeoh, D. Law, J. B. Robbins, R. Schneerson, L. Muenz, S. Fuller, J. Johnson, B. Fireman, H. Alcorn, and R. Naso.** 2002. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. N. Engl. J. Med. **346**: 491–496.
22. **Shinefield, H. R., and S. Black.** 2005. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections: advances in vaccine development. Expert Rev. Vaccines **4**:669–676.
23. **Sompolinsky, D., Z. Samra, W. W. Karakawa, W. F. Vann, R. Schneerson, and Z. Malik.** 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J. Clin. Microbiol. **22**:828–834.
24. **Takahashi, N., H. Nishida, H. Kato, K. Imanishi, Y. Sakata, and T. Uchiyama.** 1998. Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. Lancet **351**:1614–1619.
25. **Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis. **9**:978–984.
26. **Watts, A., D. Ke, Q. Wang, A. Pillay, A. Nicholson-Weller, and J. C. Lee.** 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect. Immun. **73**:3502–3511.

2. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis

Gerard Lina, **Géraldine Durand**, Corina Berchiche, Benjamin Short, François Vandenesch, Jerome Etienne et Mark C. Enright.

Soumise le 23/01/2006, acceptée le 04/06/2006

Clinical Microbiology and Infection 2006; 12: 1175-1184

L’avènement du séquençage multilocus de 7 gènes de ménage (MLST) a permis de mieux comprendre l’évolution moléculaire des SARM [152]. L’objectif de cette étude était de développer une technique de séquençage multilocus de la cassette SCC*mec* dans le même esprit que le MLST afin de mieux comprendre l’évolution phylogénique de la cassette de résistance à la méticilline.

L’étude incluait 71 souches de SARM hospitaliers et communautaires appartenant à des lignées phylogénétiques différentes. Quatre loci situés au niveau du complexe des gènes de recombinases ont été selectionnés pour le séquençage multilocus de la cassette SCC*mec* : les gènes de recombinases *ccr*A et *ccr*B, le gène *ccu* codant une protéine de fonction inconnue, et le gène *cch* codant une protéine helicase-like (Annexe 1).

Pour chacun des 4 loci, les différents allèles identifiés ont été désignés par un numéro arbitraire (*cch* 1 à 8; *ccr*A 1, 2, 3, 5 à 9, *ccr*B 5 à 8 et *ccu* 1 à 9). Pour une souche, la combinaison de 4 allèles a permis de lui assigner un profil allélique dit ST-SCC*mec* désigné également par un numéro arbitraire. Nous avons identifié 21 profils alléliques ST-SCC*mec*.

L’analyse des déséquilibres de liaison génétique entre les différents ST-SCC*mec* a révélé la structure clonale des cassettes SCC*mec* bien que quelques événements de recombinaison génétiques aient été détectés.

L’analyse phylogénétique a montré que les 21 ST-SCC*mec* étaient répartis en 5 groupes phylogéniques (A, B, C, D et E).

Nous avons observé une étroite corrélation entre le type SCC*mec* et le profil allélique du complexe des gènes recombinase (ST-SCC*mec*), à une exception près, la présence du profil allélique ST-SCC*mec* 1 au niveau de deux types de cassette : SCC*mec* de type I et IV. La cassette SCC*mec* I était composée des *sequence type* ST-SCC*mec* 1 et 2 appartenant au groupe A, la cassette SCC*mec* II, des ST-SCC*mec* 3, 4, 5, 6, 12 ou 15 appartenant au groupe D, la cassette SCC*mec* III, du ST-SCC*mec* 9 (groupe B). Le type SCC*mec* IV était composé de profils allèliques appartenant à des groupes phylogéniques différents : ST-SCC*mec* 1 (groupe A), ST-SCC*mec* 17 et ST-SCC*mec* 21 (groupe C), ST-SCC*mec* 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 et 18 (groupe D) et ST-SCC*mec* 19 (groupe E).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre la lignée phylogénétique ST-SCC*mec* et le fond génétique des SARM. Ces données confirment bien l'acquisition indépendante de la cassette SCC*mec* par différentes lignées phylogénétiques de *S. aureus*. Par ailleurs l'élément SCC*mec* IV ST-SCC*mec*10 a été détecté au niveau de tous les complexes clonaux de SARM, qu'ils soient nosocomiaux ou communautaires. Cet élement semble facilement transmissible.

Notre participation à ce travail a concerné les activités de typage de la cassette SCC*mec* et de séquençage que Corina Berchich avait initiées.

 10.1111/j.1469-0691.2006.01548.x

Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis

G. Lina[1,2], G. Durand[1], C. Berchich[1], B. Short[2], H. Meugnier[1], F. Vandenesch[1], J. Etienne[1] and M. C. Enright[2]

[1]INSERM E0230, Université Lyon 1, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Lyon, France and [2]Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College, London, UK

ABSTRACT

Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) elements within major lineages of healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones were characterised using intra-SCC*mec* multilocus sequencing. A strong correlation was observed between sequence- and PCR-based typing methods ($p < 0.001$). However, phylogenetic analysis of the SCC*mec* locus using concatenated sequences evidenced few recombination events. Sequence type (ST)-SCC*mec*I was found in SCC*mec* elements types I and IV, suggesting the evolution of an SCC*mec*I element into an SCC*mec*IV element. This coincided with the spread of the clone harbouring this SCC*mec* element into the community. No correlation was observed between ST-SCC*mec* lineage and MRSA lineage, confirming multiple acquisitions of SCC*mec* by *S. aureus*. This was exemplified by the SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 element, which was detected in all of the clonal complexes examined, including healthcare- and community-associated MRSA. The acquisition of this SCC*mec* element was five- to ten-fold more common than that of others. Models of MRSA clone evolution suggest that this SCC*mec* was first found in the paediatric clone.

Keywords Clones, evolution, MRSA, SCC*mec*, *Staphylococcus aureus*, typing

Original Submission: 23 January 2006; **Revised Submission:** 10 April 2006; **Accepted:** 4 June 2006

Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1175–1184

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is an important human pathogen that causes a wide variety of community- and healthcare-associated infections [1]. This Gram-positive bacterium has a proven ability to adapt to the selective pressure of antibiotics. *S. aureus* was initially methicillin-sensitive, but strains resistant to this antibiotic were isolated soon after its introduction [2]. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was recovered initially from hospitals and nursing homes, but has recently emerged in the community [3]. MRSA is now a worldwide health problem.

Corresponding author and reprint requests: G. Lina, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, INSERM E0230, IFR62, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France
E-mail: gerard.lina@chu-lyon.fr

S. aureus becomes resistant to methicillin following acquisition of the methicillin resistance gene *mecA* [4]. This gene is carried on a mobile genetic element, the staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) [5], and it is believed that *mecA* was acquired originally from a distantly related species [6]. SCC*mec* comprises a group of mobile DNA elements, 21–67 kb in size, which are integrated into the *S. aureus* chromosome at a unique site, *attBscc*, in an open reading frame (ORF) of unknown function (*orfX*) which is near the origin of replication [7]. To date, five different SCC*mec* types have been characterised in *S. aureus* [8–10]. All SCC*mec* types contain specific DNA fragments that are used for their classification, and two gene complexes: the *mec* gene complex and the *ccr* gene complex. All *mec* complexes contain the *mecA* gene, a copy of IS*431* and, when present, complete or truncated *mecA* regulatory genes, *mecI* and *mecR1*, and two adjacent ORFs. In the five SCC*mec* types, the *mecA* gene, the untruncated

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

region of *mecR1* and the ORFs are highly conserved, with almost identical sequences (>99% sequence homology). The *ccr* complex consists of the *ccr* genes, *ccrA* and *ccrB*, in combination (*ccrAB*) in SCC*mec*I–IV, or *ccrC* alone in SCC*mec*V, as well as four adjacent ORFs. All these genes show interesting diversity, with sequence identity varying from 41% to 97% between SCC*mec* types. The remainder of the SCC*mec* element, i.e., outside the *mec* and *ccr* complexes, contains genes that are considered non-essential for methicillin resistance and SCC*mec* excision and transfer. SCC*mec* identification and typing is PCR-based, using primers directed towards variation in the *mec* and *ccr* complexes [11,12].

Multilocus sequence typing (MLST) has become the most common method for examining the way in which bacterial populations and, in particular, bacterial clones evolve [13]. Using a high-resolution MLST method, based on the sequences of seven housekeeping and seven surface protein (*sas*) genes, Robinson and Enright [14] have proposed evolutionary models that detail how MRSA clones have evolved. However, no sequence-based typing method that examines the SCC*mec* element is currently available. Consequently, SCC*mec* diversity has not been well-characterised and there are no models of SCC*mec* evolution. To address these issues, the present study describes a multilocus typing method for SCC*mec*, based on *ccr* gene complex polymorphisms.

MATERIALS AND METHODS

Strain selection

Previous studies have demonstrated that MRSA strains emerged from distinct lineages of *S. aureus* in the hospital and in the community [3,14]. Seventy-one of these isolates (Table 1) were selected to represent all distinct lineages of healthcare- and community-associated MRSA, using the CDC definition (http://www.cdc.gov). Isolates were stored at −80°C and grown overnight on sheep blood 5% v/v agar plates at 37°C. These isolates were also analysed by Robinson and Enright [14] when formulating their proposed evolutionary model for the emergence of MRSA.

MLST

MLST was performed as described by Enright *et al.* [15]. In brief, seven housekeeping genes were used in the scheme; for each isolate, the alleles at each of the seven loci defined the allelic profile, which corresponded to a sequence type (ST) and defined a clonal complex (CC) for groups of STs that shared five of seven alleles. ST and CC designations were those assigned by the MLST database (http://www.mlst.net).

mecA detection and SCC*mec* typing

The presence of *mecA* was determined by PCR using primers MR1 and MR2 to amplify a 1339-bp internal fragment of the gene [11]. PCR comprised 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 2 min at 72°C. SCC*mec* types I, II, III, IV and V were assigned by PCR analysis of the *ccr* and *mec* genes, as described by Ito *et al.* [8,10].

Gene selection

The aim of the present study was to investigate evolutionary relationships among SCC*mec* elements. Initially, an attempt was made to select seven different genes along the SCC*mec* elements in order to perform a population genetic analysis. Since the sequences of homologous genes in the *mec* gene complex were almost identical, and thus poorly informative, genes were selected from the *ccr* gene complex. Only four genes were good candidates (Table 2). These genes encoded a superfamily II helicase-like protein (gene designated *cch*, for cassette chromosome helicase), a cassette chromosome recombinase A (*ccrA*), a cassette chromosome recombinase B (*ccrB*) and a gene for a conserved unknown protein (*ccu*). The *cch* and *ccu* genes are located at either end of the *ccr* gene complex, while *ccrA* and *ccrB* are found close to *cch*. The *cch*, *ccrA* and *ccrB* genes are present in *ccr* gene complexes from SCC*mec*I–IV, and *ccu* is present in SCC*mec*I–V. The DNA sequences of the genes, and the deduced amino-acid sequences of their protein products, were aligned to identify the most variable regions using the GenBank database (Table 2; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/). Primers were designed manually from the sequences of the highly conserved regions that flanked the most variable regions (Table 3). Each primer pair amplified an internal fragment of the gene (371–513 bp) and permitted accurate sequencing of fragments of the same size on both strands.

Amplification and nucleotide sequencing

DNA was isolated using a DNeasy kit (Qiagen, Crawley, UK), and was then used as an amplification template with the primers (MWG, Ebersberg, Germany) described in Table 3. Thermal cycling conditions comprised 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 45 s at 72°C, followed by 10 min at 72°C. PCR products were analysed by electrophoresis on agarose (Sigma, Gillingham, UK) 1% w/v gels. Amplified products were precipitated with polyethylene glycol 20% w/v plus 2.5 M NaCl, and were then resuspended in cold ethanol 70% v/v, and re-precipitated. The sequences of both strands were determined using an ABI Prism 377 DNA sequencer with BigDye version II fluorescent terminators (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the primers used in the initial PCR amplification, as described previously [15]. The stability of the method was monitored by three serial analyses of ten randomly selected isolates (data not shown).

Nucleotide sequence variations and phylogenetic analysis

The sequences of the four loci were determined for each *S. aureus* isolate, and each locus was assigned an allelic number. Each single-nucleotide variation was allocated a new allelic number in the order of description, except for *ccrA* and *ccrB* 1–4, which were designated according to their previous nomenclature [10,16]. Alleles of all four loci defined the allelic profile, which corresponded to the sequence type (ST-SCC*mec*).

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

Table 1. *Staphylococcus aureus* strains included in the study, together with their characteristics

Strain	Country	Origin[a]	MLST[b]	Clonal complex	PCR SCC*mec*[c]	*cch*	*ccrA*	*ccrB*	*ccu*	ST- SCC*mec*
HT20010754	USA	CA-MRSA	1	1	IV	4	8	7	4	10
HT20010254, MW2	USA	CA-MRSA	1	1	IV	4	5	6	4	7
HT20010637, 8	Tahiti	HA-MRSA	1	1	IV	4	8	7	3	17
HT20030826, HT20050087	Australia, France	CA-MRSA	1	1	V	NT	NT	NT	9	NT
EMRSA3	UK	HA-MRSA	5	5	I	1	1	1	1	1
BK2464, HT20010753, HT20010757	USA, France	HA-MRSA	5	5	II	2	2	2	2	3
Belgium97S101	Belgium	HA-MRSA	5	5	III	3	3	3	3	9
HDE288, BK519, HT20030416, HT20020212 (Pediatric clone)	Portugal, USA, France	HA-MRSA	5	5	IV	4	8	7	4	10
HT20030749, HT20030095, HT20030228*	France	CA-MRSA	5	5	IV	1	1	1	1	1
99ST10345	Eire	HA-MRSA	8	8	II	6	6	2	2	5
BK59	USA	HA-MRSA	8	8	II	8	5	2	2	6
Btn1823, Btn1825	UK	HA-MRSA	8	8	II	6	6	2	2	5
EMRSA2	UK	HA-MRSA	8	8	IV	2	8	7	6	8
A980158, HT20020303	France	HA-MRSA	8	8	IV	4	8	7	4	10
HT20020304	France	HA-MRSA	8	8	IV	4	8	3	4	19
99ST22111	Australia	CA-MRSA	8	8	IV	4	NT	NT	7	0
HT20010251	Australia	CA-MRSA	8	8	IV	6	9	3	4	20
HT20030203	Australia	CA-MRSA	8	8	IV	7	8	7	3	21
HT20020279	France	HA-MRSA	22	22	IV	2	8	7	5	16
98/10618	UK	HA-MRSA	22	22	IV	2	8	7	6	8
Phenol27111	Eire	HA-MRSA	22	22	IV	4	8	7	4	10
SwedenAO17934/97	Sweden	HA-MRSA	30	30	IV	5	8	7	4	18
WG10049	Australia	CA-MRSA	30	30	IV	9	7	8	4	14
WW2703/97	Germany	HA-MRSA	30	30	IV	4	8	7	4	10
HT20020299, HT20020300, HT20020301, BTN766	France, UK	HA-MRSA	36	30	II	4	5	2	2	12
MRSA252	UK	HA-MRSA	36	30	II	4	2	2	2	4
Belgium97S100	Belgium	HA-MRSA	45	45	II	4	8	4	4	15
CDC8	USA	HA-MRSA	45	45	II	2	2	2	2	3
Fin76167	Finland	HA-MRSA	45	45	IV	5	8	7	4	18
Germany825/96	Germany	HA-MRSA	45	45	IV	4	8	7	4	10
HT20010751	USA	CA-MRSA	59	59	IV	4	8	7	4	10
Fin62305	Finland	HA-MRSA	59	59	IV	4	8	7	4	10
HT20020221, HT20020213	France	CA-MRSA	80	80	IV	4	8	7	4	10
HT20030058	France	CA-MRSA	80	80	IV	5	8	7	8	13
HT20010634	Australia	CA-MRSA	93	93	IV	4	8	7	4	10
HT20020310	Germany	HA-MRSA	228	5	I	1	1	1	1	1
HT20020311, HT20020312	Germany	HA-MRSA	228	5	I	1	1	5	1	2
ANS46, A6685, A860182, HT20010531, HT20010533, HT20020273, HT20010528, HT20010537, HT20020307	Australia, France, China, Brazil, Finland	HA-MRSA	239	8	III	3	3	3	3	9
HT20010550	France	HA-MRSA	241	8	III	3	3	3	3	9
82MRSA	Belgium	HA-MRSA	247	8	I	1	1	1	1	1
A970271	France	HA-MRSA	247	8	I	1	1	1	1	1
COL, EMRSA8	UK	HA-MRSA	250	8	I	1	1	1	1	1
HT20020270 (archaic clone)	Spain	HA-MRSA	250	8	I	1	1	1	1	1
KD12719, KD6505	UK	HA-MRSA	254	8	I	1	1	1	1	1
EMRSA10, Germany1442/98	UK, Germany	HA-MRSA	254	8	IV	2	8	7	1	11

[a]Healthcare and community-associated MRSA origin was determined using the CDC definition (http://www.cdc.gov).
[b]MLST was performed as described by Enright *et al.* [15].
[c]SCC*mec* types I, II, III, IV and V were assigned by PCR analysis as described by Ito *et al.* [8,10].
NT, not typeable; CA-MRSA, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; HA-MRSA, hospital-acquired *Staphylococcus aureus*.

ST-SCC*mec*s were assigned arbitrary numbers in order of description. Polymorphic sites were identified using Mega3 [17]. For each polymorphic site, synonymous and non-synonymous base-pair substitutions were identified, and the d_S/d_N ratio of synonymous to non-synonymous base-pair substitutions was calculated using the SNAP program (available at http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/SNAP), based on the method of Nei and Gojobori [18]. The gene sequences were aligned with the multiple-alignment program ClustalX [19].

Phylogenetic analysis

Split decomposition analysis was performed with SplitsTrees v.3.2 [20] using the Hamming correction and SplitDecomposition. Recombinations effectively cause lineages to coalesce in time, resulting in trees that have reticulations or a network structure, rather than the simple branching structure seen with most phylogenies. Split decomposition does not force evolutionary relationships to be strictly bifurcating or multi-branching, but permits network relationships. A split decomposition graph will look less tree-like and more net-like as the influence of recombination becomes stronger.

The index of association (I_A) was calculated as described previously by Smith *et al.* [21], using the LIAN 3.1 program [22].

Statistical analysis

Sequence-based ST-SCC*mec* identification, PCR-based typing results and MLST relationships were described on a two-by-two basis and were validated by matched-pair analysis using the statistical program SPSS v.12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

Table 2. Gene candidates for developing SCC*mec* sequence typing analysis

SCC*mec*I NCTC10442 (AB033763)[a]	SCC*mec*II N315 (D86934)[a]	SCC*mec*III 85/2082 (AB037671)[a]	SCC*mec*IV JCSC1968 (AB063172)[a]	SCC*mec*V WIS (AB121219)[a]	Nucleotide sequence identity (%)
mec gene complex					
mecR1	*mecR1*	*mecR1*	*mecR1*	*mecR1*	100[b]
mecA	*mecA*	*mecA*	*mecA*	*mecA*	99.9–100
CE025	CN038	CZ029	CQ005	V005	99.8–100
CE026	N039	CZ030	CQ007	V004	100
E040	N062	Z035	Q012	V003	99.7–100
ccr gene complex					
E026 (*cch*)	N031	Z004	Q003		60.9–86.1
ccrA1	*ccrA2*	*ccrA3*	*ccrA2*		74.2–97.3
ccrB1	*ccrB2*	*ccrB3*	*ccrB2*	*ccrC*	76.1–96.3
E031	N041	Z011	Q007	V016	57.5–86.3
E032	N042	Z013	Q008	V017	41.3–93.9
E033 (*ccu*)	N043	Z014	Q009	V019	65.9–96.9

This table was constructed using conserved genes between SCC*mec*I and IV [8,10,33] and data from GenBank.
[a]GenBank accession number.
[b]Comparing undeleted region.
cch, cassette chromosome helicase gene; *ccu*, cassette chromosome unknown gene.

Table 3. Primers used for PCR amplification

Gene	Primer pair	Oligonucleotide sequence (5′–3′)	Fragment length (bases)
cch	cch-F	MAATCGTGAASAWGAAGTYATTMAATGGTT	371
	cch-R	GCAATSATTTTBACYTSGATATGRTYATCTT	
ccrA	ccrA-F	TCRGADAAYCARCTVAAACAAAARATCAAATG	477
	ccrA-R	TATAGGGRTRCARYATGTTTARCGTGAAAC	
ccrB	ccrB-F	TATCGTAAAATAGCSAATGCAYTVAATCACAAAGG	513
	ccrB-R	ACTTTATCACTTTTGACAATTTCRAGTATTTG	
ccu	ccu-F	GCTATTTACTCAAGAAAACATGGGAT	411
	ccu-R	GGRTTKARTGGRTGCATRATTTCATTTGT	

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences of all alleles of *cch*, *ccrA*, *ccrB* and *ccu* have been deposited in GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) under accession numbers DQ483060–DQ483093.

RESULTS

Sequence diversity

To develop a multilocus typing method that could help to characterise the evolution of SCC*mec* elements, fragments of four genes of the *ccr* gene complex within SCC*mec* were amplified and sequenced. PCR products were obtained for all four gene fragments for 68 of 71 *S. aureus* isolates that had been characterised previously using MLST. The three non-typeable isolates were: (i) one SCC*mec*IV ST8 isolate from Australia, which was only positive for *ccu* and *cch*, but always negative for *ccrA* and *ccrB*, even with low-stringency PCR conditions; and (ii) two SCC*mec*V isolates ST152/377 (one from Australia and the other from France), which were only positive for *ccu*, as expected, because *cch*, *ccrA* and *ccrB* are absent from the SCC*mec*V element (Table 1). All PCR products were sequenced; the sequenced fragments were 330–420 bp in length, and the number of alleles was 8–9 (Tables 1, 4 and 5). No *ccrA*4 allele was detected. The partially characterised SCC*mec*IV ST8 isolate from Australia and the two SCC*mec*V isolates had specific *ccu* alleles, as shown in Table 1.

The number of polymorphic sites ranged from 132 to 171, with minimal and maximal diversity observed in *cch* and *ccrB*, respectively (Fig. S1; see Supplementary material). There were no preferential regions of polymorphic sites on the gene fragments, and the percentage of informative sites was similar in all four genes (39–42%). Various single nucleotide polymorphisms corresponding to single mutations were observed. However, the

Table 4. Nucleotide sequence variation among alleles of genes from the *ccr* gene complex

Locus	Size of sequenced fragment	Number of identified alleles	Number of polymorphic sites	Number of informative sites	d_S/d_N
cch	330	9	132	132	3.42
ccrA	366	8	147	144	5.66
ccrB	420	8	171	171	21.17
ccu	339	9	144	144	18.21

GenBank accession numbers are DQ483060–DQ483093.

Table 5. Distribution of ST-SCC*mec* and *cch*, *ccrA*, *ccrB* and *ccu* alleles into SCC*mec* types I–V

SCC*mec* type	ST-SCC*mec*	*cch*	*ccrA*	*ccrB*	*ccu*
I	1	1	1	1	1
I	2	1	1	5	1
II	3	2	2	2	2
II	4	4	2	2	2
II	5	6	6	2	2
II	6	8	5	2	2
II	12	4	5	2	2
II	15	4	8	4	4
III	9	3	3	3	3
IV	1	1	1	1	1
IV	7	4	5	6	4
IV	8	2	8	7	6
IV	10	4	8	7	4
IV	11	2	8	7	1
IV	13	5	8	7	8
IV	14	9	7	8	4
IV	16	2	8	7	5
IV	17	4	8	7	3
IV	18	5	8	7	4
IV	19	4	8	3	4
IV	20	6	9	3	4
IV	21	7	8	7	3
IV	NT	4	NT	NT	7
V	NT	NT	NT	NT	9

NT, not typeable.

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

presence of conserved polymorphic regions in some of the alleles suggested that recombination events had occurred (Fig. S1; see Supplementary material). The d_S/d_N values were >1 for all four genes, indicating that the number of synonymous substitutions (selectively neutral) was larger than the number of non-synonymous substitutions (subject to positive selection) (Table 4). This suggests that non-synonymous substitutions are deleterious and have largely been eliminated. The smallest d_S/d_N value was obtained for *cch*, suggesting that this gene might be evolving more rapidly than the others. The value of d_S/d_N for *ccrB* was a quarter of that obtained for *ccrA*. Thus, the two *ccr* genes seem to have evolved with different evolutionary constraints, even though they are part of the same family.

Population structure using SCC*mec* sequence typing

The population structure of SCC*mec* was investigated by comparing the level of linkage disequilibrium between the ST-SCC*mec* alleles, as assessed in terms of the I_A. The I_A using ST-SCC*mec* was 0.5286, which is significantly different from the null hypothesis of linkage equilibrium of loci (p 0.01). The I_A for ST-SCC*mec* was similar to that obtained with MLST using the same isolates ($I_A = 0.5377$; p 0.01). This suggests that even though recombination has occurred in the evolution of SCC*mec*, this has not been frequent, resulting in a largely clonal population.

Phylogenetic analysis

A split decomposition graph was constructed from the concatenated 1455 nucleotides of the four gene fragments of the *ccr* gene complex of SCC*mec* (Fig. 1). There was some evidence of networking, which may reflect homoplasies and/or recombination between ST-SCC*mec*. Five major clusters were identified. Clusters B and E were formed by singletons (ST-SCC*mec*9 and ST-SCC*mec*19, respectively). Cluster A was formed by ST-SCC*mec*1 and 2, cluster C by ST-SCC*mec*17 and 21, and cluster D by the other ST-SCC*mec* elements. Making the assumption that all homoplasies reflect recombination, clusters C and E could have arisen as the result of recombination between ST-SCC*mec* elements from clusters D and B, and D and A, respectively. Similarly, the subgroup formed by ST-SCC*mec*3, 4, 6, 12 and 20 could be the result of recombination in cluster D between ST-SCC*mec*5 and the other ST-SCC*mec* types.

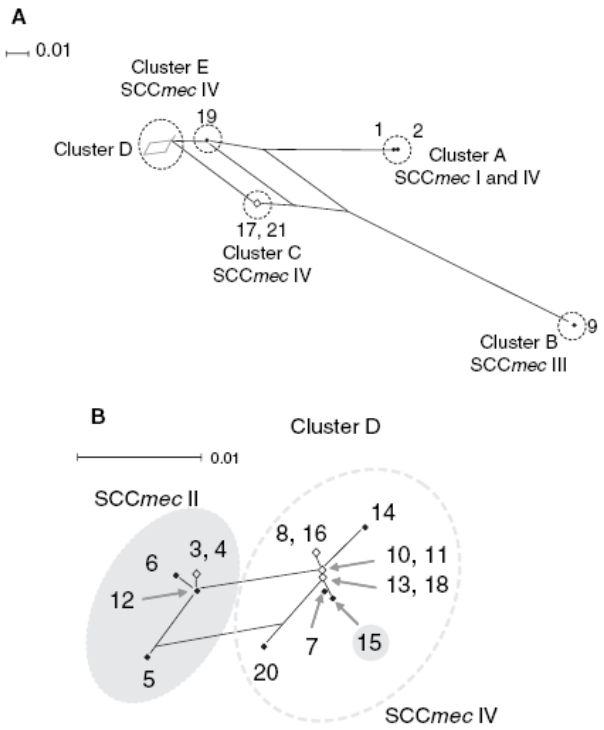


Fig. 1. Split decomposition graph of the four gene fragments of the *ccr* gene complex of SCC*mec*. (A) All isolates. (B) Details of cluster D. The SCC*mec* type is added. Clusters are circled in black. In Cluster D, SCC*mec*II elements are in the grey area and SCC*mec*IV elements are circled in grey.

Comparison of SCC*mec* types and gene sequence analysis

PCR-based SCC*mec* typing results were compared with sequence-based ST-SCC*mec* identification results (Table 5). SCC*mec*I, II, III and IV were composed of two, six, one and 13 different ST-SCC*mec* elements, respectively. SCC*mec*I was either ST-SCC*mec*1 or 2 from cluster A, SCC*mec*II was either ST-SCC*mec*3, 4, 5, 6, 12 or 15 from cluster D, and SCC*mec*III was ST-SCC*mec*9 from cluster B. SCC*mec*IV showed greater diversity and belonged to clusters A (ST-SCC*mec*1), C (ST-SCC*mec*17 and 21), D (ST-SCC*mec*7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 and 18) and E (ST-SCC*mec*19). A strong correlation was observed between PCR-based

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

typing and sequence-based typing methods ($p < 0.001$). Notable exceptions were ST-SCC*mec*1, which was found in SCC*mec* elements I and IV, and SCC*mec*II ST-SCC*mec*15, which was more similar to SCC*mec*IV ST-SCC*mec*7 than to other SCC*mec*II ST-SCC*mec* elements (Fig. 1; Tables 1 and 5). The specificity of alleles for each gene within SCC*mec* types I–IV was examined. Three alleles of *ccrA* and *ccu*, and two alleles of *cch*, were found in different SCC*mec* types, while only one *ccrB* allele was found in two different SCC*mec* types. The *ccrB* gene appeared to be the best target for proposing a new sequence-based SCC*mec* typing system, based on only one SCC*mec* gene.

Evolution of SCC*mec* in major MRSA clones

Correlation between *S. aureus* lineage and SCC*mec* element ST was determined by examining the distribution of ST-SCC*mec*s in each MRSA lineage. No correlation was observed between the MRSA clonal complex and the ST-SCC*mec* type (p 0.43). As shown in Table 6, various ST-SCC*mec* elements were observed within the same CC and MLST type. Moreover, when the evolutionary models of MRSA [14] were compared with the ST-SCC*mec* results, SCC*mec* replacement by other types in different lineages was confirmed (Fig. 2). In CC8, SCC*mec*IV ST-SCC*mec*8 was replaced by SCC*mec*II ST-SCC*mec*5 in one lineage, and SCC*mec*I ST-SCC*mec*1 was replaced by SCC*mec*IV ST-SCC*mec*11 in another. In CC22, SCC*mec*IV ST-SCC*mec*8 was replaced by SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10. Such SCC*mec* replacement could have happened in CC45 and CC30, but affiliations in these CCs were not sufficiently clear to be certain of their origin.

Table 6. Detection of SCC*mec*I–IV and ST-SCC*mec* in the major MRSA clonal complexes

		No. of isolates in each *Staphylococcus aureus* clonal complex								
SCC*mec*	ST-SCC*mec*	1	5	8	22	30	45	59	80	93
I	1		2	8						
I	2		2							
II	3		3				1			
II	4					1				
II	5			3						
II	6			1						
II	12					4				
II	15						1			
III	9		1	10						
IV	1		3							
IV	7	2								
IV	8			1	1					
IV	10	1	4	7	1	1	1	2	2	1
IV	11			2						
IV	13								1	
IV	14					1				
IV	16				1					
IV	17	1								
IV	18					1	1			
IV	19			1						
IV	20			1						
IV	21			1						

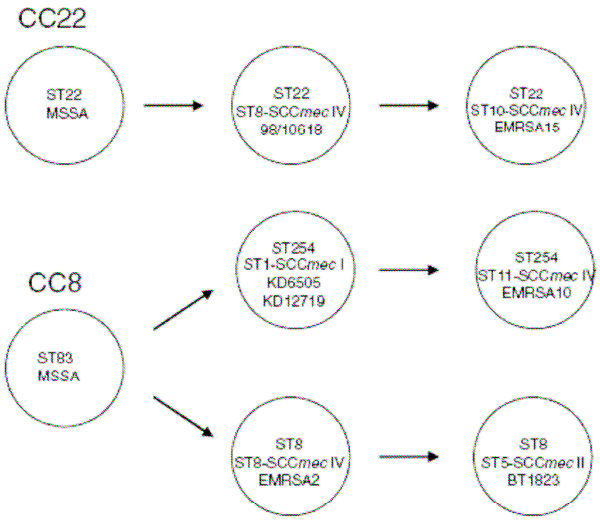


Fig. 2. Proposed evolutionary model of SCC*mec* element replacements in MRSA clonal complexes. The evolutionary models of staphylococcal lineage were based on maximum parsimony analysis of the combined *sas*, housekeeping gene and *spa* typing results [14].

Migration of the SCC*mec* element between *S. aureus* lineages was analysed by the identification of identical SCC*mec* elements (based on PCR plus ST-SCC*mec* typing) in different CCs (Table 6). Fourteen of the 20 SCC*mec* types were found in only one CC; five were found in two CCs. Most extraordinarily, SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 was found in all the CCs examined (1, 5, 8, 22, 30, 45, 59, 80 and 93).

Finally, a link between SCC*mec* ST and the origin of the MRSA clones (healthcare- or community-associated) was investigated. Except for the aforementioned SCC*mec*IV ST-SCC*mec*1, all SCC*mec*IV community-associated MRSA strains were from cluster D (ST7, 10, 13 and 14). Distribution of ST-SCC*mec* between community- and healthcare-associated MRSA strains did not differ significantly (p 0.14). An identical SCC*mec*IV element, ST-SCC*mec*10, was present in both healthcare and community MRSA strains, and this occurred within the same genetic background in ST59, which is a common cause of abscesses in intravenous drug users.

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

DISCUSSION

Clones of *S. aureus* became resistant to methicillin by the acquisition of a mobile genetic element SCC*mec* that carries the methicillin resistance gene. The number of novel variants of SCC*mec* has increased with time [8–10,23], but little is known about the diversity and genetic structure of this important locus. To examine intra-SCC*mec* variation, a novel multilocus typing method was developed. Ideally, this method would have used seven genes that form the *mec* and *ccr* gene complexes, but previous work has shown that *mec* complex genes are largely conserved and are poorly informative [8–10,23]. Since SCC*mec* identification is based on variation in the *mec* and *ccr* complexes, candidate genes were selected from the other conserved part of SCC*mec*, i.e., the *ccr* gene complex. Only four genes were good candidates within the *ccr* gene complex. These comprised two cassette chromosomal recombinase genes, *ccrA* and *ccrB*, and two putative genes located at each extremity of the complex, *cch* and *ccu*. Using these targets, SCC*mec* diversity was investigated in a collection of 71 isolates that represented the major lineages of healthcare- and community-associated MRSA.

Among these isolates, it was possible to sequence-type most of the SCC*mec* I–IV elements. There were high numbers of polymorphic sites in each of the four genes studied. All ST-SCC*mec* elements studied fell into 21 different ST-SCC*mec* types. One SCC*mec*IV element was negative for *ccrA* and *ccrB*, and had a novel *ccu* allele found otherwise only in SCC*mec*V. This SCC*mec*IV may be a novel SCC*mec* type that could be a hybrid between the SCC*mec*IV and SCC*mec*V elements. SCC*mec*II, and especially SCC*mec*IV, showed higher diversity amongst ST-SCC*mec* types.

Interestingly, a strong correlation was observed between ST-SCC*mec* and PCR-based SCC*mec* typing. This suggests that SCC*mec* elements are made up of disparate and inconstant genes (transposons, IS elements, resistance genes and unknown ORFs). The *crr* complex sequence was strongly related to the type of SCC*mec*. Thus, sequences derived from the ST-SCC*mec* appeared representative of the sequence of the entire *SCCmec* element, and could be used to infer SCC*mec* evolution.

An interesting exception to this correlation was the presence of ST-SCC*mec*1 in SCC*mec* I and IV. The archaic clone, which is SCC*mec*I ST-SCC*mec*1 (Table 1), was the first MRSA clone described in the 1960s [2], while the SCC*mec*IV ST-SCC*mec*1 clone was discovered only recently [25]. SCC*mec* I ST-SCC*mec*1 may be the parent of SCC*mec*IV ST-SCC*mec*1. The molecular mechanism responsible for transforming this SCC*mec*I to an SCC*mec*IV is unknown, but could be a genetic excision. It is possible that this event could have occurred in the ST5 *S. aureus* background or via *Staphylococcus epidermidis* strains, as suggested by Wisplinghoff *et al.* [25]. The evolutionary constraints that induced such selection are also unknown. The new SCC*mec*IV ST-SCC*mec*1 clone is responsible for both community- and healthcare-associated infections [24], while all other SCC*mec*I ST-SCC*mec*1 clones are only responsible for healthcare-associated infections [14]. Additionally, most MRSA clones responsible for community-associated infections belong to SCC*mec* type IV [3]. It is tempting to hypothesise that ST-SCC*mec*1 has evolved from SCC*mec*I to IV, thereby enabling a widening of its host range from the hospital to the community.

Phylogenetic analysis of SCC*mec* was conducted using concatenated sequence data from the four gene fragments. Split decomposition analysis showed that most of the SCC*mec* elements were correctly regrouped in accordance with their SCC*mec* type (I–IV). The two exceptions were SCC*mec*IV ST-SCC*mec*1, which grouped with an SCC*mec*I ST-SCC*mec*2 element, and SCC*mec*II ST-SCC*mec*15, which grouped with the SCC*mec*IV elements. The similarity of ST-SCC*mec* sequences in different SCC*mec* types could correspond, instead of homology, to homoplasy, via either convergent evolution of genes selected for ST-SCC*mec* typing (*cch*, *ccrA*, *ccrB* and *ccu*) or secondary loss of *cch*-, *ccrA*-, *ccrB*- or *ccu*-flanking genes targeted during SCC*mec* PCR-typing. Analysis showed some networking for SCC*mec*II and IV, which may reflect recombination. Pairwise comparisons between sequences and concatenated sequences showed close nucleotide changes between alleles that could correspond to recombination or conversion (Fig. S1; see Supplementary material). Redistribution of genes that comprise the *ccr* gene complex between the SCC*mec* elements was also observed (Tables 1 and 5). In contrast to these results, the level of linkage disequilibrium between ST-SCC*mec* alleles suggests that the population

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

structure of SCC*mec* is largely clonal [21]. This probably highlights the fact that the initial stages of SCC*mec* diversification appear to be driven predominantly by point mutation rather than recombination.

No correlation was found between ST-SCC*mec* and MRSA lineage. Different ST-SCC*mec* elements were observed in the same MRSA clonal complex. The results of the present study confirm that MRSA has arisen on multiple occasions within successful lineages by the acquisition of different SCC*mec* elements [14], as many as ten times within CC8 and five times within CC5. Different ST-SCC*mec* elements were observed even in the same MRSA lineage. Some of this variation corresponds to simple point mutations without SCC*mec* type modification, as observed for MRSA ST228 and ST22. However, in CC8, SCC*mec* I ST-SCC*mec*1 has been replaced by SCC*mec* IV ST-SCC*mec*11, and SCC*mec*IV ST-SCC*mec*8 by SCC*mec*II ST-SCC*mec*5. Potentially, SCC*mec*IV replacement by SCC*mec*II has also occurred in MRSA CC30 and ST45. One hypothesis is that different SCC*mec* types entered a similar background strain independently. Another possibility is that a particular SCC*mec* element can be replaced by another, as suggested by Enright *et al*. [26]. The selection that occurred for such a substitution could be the acquisition of new antibiotic resistant genes, and this is possibly the case for the replacement of SCC*mec*IV by SCC*mec*II [8,9]. It is less clear why SCC*mec*I was exchanged for SCC*mec*IV. One working hypothesis is that the acquisition of SCC*mec*IV provides new physiological characteristics, and possibly its smaller size reduces the fitness costs associated with the larger SCC*mec* elements [27]. These observations suggest that different SCC*mec* types confer different fitness characteristics.

The relationship between ST-SCC*mec* and individual MRSA clonal complexes was also examined. Some ST-SCC*mec* types were detected in only one CC, whereas others were found in multiple CCs. Intriguingly, SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 was detected in all of the different MRSA clonal complexes examined. This SCC*mec* was detected even in two different lineages of MRSA CC22 and ST59. SCC*mec* diffusion within *S. aureus* clonal complexes is therefore not homogeneous, and differs even within SCC*mec*IV elements. SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 appears to be the most promiscuous SCC*mec*. The acquisition of this particular SCC*mec* element by *S. aureus* occurred five- to ten-fold more frequently than acquisition of the other elements. It was detected in both healthcare- and community-associated MRSA. SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 was observed in healthcare and community lineages of MRSA ST59, while community-associated MRSA strains carry SCC*mec*IV from other ST-SCC*mec* elements. The oldest MRSA clone that acquired SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 is the paediatric clone (Table 1), which was described first in 1993 [28], almost 5 years before the emergence of community-associated MRSA [3] and the description of other healthcare-associated SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 MRSA clones [14]. It is tempting to speculate that SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 has spread from the paediatric clone to other clones, and in particular to community-associated MRSA SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10, since both clones colonise and infect the paediatric patient [28,29].

The main limitation of this work concerns the assumption that the SCC*mec* element has only evolved within the species *S. aureus* and SCC elements harbouring *mecA*. It has been shown that the SCC*mec* element is present in many other *Staphylococcus* spp., e.g., *S. epidermidis* [25,30] and *Staphylococcus haemolyticus* [31], and that SCC complexes without the *mecA* gene have existed previously [16,32]. Strictly, the model of SCC*mec* evolution proposed in the present study should be confirmed using isolates of *S. aureus* and non-*aureus* staphylococci that are methicillin-resistant and -sensitive. This would indicate whether *S. aureus* SCC*mec* has also evolved independently of *mecA* and/or is derived from non-*S. aureus* SCC elements. Information obtained by intra-SCC multilocus typing combined with SCC*mec* PCR-typing could form the basis of a new general nomenclature for SCC elements.

In conclusion, the intra-SCC*mec* multilocus typing method developed in this study was shown to correlate with PCR-based typing methods, and thus appeared to be representative of the entire SCC*mec* element. SCC*mec* sequence typing suggested that the SCC*mec* population structure is mostly clonal; however, evidence of recombination and the multiple transfer of SCC*mec* within *S. aureus* was detected. Most interestingly, an SCC*mec*IV ST-SCC*mec*10 element was identified that has spread throughout the MRSA clonal complexes, suggesting that it is highly transmissible.

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank E. Feil for scientific advice, A. Molinas for preliminary analysis, and J. C. Thomas and P. Wilkinson for technical assistance. This work was supported financially by the Hospice Civils de Lyon and bioMérieux.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The following supplementary material for this article is available online at http://www.blackwell-synergy.com.

Fig. S1. Polymorphic sites in the four gene fragments *cch*, *ccrA*, *ccrB* and *ccu*.

REFERENCES

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; **339**: 520–532.
2. Jevon MP. Celbenin-resistant staphylococci. *BMJ* 1961; **i**: 124–125.
3. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton–Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 978–984.
4. Matsuhashi M, Song MD, Ishino F *et al*. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1986; **167**: 975–980.
5. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1549–1155.
6. Couto I, Wu SW, Tomasz A, de Lencastre H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *J Bacteriol* 2003; **185**: 645–653.
7. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 486–493.
8. Ito T, Katayama Y, Asada K *et al*. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1323–1336.
9. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K *et al*. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 2002; **186**: 1344–1347.
10. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*C. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2637–2651.
11. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD *et al*. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4289–4294.
12. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2155–2161.
13. Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 2000; **22**: 1115–1122.
14. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3926–3934.
15. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1008–1015.
16. Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1823–1836.
17. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004; **5**: 150–163.
18. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986; **3**: 418–426.
19. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 4876–4882.
20. Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 1998; **14**: 68–73.
21. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4384–4388.
22. Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. Linkage analysis. *Bioinformatics* 2000; **16**: 847–848.
23. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2070–2083.
24. Durand G, Bes M, Meugnier H *et al*. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 847–853.
25. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3574–3579.
26. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 7687–7692.
27. Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bachi B. Fitness cost of SCC*mec* and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2295–2297.
28. de Lencastre H, Couto I, Santos I, Melo-Cristino J, Torres-Pereira A, Tomasz A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**: 64–73.
29. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K *et al.* Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003; **290**: 2976–2984.
30. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4751–4757.
31. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T *et al.* Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* 2005; **187**: 7292–7308.
32. Luong TT, Ouyang S, Bush K, Lee CY. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J Bacteriol* 2002; **184**: 3623–3629.
33. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C *et al.* Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1147–1152.

© 2006 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *CMI*, **12**, 1175–1184

II- Description d'un nouveau clone de SARM portant le gène de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1)

Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital-and community-acquired infections in France

Géraldine Durand, Michèle Bes, Hélène Meugnier, Mark C Enright, Françoise Forey, Nadia Liassine, Aline Wenger, Ken Kikuchi, Gérard Lina, François Vandenesch et Jerome Etienne.

Soumise le 01/09/2005, acceptée le 28/12/2005.

Journal of Clinical Microbiology 2006;44(3):847-853

Le Centre National de Référence des Staphylocoques a observé en 2002 un nombre croissant, en milieu hospitalier et communautaire de souches de SARM possédant le gène *tst* codant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). En France, les souches *tst* postives avaient été décrites jusque là sensibles à la méticilline.

Le premier objectif de cette étude était de caractériser par différents outils moléculaires et phénotypiques toutes les souches françaises *tst*-positives reçues au CNR des Staphylocoques durant la période 2002-2003. Un total de 103 isolats a été inclus dans l'étude.

Parmi les 103 isolats de *S. aureus tst*-positifs, 27 étaient des SARM impliqués à la fois dans des infections nosocomiales (12 cas) et dans des infections communautaires (8 cas). Le site d'acquisition était inconnu dans 7 cas. Ces SARM étaient à l'origine d'infections variées toxiniques ou suppuratives pouvant être fatales. Elles concernaient principalement les enfants avec un âge médian de 3 ans pour l'ensemble des patients.

Parmi ces 27 souches de SARM, 25 appartenaient à un clone majoritaire de type *agr*2, de profil allélique en MLST, ST5 et de type *spa* t002 ou apparenté à t002. Les deux autres isolats appartenaient à un clone minoritaire de type *agr*3 et de profil allélique en MLST, ST30. La caractérisation de la cassette SCC*mec* par la PCR multiplex d'Oliveira et al a montré que les deux clones SARM possédaient le même type de cassette SCC*mec*, le type IV. Ils avaient également le même profil de résistance aux antibiotiques: résistant à la pénicilline, à l'oxacilline, la kanamycine, la tobramycine, de résistance intermédiaire à l'acide fusidique et occasionnellement résistant à l'érythomycine, la lincomycine ou la tétracycline.

En plus du gène *tst*, le clone SARM *agr*2 ST5 possédait de nombreux facteurs de virulence : les gènes codant les enterotoxines SEC, SED, SEL, SEM, SEO et LukED ainsi que des gènes d'adhésines: *clf*A-B, *ebp*S, *eno* et *efb*.

Nous avons comparé le clone SARM *agr*2 ST5 aux grands clones pandémiques. Ce clone était génétiquement proche des clones nosocomiaux ST5 comme le clone Pédiatrique ou le clone NewYork/Japon. Cependant il possédait des différences, soit de la cassette SCC*mec,* soit dans l'habillage toxinique.

Par ailleurs les clones SARM *tst*-positifs *agr*2 et *agr*3 possédaient leurs homologues génotypiques respectifs, sensibles à la méticilline, dotés du même profil en

électrophorèse en champ pulsé excepté le décalage d'une seule bande (Annexe 2). Pour chacun des clones (SARM *tst*-positif *agr*2, SASM *tst*-positif *agr*2, SARM *tst*-positif *agr*3, SASM *tst*-positif *agr*3), nous avons extrait l'ADN correspondant à la bande divergente du gel d'électrophorèse. Nous avons recherché le gène *mec*A par PCR. Il était présent dans la bande de la souche SARM *tst*-positif *agr*2 et dans celle de la souche SARM *tst*-positif *agr*3. Le gène *mec*A était absent dans la bande de la souche SASM *tst*-positif *agr*2 et dans celle de la souche SASM *tst*-positif *agr*3. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le clone SARM *tst*-positif de fond génétique *agr*2 ST5 aurait émergé suite à l'acquisition de la cassette SCC*mec* par un clone de *S. aureus* sensible à la méticilline.

Le clone SARM *tst*-positif *agr*2 a ensuite été baptisé «clone Géraldine» [205].

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2006, p. 847–853 Vol. 44, No. 3
0095-1137/06/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.44.3.847–853.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infections in France

Geraldine Durand,[1] Michèle Bes,[1] Helene Meugnier,[1] Mark C. Enright,[2] Françoise Forey,[1] Nadia Liassine,[3] Aline Wenger,[4] Ken Kikuchi,[5] Gerard Lina,[1] François Vandenesch,[1] and Jerome Etienne[1]*

Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, INSERM E0230, IFR62, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France[1]*; Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom BA2 7AY*[2]*; Bioanalytique-Riotton, Unilabs, 1211 Geneva 2, Switzerland*[3]*; Laboratoire Bactériologie Médicale, Centre Hospitalier Vaudois, CHUV BH 19S-230 CH 1011 Lausanne, Switzerland*[4]*; and Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan*[5]

Received 1 September 2005/Returned for modification 21 November 2005/Accepted 28 December 2005

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones harboring the toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*) gene have been detected in France and in Switzerland since 2002. During a passive survey conducted between 2002 and 2003, we collected 103 *tst*-positive *S. aureus* isolates from 42 towns in France, of which 27 were resistant to methicillin. The *tst*-positive MRSA belonged to two clones: a major clone comprising 25 isolates of sequence type (ST) 5 and *agr* group 2 and a minor clone comprising two isolates of ST30 and *agr*3. The *tst*-positive MRSA clones were associated with both hospital-acquired (12 cases) and community-acquired (8 cases) infections. The MRSA clones were mainly isolated from children (overall median age, 3 years). They caused a variety of clinical syndromes, including toxic shock syndrome and suppurative infections. Both clones were found to harbor a type IV staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) and to have similar antibiotic resistance profiles (usually resistant to oxacillin, kanamycin, and tobramycin and with intermediate resistance to fusidic acid). The origin of these clones is unclear. The *tst*-positive *agr2* MRSA clone has the same sequence type (ST5) of two pandemic nosocomial MRSA clones, namely, the Pediatric clone and the New York/Japan clone. These findings suggest that all these clones are phylogenetically related. The pulsotype of the *tst*-positive MRSA clones differed from that of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) clones by a single band involving the SCC*mec* element. These findings suggest that the *tst*-positive MRSA clones may have emerged from their respective MSSA counterparts.

Staphylococcus aureus is an important human pathogen in both hospitals and the community. The first methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were detected in the hospital setting in the early 1960s. A number of pandemic nosocomial clones have been characterized by molecular methods (3, 24, 25, 34). These epidemic MRSA strains of hospital origin have also been detected in the community, infecting patients with risk factors associated with hospital-acquired MRSA infection (H-MRSA), such as recent hospitalization. The epidemiology of MRSA has changed radically since 1999; in particular, true community-acquired MRSA (C-MRSA) infections have been reported in patients with no clear risk factors (2). These C-MRSA clones predominantly infect young and previously healthy patients and have now spread throughout the world (29). They produce Panton-Valentine leucocidin (PVL) and harbor a type IV staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) element (1, 4, 5, 13, 22, 37).

Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) is a superantigenic toxin secreted by some *S. aureus* isolates. TSST-1, encoded by the *tst* gene, is a major virulence factor in toxic shock syndrome (TSS), staphylococcal scarlet fever, and neonatal toxic shock-like exanthematous diseases (NTED) recently described in Japan and France (11, 16, 38). TSS was first described in 1978 by Todd et al. as a multisystem disease characterized by rapid onset of fever, hypotension, erythematous rash, and mucosal hyperemia, followed by desquamation and multiorgan involvement. TSS was initially linked to tampon use by young women, but non-menstruation-associated TSS now predominates, occurring both in the community and in hospitals secondary to local *S. aureus* infection (10). Musser et al. showed that *tst*-positive *S. aureus* strains were clonal by comparing their isoenzymatic profiles (21), and studies based on multilocus sequence typing (MLST) have recently shown that these strains belong to sequence type (ST) 30 (27). Jarraud et al. reported that most *tst*-positive *S. aureus* strains are genetically related and have a type 3 accessory gene regulator (*agr*) allele (15). The isolates in these studies were associated with community- and hospital-acquired diseases and were all methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA). There have been few reports of MRSA isolates producing TSST-1 in Japan or Germany (12, 30). In 2003, we observed the first French case of NTED due to TSST-1-producing methicillin-resistant *S. aureus* (16, 38).

In order to characterize TSST-1-producing *S. aureus* isolates in France, we retrospectively typed all *tst*-positive isolates sent to the French National Reference Center for Staphylococci in

* Corresponding author. Mailing address: Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, INSERM E0230, IFR62, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. Phone: 33 478 77 86 57. Fax: 33 478 77 86 58. E-mail: jetienne@univ-lyon1.fr.

2002 and 2003 and collected relevant epidemiological and clinical data. We observed the presence of new *tst*-positive MRSA clones responsible for both hospital- and community-acquired infections.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. Among the 1,550 unconstrained strains sent to the French National Reference Center for Staphylococci during 2002 and 2003, 103 isolates from 42 towns were *tst* positive. As controls we used nine *tst*-positive MRSA isolates from Australia (one isolate, provided by Graeme Nimmo), Switzerland (three isolates), and Japan (five isolates causing neonatal toxic shock-like exanthematous diseases, TWCC3812, TWCC390861, TWCC4082, TWCC4382, and TWCC4410) (16). We also used an isolate representative of the Pediatric clone and an isolate representative of the New York/Japan clone.

Data collection. For each *S. aureus* strain we collected relevant clinical information (age, sex, type, and site of infection) by using a standard form provided by the French National Reference Center for Staphylococci. TSS, staphylococcal scarlet fever, and neonatal toxic shock syndrome-like NTED were diagnosed by using published criteria (11, 21, 30, 32). For this study, MRSA infection was considered to be community acquired if the specimen was obtained outside the hospital setting or less than 2 days after hospital admission of a patient with no direct or indirect exposure to the healthcare system in the previous year (2).

DNA extraction. Strains were grown on brain heart infusion agar or in brain heart infusion broth at 37°C overnight. Genomic DNA was extracted with a standard procedure, and its concentration was estimated spectrophotometrically (18). Amplification of *gyrA* was used to confirm the quality of each DNA extract and the absence of PCR inhibitors. All PCR products were analyzed by electrophoresis on ethidium bromide-stained 1% agarose gels (Sigma, France).

Identification of *agr* alleles. The *agr* group (*agr1* to *-4*) was determined by PCR as previously described (15).

Detection of the *mecA* gene and SCC*mec* typing. The *mecA* gene coding for methicillin resistance was detected by PCR as described by Murakami et al. (20). The staphylococcal chromosomal cassette *mec* (SCC*mec* I to IV) was detected by using the method of Oliveira et al. (23). The following reference strains, kindly provided by Herminia de Lencastre and Alexander Tomasz, were used as controls: COL (SCC*mec* I), BK2464 (SCC*mec* II), HU106 (SCC*mec* III), and BK2529 (SCC*mec* IV).

Detection of toxin and adhesin genes. Sequences specific for staphylococcal enterotoxin genes (*sea-e* and *seg-o*), the toxic shock syndrome toxin gene (*tst*), exfoliative toxin genes (*eta* and *etb*), PVL genes (*lukS*-PV-*lukF*-PV), the LukE-lukD leukocidin genes (*lukE-lukD*), the class F *lukM* leukocidin gene (*lukM*), and hemolysin genes (gamma [*hlg*], gamma variant [*hlgv*], and beta [*hlb*]) and for nine MSCRAMM genes (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), bone sialoprotein binding protein (*bsp*), clumping factors A and B (*clfA* and -B), collagen binding protein (*cna*), elastin binding protein (*ebpS*), laminin binding protein (*eno*), fibronectin binding proteins A and B (*fnbA* and *-B*), and extracellular fibrinogen binding protein (*efb*), were detected by PCR as described elsewhere (15, 23, 26, 27, 35, 37).

Antimicrobial susceptibility testing. Susceptibility tests were performed with the ATB System (bioMérieux, France).

Capsular typing. Capsular serotyping was performed for all MRSA strains and for randomly selected MSSA strains. The strains were grown for 24 h at 37°C on Columbia agar plates containing 2% $MgCl_2$ and 0.5% $CaCl_2$. Several colonies of each strain were suspended in 0.9% saline and tested by slide agglutination with rabbit polyclonal antibodies specific for capsular polysaccharide types 5 and 8 (8, 9).

Fingerprinting by PFGE. SmaI macrorestriction patterns were obtained by using a contour-clamped homogeneous electric field DR-II apparatus (Bio-Rad), as described elsewhere (19). Strain NCTC 8325 was used as a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) control. Resolved macrorestriction patterns were compared as recommended by Tenover et al. (33). Isolates were assigned to a single clonal group if they differed by less than six bands. PFGE patterns with more than six band differences (<75% similarity) were considered to correspond to different types.

The *mecA* gene was tested for in one of the PFGE bands, as follows: the fragment was cut out from the agarose gel, DNA was extracted by using the MinElute gel extraction kit protocol (QIAGEN), and PCR with the *mecA* primers and multiplex PCR for SCC*mec* typing were performed on the extract as described above.

***spa* typing.** *spa* typing was performed on MRSA isolates and on *agr2* MSSA isolates, as previously described (14). The x region of the *spa* gene was amplified by PCR. *spa* types were determined with Ridom Staph Type software (Ridom GmbH, Germany), which automatically detects *spa* repeats and assigns a *spa* type.

MLST. MLST was performed on strains representative of each clonal group, as described elsewhere (6, 36). The allelic profile of each strain was obtained by sequencing internal fragments of seven housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, and *yqiL*) and entering them on the MLST home page (http://saureus.mlst.net), where seven numbers depicting the allelic profile were assigned which defined an ST (6). To determine genetic relationships, MLST data were examined with BURST software (based upon related sequence types; details are available from http://www.mlst.net/BURST/burst.htm). The algorithm places STs that share five out of seven MLST alleles in a common clonal complex (7).

TABLE 1. Distribution of the *mecA* gene and *agr* alleles among 103 French *S. aureus* isolates containing the *tst* gene collected between 2002 and 2003

agr allele type	No. (%) of isolates		
	mecA$^+$ (n = 27)	*mecA* deficient (n = 76)	Total
1	0 (0)	1 (1)	1
2	25 (93)	5 (7)	30
3	2 (7)	70 (92)	72
4	0 (0)	0 (0)	0

RESULTS

Distribution of isolates according to methicillin resistance and *agr* group. Among the 103 *tst*-positive *S. aureus* isolates, 27 were methicillin resistant (*mecA*$^+$), and 76 were methicillin susceptible (*mecA* deficient) (Table 1). Twenty-five *tst*-positive MRSA isolates had *agr* allele type 2, and two had *agr* allele type 3. Seventy *tst*-positive MSSA isolates had *agr* allele type 3, five isolates had *agr* allele type 2, and one isolate had *agr* allele type 1.

Clinical characteristics of *tst*-positive MRSA infections. The median age of the 27 patients with *tst*-positive MRSA infections was 3 years (range, <1 month to 84 years), and the sex ratio was 1. Five patients had toxic shock syndrome, two had NTED (31), and one had staphylococcal scarlet fever; nine patients had toxic shock syndrome but did not fulfill all the criteria of a TSST-1-mediated syndrome (i.e., fever and rash without shock) (Table 2). Five skin infections occurred in patients with varicella. Eight patients had deep-seated infections (pneumonia or osteoarthritis), and no clinical information was available for two other patients. Two deaths occurred. The isolates were recovered from skin and soft tissues (14 isolates), blood (7 isolates), the umbilicus (2 isolates from cases of NTED), bronchopulmonary secretions (2 isolates), a prosthesis (1 isolate), and a ligament (1 isolate).

Information on the hospital or community acquisition of the infection was available for 20 MRSA infections and 51 MSSA infections. The origin of MRSA infection was unknown in seven cases. Eight of the 27 patients with *tst*-positive MRSA isolates had no known link to healthcare facilities and no known risk factors for MRSA acquisition; these cases were considered to be community acquired. Twelve cases were hospital acquired.

Microbiological characteristics of *tst*-positive MRSA isolates. The 25 *tst*-positive *agr2* MRSA strains all harbored the *sec*, *sed*, *sel*, *sem*, *seo*, *lukDE*, and *hlgv* toxin genes and the *clfA-B*, *ebpS*, *eno*, and *efb* adhesin genes (Table 3). These

TABLE 2. Clinical data on *tst*-positive MRSA infections

Clinical presentation	Patient and isolate no.[a]	City of isolation	Age (yrs)	Sex[b]	Samples	Site of acquisition	*agr* type	PFGE type
True TSS[c]	1, HT20020212	Lyon	2	M	Skin	Community	2	A1
	2, HT20020255	Bordeaux	42	F	Blood	Nosocomial	2	A1
	3, HT20020256	Bordeaux	0	F	Blood	Nosocomial	2	A1
	4, HT20030603	Lyon	25	F	Blood	Nosocomial	2	A1
	5, HT20030159	Geneva	0	ND[e]	Skin	Unknown	2	A3
Possible TSS[d]	6, HT20030119	Marseille	3	F	Skin	Nosocomial	2	A1
	7, HT20030369	Lyon	0	M	Skin	Unknown	2	D
	8, HT20030416	Lyon	9	F	Skin	Community	2	A7
	9, HT20030618	Lyon	8	F	Skin	Unknown	2	A2
	10, HT20030434	Marseille	0	F	Blood	Unknown	2	A1
	11, HT20030727	Lyon	84	M	Skin	Community	2	A1
	12, HT20030769	Fréjus	2	F	Skin	Unknown	2	A3
	13, HT20030695	Lausanne	2	ND	Skin	Unknown	2	A10
	14, HT20030849	Geneva	2	ND	Skin	Community	2	A9
Superinfection of varicella	15, HT20020188	Lyon	1	M	Skin	Community	2	A1
	16, HT20020277	Paris	1	M	Skin	Community	2	A8
	17, HT20020369	Lyon	7	M	Skin	Community	2	E
	18, HT20030228	Lyon	0	M	Skin	Community	2	A3
	19, HT20030651	Lyon	4	M	Skin	Community	2	A12
NTED	20, HT20020780	Tours	0	ND	Umbilicus	Nosocomial	2	A3
	21, HT20020781	Tours	0	ND	Umbilicus	Nosocomial	2	A3
Staphylococcal scarlet fever	22, HT20030157	Lille	0	M	Skin	Unknown	2	A3
Pneumonia	23, HT20020132	Boulogne	27	F	Skin	Nosocomial	2	A5
	24, HT20020417	Annecy	1	M	Bronchopulmonary secretion	Unknown	2	A12
	25, HT20030216	Lyon	65	M	Blood	Nosocomial	2	A1
	26, HT20030639	Lyon	31	M	Blood	Nosocomial	2	A7
	27, HT20020459	Rouen	1	F	Bronchopulmonary secretion	Nosocomial	3	G2
Osteoarthritis	28, HT20030749	Bondy	0	F	Blood	Unknown	2	A4
	29, HT20030095	Lyon	28	M	Ligament	Nosocomial	2	A3
	30, HT20020665	Marseille	14	F	Prosthesis	Nosocomial	3	G3

[a] Isolates 5, 13, and 14 from Switzerland were not among the 27 French *tst*-positive MRSA.
[b] M, male; F, female.
[c] Cases associated with TSS according to the reference criteria.
[d] Cases associated with TSS but that did not fulfill all criteria of TSST-1-mediated syndrome.
[e] ND, no data.

isolates were of capsular type 5, except for two isolates which could not be typed with this method. All but one were resistant to penicillin, oxacillin, kanamycin, and tobramycin and had intermediate resistance to fusidic acid; the remaining isolate was susceptible to kanamycin and tobramycin (Table 3). Seven isolates were resistant to other antimicrobial agents such as erythromycin, lincomycin, or tetracycline. All had an SCC*mec* element type IV, except for one isolate which had an SCC*mec* element type IVA and two isolates which were nontypeable (possibly new SCC*mec* variants). PFGE gave more diverse results: all but two of the isolates belonged to PFGE type A (14 subtypes), while the remaining isolates were of types D and E (Fig. 1). The main *spa* type was *spa* 2 (21 isolates). The other isolates had a related *spa* type that differed by one (*spa* 10 and *spa* 242) or two (*spa* 568) repeats. These isolates were all of ST5, as determined by MLST. Overall, the 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates were highly clonally related. This clone was detected in 12 towns in France, and three isolates from Switzerland had similar characteristics. Five Japanese *tst*-positive *agr2* MRSA isolates from patients with NTED were related to this clone (Table 3).

Two *tst*-positive *agr3* MRSA isolates were identified. They possessed the *sea*, *sem*, *seo*, *hlg*, *clfA-B*, *cna*, and *ebpS* genes and were of capsular type 8. These two isolates were resistant to penicillin, oxacillin, kanamycin, tobramycin, and erythromycin and had intermediate resistance to fusidic acid. One isolate had the SCC*mec* IV element, whereas the other had the SCC*mec* IVA element. Their PFGE patterns differed by three bands, and both isolates belonged to PFGE type G (Fig. 1). Their *spa* types differed by only four repeats (*spa* 638 and *spa* 584), and both isolates were ST30, as determined by MLST. These two isolates were considered to be clonally related.

Comparison of the *tst*-positive *agr2* isolates with the New York/Japan clone and the Pediatric clone. The 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates were ST5 and belonged to capsular type 5, like the New York/Japan and Pediatric clones. The New York/Japan clone contained the *tst* toxin gene, contrary to the Pediatric clone. The New York/Japan clone also did not contain the toxin gene (*sed*), contrary to the 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates. The 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates and the Pediatric clone harbored SCC*mec* element IV, whereas the New York/Japan clone harbored SCC*mec* element type II. The 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates and the New York/Japan clone were *spa* type 2, while the Pediatric clone was *spa* type 311 (diverging by only one repeat).

Comparison of *tst*-positive MRSA isolates with MSSA isolates. The 25 *tst*-positive *agr2* MRSA isolates and the 5 *tst*-positive *agr2* MSSA isolates had similar virulence determinants, an identical capsular type (type 5) and sequence type (ST5), and a common PFGE type (A) which differed by a

TABLE 3. Microbiological characteristics of *tst*-positive *Staphylococcus aureus* isolates

Resistance group, country of origin, and no. of isolates	ST[a]	CC[b]	*spa* type	Capsular type	*tst* gene	Toxin genes	Adhesin genes	SCC*mec* type	Antibiotic resistance[c]	PFGE type(s)
MRSA isolates *agr2*										
France (n = 27)										
13	5	5	2	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, FU	A1, A2, A3, A7, E
1	5	5	568	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, FU	A3
1	5	5	242	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, FU	A4
4	5	5	2	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, E, FU	A3
1	5	5	2	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, E, L, FU	A8
1	5	5	2	NT[d]	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	NT	P, OX, K, T, TE, FU	A12
1	5	5	2	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, E, TE, FU	A3
1	5	5	10	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, FU	A7
1	5	5	10	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IVA	P, OX, K, T, FU	A1
1	5	5	2	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	NT	P, OX, K, T, FU	A12
Switzerland (n = 3)										
3	5	5	ND[e]	5	+	*sec, sed, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, FU	A3, A9, A10
Japan (n = 5)										
3	5	5	ND	5	+	*sec, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	II	P, OX, K, T, G, E, L, TE, F, PE	C4, C5, C2
1	5	5	ND	5	+	*sec, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	II	P, OX, K, T, G, E, L, TE, FU	C1
1	5	5	ND	5	+	*sec, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	II	P, OX, K, T, E, L, TE, F, PE	C3
Pediatric clone	5	5	311	5	−	*sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	IV	P, OX, K, T, G, E	B
New York/Japan clone	5	5	2	5	+	*sec, sel, sem, seo, lukED, hlgv*	*clfA-B, ebpS, eno, efb*	II	P, OX, K, T, G, E, L, TE, F, PE	A6
MSSA isolates *agr2*										
France (n = 5)										
1	5	5	105	5	+	*sec, sed, sel, seo, sem, lukED, hlgv*	ND	NA[f]	ND	A13
1	5	5	88	5	+	*sec, sed, sel, seo, sem, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	A11
1	5	5	572	5	+	*sec, sed, sel, seo, sem, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	A14
1	5	5	570	5	+	*sem, seo, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	A13
1	5	5	548	5	+	*sed, sel, seo, sem, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	A11
MRSA isolates *agr3*										
France (n = 2)										
1	30	30	584	8	+	*sea, seo, sem, hlg*	*clfA-B, cna, ebpS*	IV	P, OX, K, T, E, FU	G2
1	30	30	638	8	+	*sea, seo, sem, hlg*	*clfA-B, cna, ebpS*	IVA	P, OX, K, T, E, FU	G3
MSSA isolates *agr3*										
France (n = 70)										
15	30	30	ND	8	+	*sem, seo, hlg*	ND	NA	ND	ND
6	30	30	ND	8	+	*sem, seo, hlb, hlg*	ND	NA	ND	ND
15	34	30	ND	8	+	*seh, sem, seo, hlg*	ND	NA	ND	ND
3	34	30	ND	8	+	*seh, sem, seo, hlb, hlg*	ND	NA	ND	ND
28	30	30	17, 12[g]	8	+	*sea, sem, seo, hlg*	ND	NA	ND	G1
1	30	30	ND	8	+	*sea, sel, sem, seo, hlg*	ND	NA	ND	ND
1	1	Singleton	ND	8	+	*lukPV, sea, seh, sek, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	ND
1	30	30	ND	8	+	*lukPV, sec, sel, sem, seo, lukDE, hlgv*	ND	NA	ND	ND

[a] ST, sequence type.
[b] CC, clonal complex.
[c] P, penicillin; OX, oxacillin; K, kanamycin; T, tobramycin; G, gentamicin; E, erythromycin; L, lincomycin; TE, tetracycline; F, fosfomycin; PE, pefloxacin; Fu, fusidic acid.
[d] NT, nontypeable.
[e] ND, not determined.
[f] NA, not applicable.
[g] Determined on two isolates only.

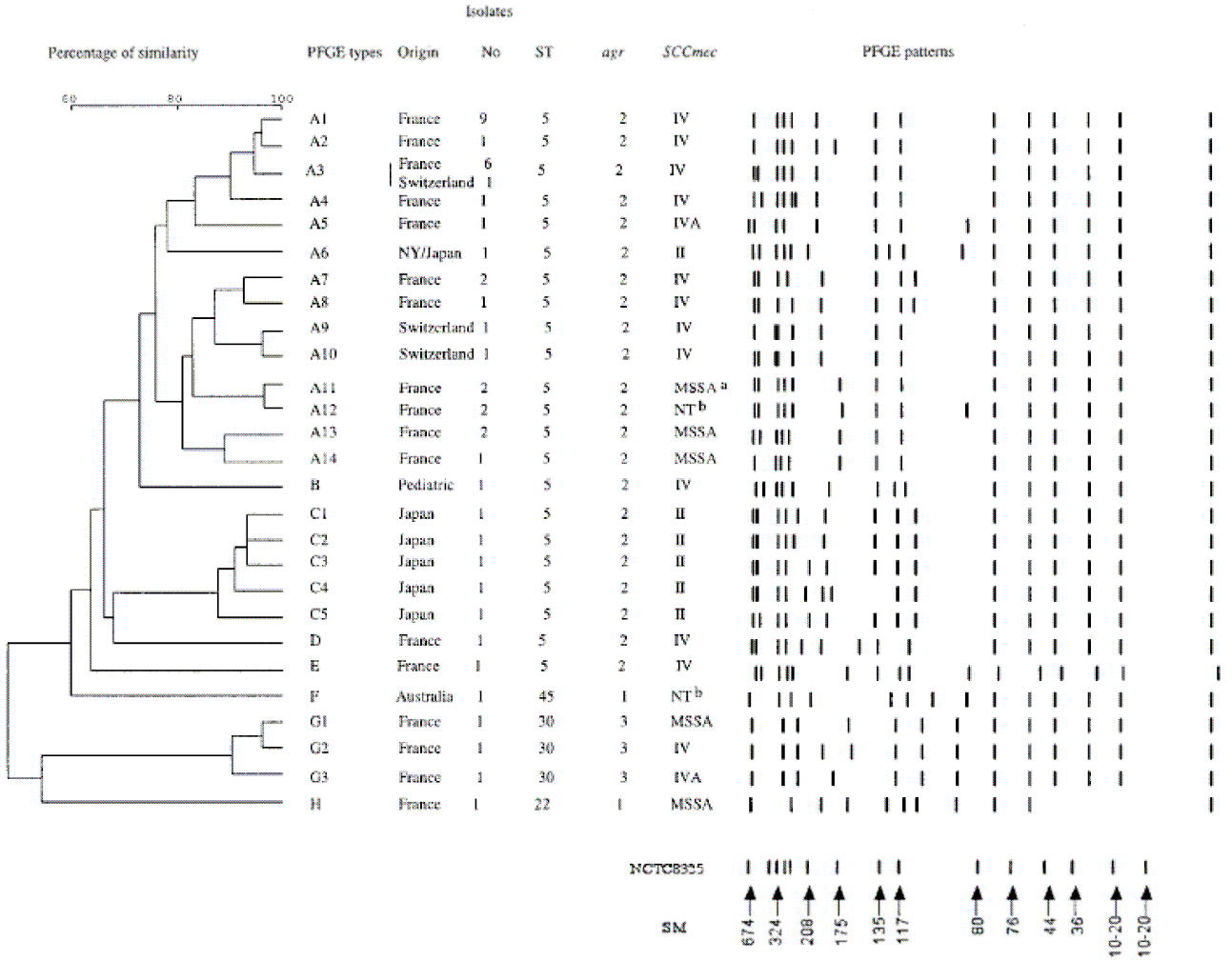


FIG. 1. Unweighted pair group method with averages dendrogram of PFGE results based on the Dice matrix and schematic representation of the pulsotype (SmaI restriction enzyme) of *tst*-positive MRSA isolates; *S. aureus* NCTC 8325 is the reference strain for the size marker (SM), expressed in kilobases. Isolates differing by more than six fragments were considered to be subtypes of a given clonal type. The *agr2* MRSA clone belonged to the PFGE type A except two isolates of PFGE types D and E. NT[b], nontypeable.

single band between the MRSA isolates (192 kb) and the MSSA isolates (151 kb). We concluded that the *tst*-positive *agr2* MRSA and MSSA clones were closely related. The presence of the SCC*mec* IV element in the 192-kb band of MRSA isolates was demonstrated after excising this band from the gel and amplifying *mecA* and the elements characteristic of SCC*mec* type IV. *mecA* and SCC*mec* PCR were negative for the 151-kb band.

The *spa* types of the MSSA isolates (*spa* 88, *spa* 105, *spa* 548, *spa* 570, and *spa* 572) were very similar to the *spa* type 2 of the MRSA isolates, diverging by only one or three repeats.

The two *tst*-positive *agr3* MRSA isolates shared characteristics with 25 of the 70 *tst*-positive *agr3* MSSA isolates; their PFGE patterns differed by a single band containing *mecA* in MRSA isolates. The *spa* types of two *tst*-positive *agr3* MSSA isolates (*spa* 12 and *spa* 17) were closely related to *spa* types 638 and 584 of the *tst*-positive *agr3* MRSA strain.

DISCUSSION

A passive survey of *S. aureus* infections in France during 2002 and 2003 identified *tst*-positive MRSA clones. We identified a major ST5 *agr2* clone which included 25 of the 27 *tst*-positive MRSA isolates, and a minor ST30 *agr3* clone accounted for the remaining two isolates. Both clones mainly caused hospital-acquired infections (12 cases), but the ST5 *agr2* clone was also sometimes acquired in the community (8 cases). These infections mainly affected children (overall median age, 3 years) and corresponded to both TSS and suppurative infections. The clones were widely disseminated throughout France, as *tst*-positive MRSA isolates were recovered from 12 French towns between 2002 and 2003. In our database, this clone was also detected in 2000 (one case) and in 2001 (two cases); these three cases were hospital acquired. The ST5 *agr2* clone was also detected in Switzerland.

The two French *tst*-positive MRSA clones had similar antibiotic resistance profiles: they were usually resistant to oxacillin, kanamycin, and tobramycin and had intermediate resistance to fusidic acid, while resistance to erythromycin was more variable. This antibiotic resistance profile is uncommon among French hospital MRSA isolates. Intermediate fusidic acid resistance is rare in French hospital MRSA clones, which are usually susceptible to fusidic acid and resistant to quinolones (39). It is noteworthy that the antibiotic resistance profiles of the two French *tst*-positive MRSA clones are very similar to that of the major community-acquired ST80 MRSA clone harboring the PVL genes, which is currently spreading throughout Europe (37). For instance, the ST80 clone is also resistant to oxacillin and kanamycin and has intermediate resistance to fusidic acid, whereas it is susceptible to tobramycin and resistant to tetracycline. These differences in antibiotic resistance profiles may help to identify the PVL-positive clone ST80 and the *tst*-positive clones ST5 and ST30 in the clinical setting. It is surprising that these emerging clones, which are either *tst* or PVL positive, share certain genetic determinants encoding resistance to antibiotics despite their very different genetic backgrounds. This may reflect a peculiar pattern of antibiotic usage in France, notably in the community.

Two categories of MRSA had previously been recognized in France. The first comprises hospital strains (H-MRSA) that can potentially spread into the community, giving rise to infections in patients with risk factors such as recent hospitalization or surgery, chronic underlying diseases, immunosuppression, or intravenous drug use. The second category corresponds to MRSA strains arising de novo in the community (C-MRSA), which infect patients with no established risk factors. H-MRSA infections differ from C-MRSA infections in their epidemiological, clinical, and microbiological characteristics: C-MRSA infects younger subjects and mainly causes skin infections, whereas H-MRSA is associated with a wider range of infections (urinary tract, respiratory tract, skin, etc.). C-MRSA usually harbors the PVL genes, which are associated with skin and soft tissue infections (37), and occasionally the exfoliative toxin genes (17). The epidemiology of the *tst*-positive MRSA clones is atypical. Like C-MRSA, *tst*-positive MRSA generally infects children in the community, but 12 of our cases were strictly hospital acquired. However, it is not known whether the patients with "hospital-acquired" infections were nasal carriers of *tst*-positive MRSA or whether they actually acquired the strain in the hospital. None of the hospital-acquired *tst*-positive MRSA infections was associated with hospital outbreaks or with documented horizontal transmission. The known prevalence of H-MRSA in French pediatric units is low (9.8% in our hospital in Lyon [J. Etienne, personal communication]), as is the overall prevalence of *tst*-positive MRSA in France (27 isolates from 12 different hospitals in a 2-year period). This suggests that these *tst*-positive MRSA strains are being imported into hospitals from the community. *tst*-positive MRSA strains appear to be highly virulent and to cause a variety of illnesses, ranging from toxic shock syndrome to various suppurative infections.

The two *tst*-positive MRSA clones, with *agr2* or *agr3* genetic backgrounds, seem to be clonally related to their respective *agr2* or *agr3* *tst*-positive MSSA counterparts. A single PFGE band difference, corresponding to an SCC*mec* IV element, distinguished the MRSA isolates from the MSSA isolates. It is unclear whether insertion of a *mecA* element can occur in such MSSA strains. The *tst*-positive *agr2* MSSA clone has rarely been detected in France (only 5 isolates in our collection), contrary to the *tst*-positive *agr3* MSSA clone (70 isolates in our collection). It is surprising that the major *tst*-positive MRSA clone (*agr2*) should have emerged from an infrequently detected *tst*-positive MSSA background. We compared our *tst*-positive *agr2* MRSA clone with the well-described New York/Japan and Pediatric MRSA clones that have spread worldwide. Our *tst*-positive *agr2* MRSA clone has the same genetic background as the New York/Japan clone. Even if SCC*mec* acquisition by MSSA clones was four times more common than the replacement of one SCC*mec* by another, we cannot exclude the possibility that our clone arose from the New York/Japan clone through SCC*mec* II substitution by SCC*mec* IV (28). Further phylogenetic studies are needed to determine the precise origin of our clone, and these studies may help to identify factors that tend to promote the spread of *tst*-positive *agr2* MRSA rather than *tst*-positive *agr3* MRSA.

Most emerging C-MRSA isolates with heightened virulence have been found to harbor the PVL genes and, less frequently, exfoliative toxin genes (17). The emergence and spread of virulent C-MRSA isolates harboring the *tst* gene is of major concern, as they appear to share certain characteristics with PVL-positive C-MRSA, including a predilection for children. Prospective studies are needed to determine the incidence of infections due to these different clones, in order to bolster measures aimed at limiting the spread of C-MRSA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the clinicians and microbiologists who sent us clinical data and isolates. We thank Christine Courtier, Christine Gardon, and Céline Spinelli for their technical assistance and David Young for editing the manuscript. We are grateful to Herminia de Lencastre, Alexander Tomasz, Graeme R. Nimmo, and John Perry for providing MRSA strains. We thank Ali Fattom for the gift of capsular typing reagents.

REFERENCES

1. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 359:1819–1827.
2. **Charlebois, E. D., F. Perdreau-Remington, B. Kreiswirth, D. R. Bangsberg, D. Ciccarone, B. A. Diep, V. L. Ng, K. Chansky, B. Edlin, and H. F. Chambers.** 2004. Origins of community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. 39:47–54.
3. **Crisostomo, M. I., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9865–9870.
4. **Daum, R. S., T. Ito, K. Hiramatsu, F. Hussain, K. Mongkolrattanothai, M. Jamklang, and S. Boyle-Vavra.** 2002. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. J. Infect. Dis. 186:1344–1347.
5. **Dufour, P., Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, D. Floret, J. Etienne, and H. Richet.** 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin. Infect. Dis. 35:819–824.
6. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38:1008–1015.
7. **Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, and B. G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7687–7692.

8. **Fattom, A., R. Schneerson, S. C. Szu, W. F. Vann, J. Shiloach, W. W. Karakawa, and J. B. Robbins.** 1990. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Infect. Immun. **58**:2367–2374.
9. **Fattom, A., R. Schneerson, D. C. Watson, W. W. Karakawa, D. Fitzgerald, I. Pastan, X. Li, J. Shiloach, D. A. Bryla, and J. B. Robbins.** 1993. Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A. Infect. Immun. **61**:1023–1032.
10. **Fitzgerald, J. R., D. E. Sturdevant, S. M. Mackie, S. R. Gill, and J. M. Musser.** 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:8821–8826.
11. **Floret, D.** 2001. Clinical aspects of streptococcal and staphylococcal toxinic diseases. Arch. Pediatr. **8**(Suppl. 4):762s–768s.
12. **Ghebremedhin, B., W. Konig, and B. Konig.** 2005. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **24**:388–398.
13. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, J. C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piemont, N. Brousse, D. Floret, and J. Etienne.** 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet **359**:753–759.
14. **Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothganger, D. Turnwald, and U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J. Clin. Microbiol. **41**:5442–5448.
15. **Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. **70**:631–641.
16. **Kikuchi, K., N. Takahashi, C. Piao, K. Totsuka, H. Nishida, and T. Uchiyama.** 2003. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards. J. Clin. Microbiol. **41**:3001–3006.
17. **Liassine, N., R. Auckenthaler, M. C. Descombes, M. Bes, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. J. Clin. Microbiol. **42**:825–828.
18. **Lina, G., A. Quaglia, M. E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:1062–1066.
19. **Maslow, J. N., M. E. Mulligan, and R. D. Arbeit.** 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. **17**:153–162.
20. **Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe.** 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **29**:2240–2244.
21. **Musser, J. M., P. M. Schlievert, A. W. Chow, P. Ewan, B. N. Kreiswirth, V. T. Rosdahl, A. S. Naidu, W. Witte, and R. K. Selander.** 1990. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:225–229.
22. **Naimi, T. S., K. H. LeDell, K. Como-Sabetti, S. M. Borchardt, D. J. Boxrud, J. Etienne, S. K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O'Boyle, R. N. Danila, and R. Lynfield.** 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA **290**:2976–2984.
23. **Oliveira, D. C., and H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2155–2161.
24. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Microb. Drug Resist. **7**:349–361.
25. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect. Dis. **2**:180–189.
26. **Peacock, S. J., G. D. de Silva, A. Justice, A. Cowland, C. E. Moore, C. G. Winearls, and N. P. Day.** 2002. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J. Clin. Microbiol. **40**:3764–3770.
27. **Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **70**:4987–4996.
28. **Robinson, D. A., and M. C. Enright.** 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3926–3934.
29. **Said-Salim, B., B. Mathema, and B. N. Kreiswirth.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **24**:451–455.
30. **Schmitz, F. J., C. R. MacKenzie, R. Geisel, S. Wagner, H. Idel, J. Verhoef, U. Hadding, and H. P. Heinz.** 1997. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. Eur. J. Epidemiol. **13**:699–708.
31. **Takahashi, N., H. Kato, K. Imanishi, K. Miwa, S. Yamanami, H. Nishida, and T. Uchiyama.** 2000. Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen. J. Clin. Investig. **106**:1409–1415.
32. **Takahashi, N., H. Nishida, H. Kato, K. Imanishi, Y. Sakata, and T. Uchiyama.** 1998. Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. Lancet **351**:1614–1619.
33. **Tenover, F. C., R. Arbeit, G. Archer, J. Biddle, S. Byrne, R. Goering, G. Hancock, G. A. Hebert, B. Hill, R. Hollis, et al.** 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **32**:407–415.
34. **Trindade, P. A., J. A. McCulloch, G. A. Oliveira, and E. M. Mamizuka.** 2003. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz. J. Infect. Dis. **7**:32–43.
35. **Tristan, A., L. Ying, M. Bes, J. Etienne, F. Vandenesch, and G. Lina.** 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. J. Clin. Microbiol. **41**:4465–4467.
36. **Urwin, R., and M. C. Maiden.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. **11**:479–487.
37. **Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis. **9**:978–984.
38. **van der Mee-Marquet, N., G. Lina, R. Quentin, H. Yaouanc-Lapalle, C. Fievre, N. Takahashi, and J. Etienne.** 2003. Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. J. Clin. Microbiol. **41**:4883–4884.
39. **van der Mee-Marquet, N., A. S. Domelier, N. Girard, and R. Quentin.** 2004. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. J. Clin. Microbiol. **42**:5650–5657.

III- Epidémiologie d'un clone de SARM possédant le gène de la TSST-1

1. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007.

Olivier Dauwalder, Gerard Lina, **Géraldine Durand**, Michèle Bes, Hélène Meugnier, Vincent Jarlier, Bruno Coignard, François Vandenesch, Jerome Etienne et Frédéric Laurent.

Soumise le 03/06/2008, acceptée le 14/07/2008.

Journal of Clinical Microbiology 2008;46(10):3454-3458.

Le but de cette étude était de caractériser les clones de SARM diffusant en France métropolitaine. Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'une étude globale européenne menée par le réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARSS). Les cinq premiers isolats consécutifs responsables d'infections invasives ont été collectés entre 2006 et 2007 dans 23 centres statistiquement répartis sur l'ensemble du territoire français. Cette étude prospective a permis la collection de 111 souches.

La détermination du fond génétique (type *agr*; *sequence type* par MLST et type *spa*), la caractérisation du type de cassette SCC*mec*, la détermination de l'habillage toxinique et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques ont permis d'identifier cinq clones prédominants.

Le clone Lyon, de type *agr*1, ST8-IV ou ST8-$IV_{variant}$ était le clone prédominant [184]. Possédant majoritairement le gène codant la SEA (88% de souches) et présentant une résistance constante aux fluoroquinolones, il montrait cependant une très grande variabilité tant de son profil toxinique que de son profil de résistance aux antibiotiques.

Parmi les cinq clones prédominants identifiés, trois clones de fond génétique ST5 (*agr*2) ont été détectés. En ordre de fréquence d'isolement le premier était le clone pédiatrique « classique » doté d'une cassette SCC*mec* de type IV (8.1%), le second était le «nouveau» clone pédiatrique doté d'une cassette SCC*mec* de type VI (7,2%)[130] et enfin le troisième était le clone possédant la TSST-1 dit «clone Géraldine» avec une fréquence de 6,3%. Le clone Géraldine avait été préalablement décrit comme possédant une cassette SCC*mec* de type IV mais le typage de sa cassette par d'autres techniques ont révélé qu'il possédait en fait une cassette SCC*mec* de type I «tronquée».

Enfin, le dernier clone prédominant identifié était le clone européen de SARM communautaire ST80-IV (3,6% des souches) de fond génétique *agr*3 et possédant les gènes codant la PVL. Il possèdait un profil de résistance aux antibiotiques caractéristique associant résistance à l'oxacilline, la kanamycine et à l'acide fusidique [199].

Au total, l'épidémiologie des SARM en Europe reste géographiquement dépendante, avec, en France et en Belgique, le clone Lyon prédominant, tandis qu'en Suisse

circulent les clones ST247-I et ST105-II; en Angleterre, un clone ST22-IV; en Allemagne les clones ST225-I et ST22-IV ; en Italie, le clone ST228-I et en Espagne le clone ST125-IV. Cette étude confirme également la quasi-disparition en France du clone ibérique (ST247-I), résistant à la gentamicine et prédominant en France jusque dans les années 1990 [183]. Cette dispersion rapide du clone Lyon peut être expliquée par différents facteurs, notamment par la présence du gène codant la SEA dont la virulence, seule ou en association avec «*l'immune evasion cluster*» pourrait expliquer sa diffusion et sa capacité à provoquer des infections invasives [42].

Notre contribution à cette étude a concerné le typage SCC*mec* et l'identification des clones de fond génétique ST5.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2008, p. 3454–3458 Vol. 46, No. 10
0095-1137/08/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01050-08
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Epidemiology of Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Collected in France in 2006 and 2007▽

Olivier Dauwalder,[1,2,3] Gérard Lina,[1,2,3] Géraldine Durand,[1,2,3] Michèle Bes,[1,2,3] Hélène Meugnier,[1,2,3] Vincent Jarlier,[4] Bruno Coignard,[5] François Vandenesch,[1,2,3] Jerome Etienne,[1,2,3] and Frédéric Laurent[1,2,3]*

Université Lyon, Centre National de Référence des Staphylocoques, F-69622, Lyon, France[1]; INSERM, U851, F-69370, Lyon, France[2]; Hospices Civils de Lyon, F-69004, Lyon, France[3]; Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, UFR de Médecine Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, France[4]; and Département des Maladies Infectieuses, Institut de Veille Sanitaire, F-95000, Saint-Maurice, France[5]

Received 3 June 2008/Returned for modification 21 June 2008/Accepted 14 July 2008

We conducted a prospective multicenter study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, including the first five consecutive clinical isolates, collected between September 2006 and February 2007 in 23 hospitals located throughout France (Fig. 1). The 111 isolates were tested for their antibiotic susceptibility patterns and were extensively characterized by screening for drug resistance and *agr* alleles, multilocus sequence typing (ST), staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, *spa* typing, and PCR profiling of 21 toxin genes. Clones were designated by their ST followed by their SCC*mec* type (I to VI). The Lyon clone ST8-IV or ST8-IV$_{variant}$ (n = 77; 69.4%) was widely distributed. Four minor clones were also detected, namely, the "classical" Pediatric clone ST5-IV (n = 9; 8.1%), the "new" Pediatric clone ST5-VI (n = 8; 7.2%), the clone Geraldine ST5-I$_{truncated}$ (n = 7; 6.3%), and the European clone ST80-IV (n = 4; 3.6%). The six other isolates were related to five rare clones. Relative to that of other European countries, the situation in France is marked by the predominance of a specific major clone and the worrying emergence of minor clones with enhanced virulence and new antibiotic susceptibility profiles.

A thorough knowledge of the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates is needed to prevent their spread, to determine the clinical spectrum of MRSA disease, and to optimize treatment. Many molecular techniques have been developed to allow the unambiguous assignment of each isolate to previously described or new MRSA clones (8, 15, 26, 29), and these techniques have helped to monitor the evolutionary process of the emergence and temporal and geographical spread of pandemic clones (1, 8, 38).

Several epidemic healthcare-associated MRSA clones (HA-MRSA) have emerged since the 1970s. During the last decade, five major pandemic clones, named Iberian, Brazilian, Hungarian, New York/Japan, and Pediatric, have been identified (1, 35, 36), while other new or preexisting clones emerged in some specific areas. The recent worldwide spread of several community-acquired MRSA (CA-MRSA) clones made even more complex the understanding of this epidemiology (42).

In France, several new MRSA clones have been described in the last decade (5, 16, 28), but the current epidemiology of MRSA is poorly documented. The aim of this study was to characterize MRSA isolates collected during a 6-month prospective multicenter study in representative French hospitals. The isolates were extensively typed by accessory gene regulator (*agr*) allele determination, multilocus sequence typing (MLST), *spa* typing, structural analysis of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) element, toxin profiling, and antimicrobial resistance phenotyping.

* Corresponding author. Mailing address: Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté Laennec, Université Lyon, Lyon F-69372, France. Phone: 33478778657. Fax: 33478778658. E-mail: frederic.laurent@chu-lyon.fr.

▽ Published ahead of print on 30 July 2008.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a prospective multicenter study of MRSA isolates collected between September 2006 and February 2007 by 23 representative randomly selected French hospital laboratories. The first five isolates, obtained from different patients by invasive sampling (blood or fluid from a normally sterile site; one isolate per patient) were sent to the French National Reference Center for Staphylococci (Lyon, France). Isolates were considered to be community acquired if a sample obtained within 48 h after admission was culture positive and hospital acquired if obtained later. Antimicrobial susceptibility was determined by each participating laboratory as recommended by the French Society for Microbiology (17).

The identification of the 111 isolates was confirmed by multiplex PCR amplification of the *agr* (25) and by determining the *agr* allelic group. The isolates were fully typed by the French National Reference Center for Staphylococci (Lyon, France) and were screened for genes encoding methicillin resistance (*mecA*), staphylococcal enterotoxins (*se*) A, B, C, D, H, K, L, M, O, P, Q, and R (*sea* to *sed*, *seh*, *sek* to *sem*, and *seo* to *ser*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), exfoliative toxins A, B, and D (*eta*, *etb*, and *etd*), Panton-Valentine leukocidin (PVL; *lukPV*), class F LukM leukocidin (*lukM*), beta-hemolysin (*hlb*), and epidermal cell differentiation inhibitor (*edinA*, *edinB*, and *edinC*), as previously described (25, 43). *spa* typing was performed with the Ridom Staph Type standard protocol (www.ridom.com) and by using the Ridom *Spa*Server, which automatically analyses *spa* repeats and assigns *spa* types (http://spa.ridom.de/index.shtml). MLST was performed as described elsewhere (14) for all isolates carrying *agr-2* or *agr-3* and for 54 of 81 *agr-1* isolates representative of all toxin types, susceptibility profiles, and SCC*mec* types detected within this subgroup. SCC*mec* types were determined by PCR with a simplified version of Kondo's typing system, including M-PCR-1 and M-PCR-2, without determining differences in the junkyard region (26). In specific cases, SCC*mec* typing was also performed as recommended by Oliveira et al. (33) and *ccrB* gene sequencing was performed as previously described (33). We use the classification of Ito et al. (24) and Ma et al. (30) for SCC*mec* elements.

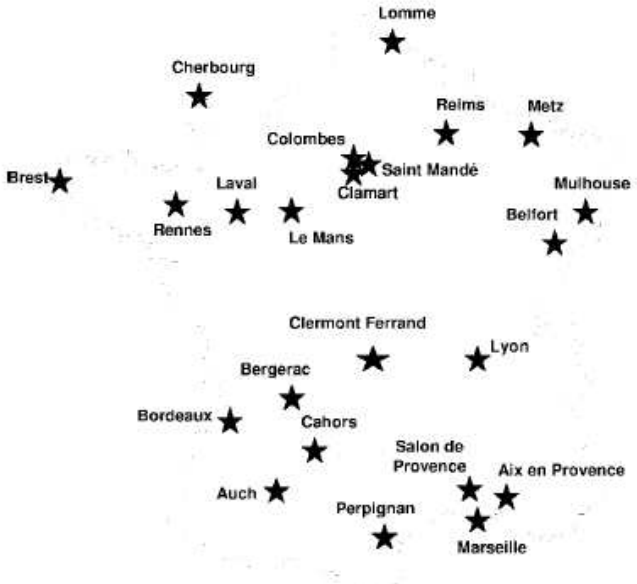


FIG. 1. Geographical distribution of the 23 French hospitals that participated in this study.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of molecular typing methods indicated that one major clone and four minor clones of MRSA are currently predominant in France. A total of 111 different MRSA isolates were examined. They were isolated by culture of blood (n = 82; 74%), puncture fluid from a sterile cavity (n = 28; 25%), or cerebrospinal fluid (one case). The patients were hospitalized in intensive care units (n = 26, 23.4%), daycare units (n = 62; 55.9%), or outpatient departments (n = 23; 20.7%). Sixty-seven isolates (60.3%) were hospital acquired. All isolates with the same ST and identical or variant SCC*mec* elements were considered to belong to the same clone.

A first major clone, comprising 77 strains (69.4% of all isolates), was related to the Lyon clone (16). Since the 1990s, the Lyon clone has gradually replaced the gentamicin-resistant Iberian clone (ST247; SCC*mec* type I) that predominated in France in the 1990s (28). In our study, the Lyon clone was isolated in 22 of the 23 participating hospitals, confirming its wide dissemination all over France, and was mainly hospital acquired (48 hospital-acquired and 31 community-acquired isolates). The characteristics shared by these isolates corresponded largely to those reported by Ferry et al. (16), namely, *agr* allele 1, ST8, *spa* type t008 and related, SCC*mec* type IV (n = 70) or type $IV_{variant}$ (n = 7) with *mec* gene complex class B, and *ccrAB* allotype 2, associated with a supplementary *ccr* gene in variants. Nevertheless, the strains were more diverse than initially reported (16). The *sea* gene was found in only 88% of isolates (68 out of 77), *sed* in 49% (38 out of 77), *ser* in 49% (38 out of 77), and *hlb* in 12.7% (10 out of 77 isolates). The most-common toxin types were *sea* alone (43.6%) and *sea* plus *sed* and *ser* (41%). Although these isolates were consistently resistant to methicillin and fluoroquinolones, the antimicrobial susceptibility profiles were highly variable (more than 20 antibiotypes). This points to frequent acquisition and loss of toxin-carrying and resistance-carrying mobile genetic elements, such as bacteriophages, plasmids, or transposons, even if some changes in antibiotic susceptibility are due to point mutations. This confirms that the horizontal mobility of such genetic elements in MRSA is probably greater than previously believed (23, 37). Moreover, in addition to the classical *ccrAB* allotype 2 of SCC*mec* type IV, a supplementary recombinase locus (*ccrC* in two cases and *ccrAB4* in five cases) was detected in seven isolates belonging to the Lyon clone and confirmed in single isolated colonies. Except in strains harboring SCC*mec* type III (with *ccrAB3*), which is always associated with SCC*mercury* (with *ccrC*) (8), the combination of two *ccr* genes (*ccrAB* with *ccrC* or two *ccrC* genes) has rarely been reported (8, 21, 41). To our knowledge, the combination of two *ccrAB* genes (*ccrAB2* and *ccrAB4*) has not previously been reported in an *S. aureus* strain and has only been reported once in a *Staphylococcus epidermidis* strain (20). It remains to be determined whether the different *ccr*s are located within the SCC*mec* element or outside the cassette in the chromosome, as previously described for *mecA*-negative strains. Further structural studies of these SCC*mec* elements are under way. Full sequencing of the cassette, cohybridization, or artificial excision with a high-copy-number plasmid harboring an excisionase will probably help to resolve this issue. Finally, this clone shared some features (ST8 and SCC*mec* IV) with USA300, an epidemic CA-MRSA clone in the United States (42), but these two clones are very different according to their resistance profiles and their toxin profiles, and no relation has been established between these two clones. Moreover, USA300 was initially described as a CA-MRSA clone (even if this clone has now invaded U.S. hospitals), while the Lyon clone is typically a French HA-MRSA clone.

The first minor clone found here (n = 7), the Geraldine clone, had already been identified during a passive French survey of *S. aureus* infections in 2002 and 2003 (12). This *tst*-MRSA clone caused both toxic shock syndrome and suppurative infections. It was described as *agr-2*, ST5, *spa* type t002 or related, and SCC*mec* type IV. In our study, seven isolates (6.3%) from six hospitals located throughout France matched these molecular characteristics. As previously reported, the infections were both community acquired (n = 3) and hospital acquired (n = 4). However, our patients had a median age of 74 years, compared to only 3 years in Durand's study (12). As also described by Durand et al., we observed a specific toxinotype in which the *tst*, *sec*, *sed*, *sel*, *sem*, *seo*, and *ser* genes were always present, with the exception of one strain that was negative for *tst*, *sec*, and *sel* (Table 1). This latter strain probably arose through the loss of the *SaPI* mobile genetic element known to harbor these three toxin genes. The antibiotic susceptibility pattern of this clone was characteristic, with resistance to methicillin and fusidic acid in every case and to kanamycin and tobramycin in five of the seven isolates. The main difference relative to the previous description of this clone concerned the type of SCC*mec* cassette. It was initially identified as type IV in Oliveira's typing system (33), because PCR was positive for locus D but negative for locus A (corresponding to the *pls* fragment). The use of Kondo's typing system (26) revealed that it displayed features associated with SCC*mec* type I (*mec* gene complex class B and *ccrAB* allotype 1) as previously reported (29). We therefore assume that this

TABLE 1. Characteristics of the most frequent MRSA clones isolated in France[a]

Characteristic or parameter	Lyon clone	Geraldine Clone	Pediatric clone		European ST80 clone
			"Classical" subtype	"New" subtype	
No. of isolates (%)	77 (69.4)	7 (6.3)	9 (8.1)	8 (7.2)	4 (3.6)
No. of health care-associated isolates (%)	47 (61)	4 (57)	6 (66)	6 (75)	3 (75)
No. of hospitals (out of 23)	22	6	5	5	3
Molecular characteristics					
agr allelic group	1	2	2	2	3
ST	8	5	5	5	80
Clonal complex ST	8	5	5	5	80
spa type	t008 and related	t002 and related	t002 and related	t777	t044
SCC*mec* type	IV (n = 70) or $IV_{variant}$ (n = 7)	$I_{truncated}$	IV	VI	IV
mec complex	B	A	B	B	B
ccr allotype	AB2 with or without AB4 (n = 5) or C (n = 2)	AB1	AB2	AB4	AB2
Toxin genes					
Always positive		*tst*, *sec*, *sed*, *sel*, *sem*, *seo*, *ser*[b]	*sem*, *seo*	*sed*, *sem*, *seo*, *ser*	*luk-PV*, *etd*, *edin*
Always negative	*seb*, *sec*, *seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo*, *tst*, *eta*, *etb*, *etd*, *luk-PV*, *lukM*, *edin*	*sea*, *seb*, *seh*, *sek*, *sel*, *sep*, *eta*, *etb*, *etd*, *luk-PV*, *lukM*, *edin*, *hlb*	*sea*, *sec*, *seh*, *sek*, *seq*, *tst*, *eta*, *etb*, *etd*, *luk-PV*, *lukM*, *edin*	*sea*, *seb*, *sec*, *sek*, *sel*, *eta*, *etb*, *luk-PV*, *lukM*, *edin*	*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo*, *sep*, *seq*, *tst*, *eta*, *etb*, *lukM*, *edin*
Variably positive (%)	*sea* (86), *sed* (49), *ser* (49), *hlb* (13)		*seb* (22), *sed* (66), *sep* (44), *ser* (66), *hlb* (11)	*sep* (87), *hlb* (25)	
Susceptibility pattern					
Always resistant	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Fus	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Flq	Pen, Met, Kan, Fus
Variably resistant (% resistant)	Kan (75.3), Tob (75.3), Gen (2.6), Ery (50.6), Lin (53.2), Pri (7.8), Rif (1.3), Fos (9.1), Fus (9.1), Sxt (96.1)	Kan (28), Tob (28), Ery (14)	Kan(33), Tob (33), Ery (11)	Ery (12), Lin (12)	Ery (25)
Always susceptible	Tec, Van	Gen, Flq, Lin, Pri, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Gen, Lin, Pri, Fus, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Kan, Tob, Gen, Pri, Fus, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van	Tob, Gen, Flq, Lin, Pri, Rif, Fos, Sxt, Tec, Van

[a] *spa*, staphylococcal protein A; *ccr*, cassette chromosome recombinase; *tst*, toxic shock syndrome toxin 1 gene; *luk*, staphylococcal leukocidin; *hlb*, beta-hemolysin; *edin*, epidermal cell differentiation inhibitor; *eta*, exfoliatin A; *etb*, exfoliatin B; *etd*, exfoliatin D; Pen, penicillin; Met, methicillin; Kan, kanamycin; Tob, tobramycin; Gen, gentamicin; Ery, erythromycin; Lin, lincomycin; Pri, pristinamycin; Rif, rifampin; Fos, fosfomycin; Van, vancomycin; Tec, teicoplanin; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; Fus, fusidic acid; Flq, fluoroquinolone.

[b] One Geraldine clone isolate was negative for *tst*, *sec*, and *sel*.

clone harbors a new subtype of the SCC*mec* type I element, characterized by deletion of the *pls* fragment, and therefore propose to name it "truncated SCC*mec* type I".

Another minor clone was the Pediatric clone (n = 17), first identified in a pediatric hospital in Portugal in 1992 (40) and subsequently detected in Poland, Argentina, Colombia, and the United States (19, 32, 40). This clone was recently subdivided into two clones on the basis of a different *ccrAB* allotype and J1 region of the genetic SCC*mec* element (34). The first, referred to here as the "classical" Pediatric clone, had SCC*mec* type IV with *ccrAB2* and represented most strains belonging to the original Pediatric clone identified in Portugal and internationally (40). The second, referred to here as the "new" Pediatric clone, had SCC*mec* type VI with *ccrAB4* and was restricted to a few Portuguese hospitals (34). We detected both these clones in this study. Nine isolates (8.1% of all MRSA isolates) collected from five hospitals matched the characteristics of the "classical" Pediatric clone, with the *agr-2* allele, ST5, *spa* type related to t311 (t045, t067, t509, t2173, or t1818), and SCC*mec* type IV (*mec* gene complex class B and *ccrAB* allotype 2). These isolates were also characterized by the presence of *sem* and *seo* and by resistance to methicillin and fluoroquinolones (Table 1). Eight other isolates (7.2%) were related to the "new" Pediatric clone. They possessed the *agr-2* allele, ST5, a unique *spa* type t777, and SCC*mec* type VI (*mec* gene complex class B and *ccrAB* type 4). The *sed*, *sem*, *seo*, and *ser* genes were always present, and the isolates were resistant to methicillin and fluoroquinolones and susceptible to all aminoglycosides. This is the first description of the "new" Pediatric clone outside of Portugal. Interestingly, it was as frequent as the "classical" Pediatric clone that represents a specific and unusual epidemiology.

The last minor clone was the European ST80 clone, which is one of the CA-MRSA clones most widespread in Europe (10, 22, 31, 42, 45). It expresses PVL and can cause severe skin and soft-tissue infections, as well as rapidly fatal pneumonia and extensive bone and joint infections (11, 18). The prevalence of this clone in France was estimated at less than 1% in 2004 (39). In the present study, four isolates (3.6%), three of which were community acquired, presented the specific profile of this clone, namely the *agr-3* allele, ST80, and SCC*mec* type IV (*mec* gene complex class B and *ccrAB* type 2), that is associated with a specific antibiotic-susceptibility pattern, including resistance to methicillin, kanamycin, and fusidic acid. All the isolates had the same *spa* type (t044) and the same toxinotype (*luk-PV*, *etd*, and *edin*). They were collected from three hospitals that are distant from one another, highlighting the widespread dissemination of this clone. Our results indicate a slow but worrying emergence of this clone (39) that should be watched closely in coming years.

Finally, we collected six sporadic isolates: one *agr-1*, ST1041 with SCC*mec* type V harboring *luk-PV*; one *agr-1*, ST1042 with SCC*mec* type III; two *agr-1*, ST247 with SSC*mec* type I; one *agr-2*, ST5 with SCC*mec* type I; and one *agr-3*, ST88 with SCC*mec* type I.

This study provides an overview of the invasive MRSA clones currently circulating in France. The pattern of MRSA clonal lineages is very different from that observed in neighboring countries, where, according to the most-recent data, the predominant clones are ST45-SCC*mec* type IV and ST8-SCC*mec* type IV in Belgium (9), ST22-SCC*mec* type IV in the United Kingdom (13), ST225-SCC*mec* type I and ST22-SCC*mec* type IV in Germany (27), ST228-SCC*mec* type I in Italy (7), and ST125-SCC*mec* type IV in Spain (4). No isolates belonging to these different clones were isolated in our study, and conversely, the Lyon clone seems to be infrequent in these countries (except in Belgium, where the Lyon clone shared the first place with ST45-SCC*mec* type IV (37% and 34% of all MRSA isolates, respectively) (9). Possible explanations are geographic segregation and/or differences in antimicrobial chemotherapy or antisepsis. In the same way, we confirm the complete disappearance of the gentamicin-resistant Iberian clone (ST247-SCC*mec* type I, *spa* t008, and related) that was by far the most-frequent French clone in the 1990s (5, 28) and its replacement by the Lyon clone. Several similar reports have been published, with the Iberian clone in a hospital setting in two cases (2, 38) or with other epidemic clones (3, 6). Various genetic factors have been proposed to explain such rapid evolution and the dissemination of particular epidemic clones. One characteristic of the Lyon clone is the presence of *sea* (87% of the isolates), and it was recently demonstrated that this gene is part of an immune evasion cluster carried by a phage and harboring a collection of virulence factors able to modulate the human immune system, namely SEA, SCIN (staphylococcal complement inhibitor), CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of *S. aureus*), and SAK (staphylokinase) (44). This pathogenicity island could be involved in the success of the Lyon clone and in its ability to cause invasive infections. Finally, it must be noted that the two major clones isolated during this study, the Lyon clone and the "classical subtype" of the Pediatric clone, are both typically HA-MRSA (16, 34, 40), although they harbor SCC*mec* type IV that is usually considered a CA-MRSA marker.

We found that variable traits, such as toxin production and antibiotic susceptibility encoded by mobile genetic elements, were more variable than expected. Care should thus be taken when using such characteristics to define or even to identify MRSA clones circulating in a given area. However, they could be useful for monitoring the evolution of these clones and their potent pathogenicity profiles and for adapting empirical antimicrobial chemotherapy.

Finally, the results of this study indicate the emergence and spread of new MRSA clones in France, namely, the Geraldine clone, the European ST80 clone, and the "new" Pediatric clone. The dissemination of clones producing PVL has been extensively reported, but the emergence of a *tst*-positive MRSA clone is new. The spread of such clones with potent superantigenic activity (TSST-1) or the capacity to cause invasive disease (through PVL production) is of major concern. Even if their prevalence is currently low, the possibility of rapid spread, as recently reported for the USA300 clone, should be kept in mind. These clones with enhanced virulence thus represent a new threat in terms of pathogenicity, treatment, and the prevention of transmission and should be closely monitored in coming years.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues who sent us French MRSA isolates from the indicated towns: H. Chardon (Aix en Provence), D. Pierrejean (Auch), G. Julienne (Belfort), C. Fabe (Bergerac), C. Moratte (Bordeaux), G. Lelay (Brest), N. Wilheim (Cahors), F. Beisse (Cherbourg), C. Solere (Clamart), R. Bonnet (Clermont Ferrand), C. Branger (Colombes), D. Jan (Laval), A. Marmonnier (Le Mans), A. Decoster (Lomme), S. Vedy (Marseille), J. Puyhardy (Metz), J. M. Delarbre (Mulhouse), E. Lecaillon (Perpignan), V. Vernet (Reims), P. Y. Donnio (Rennes), P. Rousselier (Salon de Provence), and J. D. Cavallo (Saint Mande). We thank C. Courtier, C. Gardon, C. Spinelli, C. Bouveyron, A. Martra, and M. Rougier for technical help and David Young for editorial assistance.

This work was part of a larger European study (EARSS) coordinated by Hajo Grundmann, to whom we are grateful.

REFERENCES

1. **Aires de Sousa, M., and H. de Lencastre.** 2004. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **40**:101–111.
2. **Amorim, M. L., M. Aires de Sousa, I. S. Sanches, R. Sa-Leao, J. M. Cabeda, J. M. Amorim, and H. de Lencastre.** 2002. Clonal and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from a Portuguese hospital over time. Microb. Drug Resist. **8**:301–309.
3. **Amorim, M. L., N. A. Faria, D. C. Oliveira, C. Vasconcelos, J. C. Cabeda, A. C. Mendes, E. Calado, A. P. Castro, M. H. Ramos, J. M. Amorim, and H. de Lencastre.** 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. J. Clin. Microbiol. **45**:2881–2888.
4. **Argudin, M. A., C. Mendoza, F. Vazquez, M. C. Martin, and M. R. Rodicio.** 2008. Diversity of the virulence and genomic backgrounds in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* collected in a Spanish hospital 1992 to 2006, abstr. P1409, p.126. Abstr. 18th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
5. **Aubry-Damon, H., P. Legrand, C. Brun-Buisson, A. Astier, C. J. Soussy, and R. Leclercq.** 1997. Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: roles of an infection control program and changes in aminoglycoside use. Clin. Infect. Dis. **25**:647–653.
6. **Aucken, H. M., M. Ganner, S. Murchan, B. D. Cookson, and A. P. Johnson.** 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. **50**:171–175.
7. **Campanile, F., D. Bongiorno, S. Borbone, G. Mongelli, S. Jeddari, and S. Stefani.** 2008. Looking back, current status, and future trends of MRSA

clones in Italy, abstr. P-1426, p. 127. Abstr. 18th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
8. **Chongtrakool, P., T. Ito, X. X. Ma, Y. Kondo, S. Trakulsomboon, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, T. Chavalit, J.-H. Song, and K. Hiramatsu.** 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:1001–1012.
9. **Delplano, A., O. Denis, M. Hallin, S. Rottiers, R. De Ryck, E. Hendrickx, H. Grundmann, and M. J. Struelens.** 2008. Clonal distribution of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* invasive isolates in Belgium, EARSS/SeqNet study, 2006-2007, abstr. P-1431, p.127. Abstr. 18th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
10. **Denis, O., A. Deplano, H. De Beenhouwer, M. Hallin, G. Huysmans, M. G. Garrino, Y. Glupczynski, X. Malaviolle, A. Vergison, and M. J. Struelens.** 2005. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. J. Antimicrob. Chemother. **56**:1103–1106.
11. **Dohin, B., Y. Gillet, R. Kohler, G. Lina, F. Vandenesch, P. Vanhems, D. Floret, and J. Etienne.** 2007. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. Pediatr. Infect. Dis. J. **26**:1042–1048.
12. **Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J. Clin. Microbiol. **44**:847–853.
13. **Ellington, M. J., I. McCormick Smith, M. Warner, M. Ganner, B. D. Cookson, R. L. Hill, A. P. Johnson, and A. M. Kearns.** 2008. EARRS-SEQNET surveillance of *S. aureus* associated with bacteraemia in the UK during 2006, abstr. P-1418, p.126. Abstr. 18th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
14. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **38**:1008–1015.
15. **Faria, N. A., J. A. Carrico, D. C. Oliveira, M. Ramirez, and H. de Lencastre.** 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. **46**:136–144.
16. **Ferry, T., M. Bes, O. Dauwalder, H. Meugnier, G. Lina, F. Forey, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2006. Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone compared with that of other pandemic clones. J. Clin. Microbiol. **44**:2642–2644.
17. **French Society for Microbiology.** 2007. Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiology. http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2.
18. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, J. C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piemont, N. Brousse, D. Floret, and J. Etienne.** 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet **359**:753–759.
19. **Gomes, A. R., I. S. Sanches, M. Aires de Sousa, E. Castaneda, and H. de Lencastre.** 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. Microb. Drug Resist. **7**:23–32.
20. **Hanssen, A. M., and J. U. Sollid.** 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:1671–1677.
21. **Heusser, R., M. Ender, B. Berger-Bachi, and N. McCallum.** 2007. Mosaic staphylococcal cassette chromosome *mec* containing two recombinase loci and a new *mec* complex, B2. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:390–393.
22. **Holmes, A., M. Ganner, S. McGuane, T. L. Pitt, B. D. Cookson, and A. M. Kearns.** 2005. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J. Clin. Microbiol. **43**:2384–2390.
23. **Holtfreter, S., D. Grumann, M. Schmudde, H. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K. Kopron, J. Kolata, S. Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W. Witte, and B. M. Broker.** 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. **45**:2669–2680.
24. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1323–1336.
25. **Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch.** 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. **70**:631–641.
26. **Kondo, Y., T. Ito, X. X. Ma, S. Watanabe, B. N. Kreiswirth, J. Etienne, and K. Hiramatsu.** 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:264–274.
27. **Kresken, M., J. Brauers, B. Strommenger, and W. Witte.** 2008. Spread of MRSA clones in German hospitals and in vitro activity of tigecycline, abstr. P-1433, p.127. Abstr. 18th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
28. **Lelievre, H., G. Lina, M. E. Jones, C. Olive, F. Forey, M. Roussel-Delvallez, M. H. Nicolas-Chanoine, C. M. Bebear, V. Jarlier, A. Andremont, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. J. Clin. Microbiol. **37**:3452–3457.
29. **Lina, G., G. Durand, C. Berchich, B. Short, H. Meugnier, F. Vandenesch, J. Etienne, and M. C. Enright.** 2006. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis. Clin. Microbiol. Infect. **12**:1175–1184.
30. **Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, and K. Hiramatsu.** 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1147–1152.
31. **Maier, J., H. Melzl, U. Reischl, I. Drubel, W. Witte, N. Lehn, and H. Linde.** 2005. Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Germany associated with travel or foreign family origin. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **24**:637–639.
32. **McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, and F. C. Tenover.** 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J. Clin. Microbiol. **41**:5113–5120.
33. **Oliveira, D. C., and H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2155–2161.
34. **Oliveira, D. C., C. Milheirico, and H. de Lencastre.** 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:3457–3459.
35. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Microb. Drug Resist. **7**:349–361.
36. **Oliveira, D. C., A. Tomasz, and H. de Lencastre.** 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect. Dis. **2**:180–189.
37. **Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **70**:4987–4996.
38. **Perez-Roth, E., F. Lorenzo-Diaz, N. Batista, A. Moreno, and S. Mendez-Alvarez.** 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. J. Clin. Microbiol. **42**:4649–4656.
39. **Robert, J., J. Etienne, and X. Bertrand.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. Clin. Microbiol. Infect. **11**:585–587.
40. **Sá-Leão, R., I. Santos Sanches, D. Dias, I. Peres, R. M. Barros, and H. de Lencastre.** 1999. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? J. Clin. Microbiol. **37**:1913–1920.
41. **Takano, T., W. Higuchi, T. Otsuka, T. Baranovich, S. Enany, K. Saito, H. Isobe, S. Dohmae, K. Ozaki, M. Takano, Y. Iwao, M. Shibuya, T. Okubo, S. Yabe, D. Shi, I. Reva, L. J. Teng, and T. Yamamoto.** 2008. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:837–845.
42. **Tristan, A., M. Bes, H. Meugnier, G. Lina, B. Bozdogan, P. Courvalin, M. E. Reverdy, M. C. Enright, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 2007. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg. Infect. Dis. **13**:594–600.
43. **Tristan, A., L. Ying, M. Bes, J. Etienne, F. Vandenesch, and G. Lina.** 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. J. Clin. Microbiol. **41**:4465–4467.
44. **van Wamel, W. J., S. H. Rooijakkers, M. Ruyken, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J. Bacteriol. **188**:1310–1315.
45. **Witte, W., C. Braulke, C. Cuny, B. Strommenger, G. Werner, D. Heuck, U. Jappe, C. Wendt, H. J. Linde, and D. Harmsen.** 2005. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **24**:1–5.

2. Toxin profiling of *S. aureus* strains involved in varicella superinfection

Olivia Raulin, **Géraldine Durand**, Yves Gillet, Michèle Bes, Gerard Lina, François Vandenesch, Daniel Floret, Jerome Etienne et Frédéric Laurent.

Soumise le 14/10/2009

Journal of clinical microbiology

La varicelle est une maladie infantile, aiguë, ordinairement bénigne due à un virus de la famille des Herpesviridae. Elle se caractérise par une éruption cutanée suivie de l'apparition de vésicules qui se flétrissent et se dessèchent en quelques jours. L'altération de la barrière cutanée favorise la surinfection bactérienne de la peau et des tissus mous. Ces complications bactériennes sont dues principalement à *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*. Une étude française portant sur les hospitalisations dues à des complications de varicelle menée sur 2003-2005 montrait que *S. aureus* était impliqué dans 58% des cas [206].

L'objectif de notre étude était de déterminer l'habillage toxinique et le profil de résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées de surinfections de varicelles et de les confronter à l'expression clinique.

Entre 2002 et 2007, le Centre National de Référence des Staphylocoques a collecté 58 isolats de *S. aureus* impliqués dans les surinfections de varicelle. Le profil toxinique a été déterminé par PCR (recherche de 15 gènes de toxine) et complété par la détermination du fond génétique (type *agr*, *sequence type* en MLST type *spa*) et par la recherche du *mec*A. La susceptibilité aux macrolides a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose selon les recommendations du CA-SFM.

Les résultats ont montré une incidence globale élevée des SARM de 33% (n=19) avec une majorité de souches appartenant au clone Géraldine (n=12). Une toxine majeure a été identifiée chez 53% (n=31) des isolats : exfoliatines ETA et/ou ETB (17.2%), PVL (8.6%) et TSST-1 (27,6%). La symptomatologie clinique corroborait l'habillage toxinique des souches : la présence d'ETA et/ou ETB était associée à un impétigo bulleux ou un syndrome d'exfoliation généralisée alors qu'en présence de la leucocidine de Panton et Valentine des abcès cutanés et un cas de fasciite nécrosante étaient observés. En revanche lorsque la TSST-1 était présente (16 cas), la traduction clinique était plus diversifiée. Nous avons observé six cas de scarlatine et deux cas de choc toxique staphylococcique liés à l'activité superantigénique de la TSST-1. Cependant, de façon surprenante, 11 des 16 isolats possédant la TSST-1 étaient associés à des infections cutanées ou des tissus mous (cellulites). Ces infections avaient la particularité d'être non purulentes et inflammatoires. Quatre patients qui avaient une cellulite présentaient un sydrome toxinique concomittant.

Enfin, en l'absence de toxine majeure, les formes cliniques apparaissaient polymorphes.
Les 19 souches de SARM de l'étude étaient sensibles à la clindamycine. Cette étude montre l'intérêt d'utiliser la clindamycine comme antibiotique antitoxinique lors du traitement des surinfections de varicelle.

Nous avons initié cette étude qui avait d'ailleurs fait l'objet d'un poster aux 8ème Journées Nationales d'Infectiologie, Dijon 2007 (Annexe 3). Olivia Raulin et Frédéric Laurent ont poursuivi et mené à bien ce travail.

Title: Toxin profiling of *Staphylococcus aureus* strains involved in varicella superinfection

Short Title: Varicella and *S. aureus* superinfection

Key words: varicella, *S. aureus*, superinfection, toxin, France

Authors and affiliations: Olivia Raulin[1], Géraldine Durand[1], Yves Gillet[1,2], Michèle Bes[1], Gerard Lina[1], François Vandenesch[1], Daniel Floret[2], Jerome Etienne[1], and Frédéric Laurent[1]

[1] Université de Lyon, Lyon, F-69008, France; Université de Lyon 1, Faculté Laennec, Lyon, F-69008; INSERM U851, Centre National de référence des Staphylocoques, Lyon, F-69008, Lyon; Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie Est, Bron, F-69677, France

[2] Service d'urgence et réanimation pédiatriques, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, F-69677, France

Contact information: Dr Frédéric LAURENT, Centre National de Référence des Staphylocoques, Faculté de médecine Laennec, Université Lyon, Lyon F-69372, France.

Phone: 33478778657. Fax: 33478778658. E-mail: frederic.laurent@chu-lyon.fr

Acknowledgments: The authors are grateful to David Young for editorial assistance.

ABSTRACT

Background: The most common complications of varicella are bacterial skin and soft-tissue infections, generally due to *Staphylococcus aureus* and group A betahaemolytic streptococci. The aim of this study was to characterize the toxin and antibiotic resistance profiles of *S. aureus* isolates involved in varicella complications.

Methods: Between 2002 and 2007, the French Reference Centre for Staphylococci collected 58 *S. aureus* isolates involved in varicella superinfection. All the isolates were characterized by screening for 15 toxin genes, *agr* typing and *mec*A gene detection; some isolates were also studied by *spa* typing, multilocus sequence typing (MLST) and resistance profiling.

Results: A major toxin gene was detected in 53% (31/58) of the isolates (genes of exfoliative toxins A and B 17.2%, Panton-Valentine leukocidin gene 8.6%, toxic shock syndrome toxin-1 gene 27.6%). Most clinical manifestations were directly compatible with the classical activity of these toxins. Nineteen isolates (33%) were resistant to methicillin, and 12 of these isolates belonged to an emerging *agr*2, ST5 clone that harbours the toxic shock syndrome toxin 1 gene.

Conclusions: In view of the high prevalence of MRSA and of toxin expression in this series, clindamycin, an antibiotic with anti-toxinic properties, could be a useful treatment option for varicella patients with *S. aureus* superinfection.

INTRODUCTION

Varicella is an acute, generally benign childhood disease due to varicella-zoster virus. The reported frequency of serious complications is highly variable, probably owing to differences in the methods of data collection, geography, living conditions, vaccine use and hospital admission policies from one study to another. Overall, about 4 to 9% of cases of varicella are complicated (1,2), and these complications account for 71 to 80% of varicella-related hospitalizations (3,4,5). Previously healthy children account for more than 80% of patients with such complications (6). Neurological, gastrointestinal and respiratory disorders are often reported (6,7) but bacterial superinfection represents 31 to 70% of all varicella-associated events (2,4,8). Superficial skin infections account for 20 to 50% of all varicella complications and for most cases of skin scarring (4,5,6).

In previously healthy children with varicella, bacterial superinfection is facilitated by skin barrier disruption and possibly by transient virus-induced alterations of local immunity (9). *Staphylococcus aureus* and group A beta haemolytic streptococci are the two most common bacterial pathogens isolated in this setting, and both can cause invasive infections (5,10). *S. aureus* is the predominant species in most recent large studies with bacteriological documentation (4,5). *S. aureus* is frequently responsible for skin and soft-tissue infections (SSTIs), sometimes involving toxin production. Staphylococcal toxins have a wide array of biological properties, including exfoliative, suppurative and superantigenic effects (11). For example, exfoliatins A and B (ETA, ETB) split the desmosomes that cement cells together. Loss of keratinocyte cell-cell adhesion can culminate in bullous impetigo or in a generalized form called staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS) (12). Panton Valentine leukocidin (PVL) forms pores in the outer membrane of polymorphonuclear leukocytes (PMN) (13), triggering their apoptosis. PVL secretion by *S. aureus* is mainly associated with necrotic suppurative lesions such as furuncles and abscesses in skin and subcutaneous tissue, and sometimes with deep-seated infections such as necrotizing pneumonia (14). TSST-1 can activate vast numbers of T cells, triggering inappropriate cytokine release (15). Superantigenic toxins cause a variety of

illnesses, ranging from toxic shock syndrome (TSS) to staphylococcal scarlet fever and neonatal toxic shock exanthematous diseases (NTED) (16,17).

In France about 700 000 cases of varicella are diagnosed annually, of which 90% involve children under 10 years of age. A French national survey of paediatric hospitalizations for varicella in 2003-2005 showed that *S. aureus* was involved in 58% of 299 documented cases of bacterial superinfection (4). Extrapolating from this survey, it would appear that *S. aureus* superinfection occurs in about 10 000 children with varicella annually. The aims of the present study were i) to characterize the toxin profiles of *S. aureus* isolates involved in varicella superinfection, and ii) to seek correlations between toxin expression and clinical manifestations for a better understanding of physiopathology of complications and a better care of the patients.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patients and strain collection

From 2002 to 2007 the French National Reference Centre for Staphylococci received 58 *S. aureus* isolates from patients with infectious complications of varicella. The isolates were submitted for toxin gene detection. A single isolate was selected per patient. For each case, demographic and clinical information was collected either passively when the French reference centre received the isolate, or actively by a retrospective search in the medical file for missing data. Clinical manifestations were subdivided into SSTIs (cellulitis, necrotizing fasciitis, abscess, bullous impetigo, and SSSS; other lesions were considered non specific) and systemic manifestations (sepsis, septic shock, staphylococcal scarlet fever, and TSS) (Table 1).

Laboratory methods

The isolates were grown on brain-heart infusion agar at 37°C overnight. Genomic DNA was extracted with a standard procedure (18). Amplification of *gyr*A was used to confirm the quality of each DNA extract and the absence of PCR inhibitors. The *agr* group (*agr* 1-4) was determined by PCR as previously described (18). The *mecA* gene (coding for methicillin resistance) was detected by PCR as described by Murakami et al. (19). Susceptibility to macrolides (erythromycin, lincomycin and

pristinamycin) was determined by the agar plate disk diffusion method and interpreted with the guidelines of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (20). The susceptibility to clindamycin was deduced from the susceptibility to lincomycin according to the CA-SFM guideline.

The isolates were screened for 15 staphylococcal virulence genes (staphylococcal enterotoxin genes (*sea-d*, *seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo*), toxic-shock syndrome toxin gene (*tst*), exfoliative toxin genes (*eta*, *etb*), PVL genes (*luk*-PV genes), the class F *luk*M leukocidin gene (*luk*M) and the beta-hemolysin gene (*hlb*)), as previously described (18). Representative isolates were *spa* typed as previously described (21). The repeat region of the protein A gene (*spa*) was amplified by PCR and sequenced. *Spa* types were determined with Ridom Staph Type software (Ridom GmbH, Würzburg, Germany), which automatically detects *spa* repeats and assigns a *spa* type according to Harmsen et al. (22) (http://spaserver.ridom.de). Multilocus sequence typing (MLST) was applied to representative methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates, as described elsewhere (23). The allelic profiles were determined by sequencing 500-bp internal fragments of seven housekeeping genes (*arc*C, *aro*E, *glp*F, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqi*L). Nucleotide sequences were entered on the MLST home page (http://saureus.mlst.net), where seven numbers depicting the allelic profile and defining a sequence type (ST) were assigned.

RESULTS AND DISCUSSION

The survey of staphylococcal infections secondary to varicella identified 58 cases (26 females and 32 males) between 2002 and 2007. The patients' median age was 2 years (1 month – 22 years; mean 2.4 years). The clinical manifestations consisted of 47 SSTIs (72%) and 18 systemic disorders (28%) (Table 1). Seven patients had both local and systemic manifestations.

As the survey was based on spontaneous notifications to the French reference center, a reporting bias cannot be excluded, possibly favoring cases most evocative of toxin production, particularly severe cases, or cases of treatment failure. Nevertheless, the patients' median age is compatible with that observed in epidemiological studies of varicella bacterial superinfection (1,4). Moreover, 19 of the

58 isolates were from hospitals in the city of Lyon, and these 19 isolates corresponded to almost all isolates from patients with varicella superinfection, whatever their clinical manifestations. Importantly, the genotypic and phenotypic features of these 19 isolates were not significantly different from those of the overall panel of isolates.

To identify the potential role of a toxin in the different clinical manifestations, the cases were divided into two groups: i) the 31 cases (53%) associated with major toxins known to be associated with severe systemic syndromes (ETA/ETB and generalized exfoliation; PVL and necrotizing pneumonia and abscesses; and TSST-1 and toxic shock syndrome); and ii) cases associated with other toxins (such as enterotoxins) that are less clearly linked to specific clinical disorders.

The *eta* gene was detected in 10 isolates (17%), and was associated with *etb* in two cases. These isolates had varied genetic backgrounds, reflected by the diversity of their *agr* types (Table 1). The corresponding patients' clinical manifestations (SSSS and bullous impetigo in 7 and 3 cases, respectively) were directly compatible with classical toxin activity (12,24).

PVL genes were detected in five isolates, a prevalence (9%) higher than that observed in a 3-year French hospital survey of PVL-producing *S. aureus* (0.7%) (25). As classically reported, all five isolates were associated with necrotizing infections (abscesses in four cases and necrotizing fasciitis in one case) (26).

The most frequent toxin gene was *tst*, found in 16 isolates (28%). As expected, given the well-known superantigenic activity of TSST-1, there were six cases of scarlet fever and two cases of toxic shock syndrome (27). More surprisingly, 11 (69%) of the *tst*-positive isolates were recovered from patients with SSTIs. These *tst*-positive isolates were exclusively associated with non suppurative cutaneous lesions and cellulitis, contrasting with the suppurative forms associated with PVL and the exfoliative forms associated with ETA and ETB. This suggests that *tst*-associated SSTIs are due more to an inflammatory process than to pus production or to the direct action of the toxin. Four patients had concomitant toxic manifestations (scarlet fever, n=2; TSS, n=2) and SSTIs (cellulitis, n=4). Twelve of the 16 *tst*-positive isolates belonged to an emerging MRSA clone named Geraldine (28), yet they were associated with a wide variety of clinical manifestations. This clinical heterogeneity might be explained by the complex expression of *tst*, that is influenced *in vitro* by

environmental conditions such as pH, CO_2 and glucose (29) and *in vivo* by the patient's immunological status (30).

The remaining 27 isolates (46%) did not harbor *tst*, *eta*/*etb* or *luk*-PV (Table 1). The associated clinical manifestations were highly variable, and no clear association could be established with the toxin profiles. Combined use of *agr* typing, *spa* typing and toxin profiling failed to identify a dominant clone. Twenty-one of these isolates were associated with SSTIs, including two cases of exfoliatin-negative bullous impetigo. It is conceivable that these two strains expressed variants of ETA or ETB. One strain was associated with necrotizing fasciitis, in a patient with no evidence of concomitant group A betahaemolytic streptococcal infection (as also in the case of necrotizing fasciitis associated with a PVL-positive strain). The other SSTIs were not associated with specific toxins. Eight isolates were associated with systemic manifestations (concomitant with SSTIs in two cases), including five cases of scarlet fever associated with strains harboring superantigenic toxin genes (*seb*, n=3; *sec* n=2). In the last three cases, involving sepsis or septic shock, two isolates were *agr*1, ST045, *sec*-positive, and *sel-o*-positive; while the third was *agr*3, ST1, *sea*-positive, *sec*-positive, *she*-positive, and *sel*-positive.

A major finding in this study is the high frequency of *mec*A, the gene conferring methicillin resistance: 19 (33%) of the 58 *S. aureus* isolates were *mec*A-positive. In Europe, MRSA account for less than 5% of paediatric *S. aureus* isolates in the community setting (31,32), and for less than 11% of isolates from SSTI patients in France (33). Sixteen of the 19 MRSA isolates belonged to known community-acquired MRSA (C-MRSA) clones. The main C-MRSA clone was the Geraldine clone (n=12, 63%), characterized by the *agr*2 allele, ST5, *spa t*002 or related, and the presence of the *tst* gene (Table 2). It has been described as an emerging clone in France, initially associated with both toxic shock syndrome and suppurative infections, mainly in children with a median age of 3 years (34). In a recent French multicenter study, this clone accounted for 6.3% of invasive MRSA isolates (28). Its high prevalence in the present study suggests broad geographical dissemination and frequent colonization of children. The other C-MRSA clones were sporadic. Two isolates belonged to the European PVL-positive ST80-IV clone (*agr*3, *spa t*044) (Table 2). Two other MRSA isolates shared characteristics of the American epidemic

PVL-positive C-MRSA clone USA300 (*agr*1, ST8, *spa-t*008) (35,36). One isolate belonged to the ST88 *eta*-positive *agr*3 clone that has been reported frequently in Japan but rarely in Europe (37,38). The two remaining isolates were *seb-positive* and *sek*-positive, ST59, *agr*1 and *spa t*216.

Thus, the clinical manifestations of these cases of staphylococcal superinfection in varicella patients were largely compatible with direct effects of toxins (ETA/ETB, PVL, and TSST-1), suggesting that toxin inhibition could be clinically beneficial. Various antimicrobial agents show activity on staphylococcal and streptococcal toxin production *in vitro* (39,40). In particular, clindamycin inhibits bacterial protein synthesis by interfering with the formation of initiation complexes and with aminoacyl translocation reactions. Clindamycin appears to be a judicious therapeutic option in this setting, as i) it shows good pharmacodynamic behaviour in cutaneous tissue; ii) it had bacteriostatic activity on all 19 MRSA isolates studied here (Table 2); and iii) paediatricians have extensive experience with this antibiotic (41). Clindamycin could thus be added to the usual beta-lactam regimens used in varicella superinfection, especially when the clinical manifestations are evocative of toxin activity. Clindamycin also has the potential to become the reference treatment for varicella superinfection in settings where the prevalence of clindamycin-resistant group A betahaemolytic streptococci is low.

In conclusion, this first study of the toxin profiles of *S. aureus* strains involved in varicella superinfection shows that major toxins (TSST-1, ETA, ETB and PVL) are present in about half the cases and *mec*A in one-third of cases. Clindamycin has the properties necessary to become a standard additional treatment for bacterial superinfection in children with varicella.

Table 1: Characterization of *S. aureus* isolates associated with varicella superinfection

		Number (%)	Toxin genes			
			eta* and/or *etb* n (%)	***luk*-PV**** n (%)	***tst***** n (%)	**Others** n (%)
Total		**58**	10 (17.2)	5 (8.6)	16 (27.6)	27 (46.5)
Methicillin resistant (*mecA +*)		**19 (33)**	1	4	12	2
***agr* group**	*agr*1	**16**	-	2	1	13
	*agr*2	**25**	4	-	12	9
	*agr*3	**10**	1	2	3	4
	*agr*4	**7**	5	1	-	1
Skin and soft tissues infections		**47 (72)**	**10**	**5**	**11**	**21**
Non-specific cutaneous lesions		**9**	-	-	2	7
Cellulitis		**17**	-	-	9	8
Necrotizing fasciitis		**2**	-	1	-	1
Abscess		**6**	-	4	-	2
Bullous impetigo		**6**	3	-	-	3
Scalded skin syndrome (SSSS)		**7**	7	-	-	-
Systemic manifestations		**18 (28)**	**0**	**0**	**10**	**8**
Sepsis		**2**	-	-	1	1
Septic shock		**3**	-	-	1	2
Scarlet fever		**11**	-	-	6	5
Toxic shock syndrome (TSS)		**2**	-	-	2	-

* *eta* and *etb*: genes of exfoliatin toxin A and exfoliatin toxin B**, luk-PV: genes of Panton Valentine leukocidin, *** *tst*: gene of toxic shock syndrome toxin-1

Table 2: Characteristics of the 19 MRSA isolates associated with varicella superinfection

Clone designation	**n**	**ST**	***spa* type**	***agr* group**	**Toxin genes**	**Susceptibility to clindamycin**
Clone Geraldine	12	5	*t*002	2	*tst, sec, sed, sel, sem, seo*	12*
European clone ST80-IV	2	80	*t*044	3	*luk*-PV	2
USA 300 clone	2	8	*t*008	1	*luk*-PV, *sek*	2**
	2	59	*t*216	1	*seb, sek*	2
Undesignated	1	88	*t*186	3	*eta*	1

* 4 isolates resistant to erythromycin, with induction between erythromycin and lincomycin

** 1 isolate resistant to erythromycin, with no induction between erythromycin and lincomycin

References

1. Bonmarin I, Ndiaye B, Seringe E, Levy-Bruhl D. The epidemiology of varicella in France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 2005;8:30-32.

2. Emery C, Lancon F, Fagnani F, et al. Prise en charge de la varicelle et de ses complications en médecine ambulatoire en France: l'étude ENVOL. *Med Mal Infect*. 2006;36:92-98.

3. Bonhoeffer J, Baer G, Muehleisen B, et al. Prospective surveillance of hospitalisations associated with varicella-zoster virus infections in children and adolescents. *Eur J Pediatr*. 2005;164:366-370.

4. Grimprel E, Levy C, de La Rocque F, et al. Paediatric varicella hospitalisations in France: a nationwide survey. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:546-549.

5. Peterson CL, Mascola L, Chao SM, et al. Children hospitalized for varicella: a prevaccine review. *J Pediatr*. 1996;129:529-536.

6. Mallet E, Maitre M, Delalande-Dutilleul L, Marguet C, Mouterde O. Évaluation des complications de la varicelle à partir d'une enquête hospitalière rétrospective menée dans un service de pédiatrie pendant 16 ans en France. *Arch Pediatr*. 2004;11:1145-1151.

7. Liese JG, Grote V, Rosenfeld E, et al. The burden of varicella complications before the introduction of routine varicella vaccination in Germany. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:119-124.

8. Jaeggi A, Zurbruegg RP, Aebi C. Complications of varicella in a defined central European population. *Arch Dis Child*. 1998;79:472-477.

9. Aebi C, Ahmed A, Ramilo O. Bacterial complications of primary varicella in children. *Clin Infect Dis*. 1996;23:698-705.

10. Lesko SM, O'Brien KL, Schwartz B, Vezina R, Mitchell AA. Invasive group A streptococcal infection and nonsteroidal antiinflammatory drug use among children with primary varicella. *Pediatrics*. 2001;107:1108-1115.

11. Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, et al. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *J Leukoc Biol*. 2006;80:753-758.

12. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang Z, Andl C, Stanley J. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*. 2000;6:1275-1277.

13. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68:981-1003.

14. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:978-984.

15. Kum WW, Cameron SB, Hung RW, Kalyan S, Chow AW. Temporal sequence and kinetics of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine secretion induced by toxic shock syndrome toxin 1 in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 2001;69:7544-7549.

16. Descloux E, Perpoint T, Ferry T, et al. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:37-43.

17. Takahashi N. Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease (NTED). *Pediatr Int*. 2003;45:233-237.

18. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*. 2002;70:631-641.

19. Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2240-2244.

20. Comité de l'Antibiogramme. Communiqué 2008. Société Française de Microbiologie, 2008.

21. Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkotter N, Rothganger J, Karch H, Reintjes R, et al. Automated DNA sequence-based early warning system for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreaks. PLoS Med 2006;3(3):e33.

22. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003;41(12):5442-8.

23. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1008-1015.

24. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci*. 2008;49:21-31.

25. Robert J, Etienne J, Bertrand X, Onerba. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:585-587.

26. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1128-1132.

27. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:77-104.

28. Dauwalder O, Lina G, Durand G, et al. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3454-3458.

29. Seidl K, Bischoff M, Berger-Bachi B. CcpA mediates the catabolite repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2008;76:5093-5099.

30. Parsonnet J, Hansmann MA, Delaney ML, et al. Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4628-4634.

31. Heininger U, Datta F, Gervaix A, et al. Prevalence of nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children a multicenter cross-sectional study. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:544-546.

32. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, et al. Community-associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:995-1001.

33. Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, 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;154:118-124.

34. Durand G, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol*. 2006;44:847-853.

35. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006;355:666-674.

36. Tristan A, Bes M, Meugnier H, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:594-600.

37. Yamaguchi T, Yokota Y, Terajima J, et al. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *J Infect Dis*. 2002;185:1511-1516.

38. Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. *J Clin Microbiol*. 2004;42:825-828.

39. Russell NE, Pachorek RE. Clindamycin in the treatment of streptococcal and staphylococcal toxic shock syndromes. *Ann Pharmacother*. 2000;34:936-939.

40. Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, et al. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1515-1519.

41. Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, et al. Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:530-534.

IV- Pathogénie d'un clone de SARM possédant le gène de la TSST-1

The community- and- hospital-acquired ST5/TSST-1 MRSA clone is a pleiotropic pathogen with a peculiar truncated SCC*mec* I element.

Géraldine Durand, Olivier Dauwalder, Oana Dumitrescu, Damien Thomas, Frédéric Laurent, Michèle Bes, Yvonne Benito, Hélène Meugnier, Gerard Lina, Jerome Etienne, François Vandenesch et Anne Tristan

Soumise le 21/10/2009

Clinical and Vaccine Immunology

Les premières descriptions du clone Géraldine ont montré qu'il était responsable d'une grande diversité d'infections survenant à la fois en milieu hospitalier et communautaire. Afin d'identifier le pouvoir pathogène de ce clone nous avons investigué le rôle potentiel de la TSST-1 dans la présentation clinique.

Nous avons analysé 88 isolats du clone Géraldine, impliqués dans des infections communautaires et hospitalières. Parmi ces isolats, 33% étaient responsables de syndromes toxiniques et 67%, d'infections suppuratives (majoritairement des infections cutanées et des tissus mous). Ces infections concernaient principalement des sujets jeunes avec un âge médian de 26 ans.

Nous avons comparé les isolats responsables d'infections toxiniques avec ceux responsables d'infections suppuratives. Nos résultats n'ont montré aucune différence entre ces isolats d'expression clinique différente : (i) dans la production de TSST-1 mesurée *in vitro* par technique ELISA, (ii) dans l'activation du répertoire Vβ2 mesuré *in vitro*, (iii) dans l'adhésion aux composés de la matrice extracellulaire mesurée *in vitro*.

Les travaux de Vojtov et al ont montré que la TSST-1 réprimait l'expression des autres exoprotéines au niveau transcriptionnel [207]. Afin d'investiguer cette hypothèse nous avons construit un couple isogénique pour le gène *tst* à partir d'un isolat clinique du clone Géraldine dans lequel nous avons délété le gène *tst* par remplacement allèlique. L'analyse de la production protéique par SDS Page n'a révélé aucune différence entre la souche sauvage *tst*$^+$ et la souche mutée Δ*tst.* Nous avons également étudié l'adhésion du couple isogénique à des composants de la matrice extracellulaire mais nous n'avons observé aucune différence. Par ailleurs le clone Géraldine possédant plusieurs exotoxines superantigéniques, nous avons étudié les profils Vβ du couple isogénique. L'analyse des profils Vβ a révélé quelques différences. Sur le profil Vβ de la souche sauvage *tst*$^+$, excepté la signature Vβ2 de la TSST-1, aucune autre signature superantigénique n'était identifiable. Par contre chez la souche délétée Δ*tst*, dans laquelle on ne retrouvait pas d'expansion du répertoire Vβ2, une partielle expansion des répertoires de SEC et SED/SEI a été observée. Du fait de l'absence de la TSST-1, cette partielle expansion pourrait s'expliquer par la suppression de l'anergie induite par la TSST-1 sur la prolifération des LyT non Vβ2. [208].

Nos résultats ne nous permettent pas d'établir le rôle de la TSST-1 dans la régulation de l'expression des autres exoprotéines. La TSST-1 ne semble pas jouer un rôle déterminant (direct ou indirect) dans la pathogénie et l'épidémicité du clone Géraldine.

Cependant, ce clone est pourvu d'une cassette SCC*mec* particulière puisqu'il s'agit d'une cassette SCC*mec* I tronquée dans laquelle le gène *pls* impliqué dans la réduction de l'adhésion et de l'invasion cellulaire a été délété. Cette cassette pourrait jouer un rôle dans la virulence et la transmission du clone Géraldine.

The community- and hospital-acquired ST5/TSST-1 MRSA clone is a pleiotropic pathogen with a peculiar truncated SCC*mec*I element

A *tst* positive MRSA clone with a peculiar truncated SCC*mec*I element

Geraldine Durand[1,2], Olivier Dauwalder[1,2], Oana Dumitrescu[1,2], Frederic Laurent[1,2], Michele Bes[1,2], Yvonne Benito[1,2], Helene Meugnier[1,2], Gerard Lina[1,2], Jerome Etienne[1,2], François Vandenesch[1,2], Anne Tristan[1,2*]

[1]Centre National de Référence des Staphylocoques; Université Lyon 1; INSERM U851, IFR 128, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France.

[2]Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Laboratoire de Bactériologie, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron, France.

Corresponding author

Anne Tristan

Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM U851, IFR 128

Faculté de Médecine Laennec, Université Lyon 1

7 rue Guillaume Paradin,

69008 Lyon, France

E-mail: anne.tristan@univ-lyon1.fr

Phone: +33 (0) 4-78-77-86-57

Fax: +33 (0) 4-78-77-86-58

Key words**: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, toxic shock syndrome toxin, staphylococcal cassette chromosome *mec***

ABSTRACT

ST5 MRSA *tst*-positive also known as Geraldine clone was described as being responsible for a wide diversity of diseases. To further characterise the pathogenic potential of this clone and investigate the putative direct or indirect role of TSST-1 in the clinical presentations, we analysed 88 strains of the Geraldine clone responsible for community- and hospital-acquired infections (toxemia 33%, suppurative infections 67%) with a patient median age of 26 years. No differences in TSST-1 production (by ELISA), Vß2 activation, or adhesion to extracellular matrice (ECM) components were found between isolates associated with toxemia and those associated with suppurative infections. To assess whether TSST-1 could affect the global exoprotein production in this clone (37), we constructed a *tst* knockout from one clinical isolate. There were no difference in protein expression between the wild type and the Δ*tst* derivative. The T-cell Vß expansion induced by these two strains revealed a difference in the Vß2, typical of TSST-1, and with the ∆*tst* strain a slight expansion of the Vß typical of SEC and SED/SEI, such expansion being attributed to the relief of the TSST-1-induced non-Vß2 anergy and not to a de-repression of SEC and SED/SEI expression. These findings suggest that TSST-1 does not play a determining role (either directly or indirectly) in the pathogenesis or epidemicity of the Geraldine clone. However, we found that this clone contains a new subtype of the SCC*mec* I element, characterised by the deletion of the *pls* gene. Whether this truncated SCC*mec* type I cassette could play a role in virulence and transmission is currently under investigation.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a well-known pathogen that is responsible for suppurative and deep-seated infections as well as toxin-associated diseases, such as toxic shock syndrome (TSS). TSS is characterised by the sudden onset of fever, cutaneous symptoms (rash followed by desquamation), hypotension, and multi-system involvement. Most reported cases are menstrual TSS (MTSS) involving young, healthy menstruating women, especially those using tampons. TSS unrelated to menstruation can also occur. Unlike patients with MTSS, patients with non-menstrual TSS (NMTSS) are a heterogeneous group with a wide age range, various comorbidities, and different sites and types of *S. aureus* infection. The most striking difference between MTSS and NMTSS is the higher mortality rate associated with NMTSS (22% versus 0%) (6). Scarlet fever is a minor form of TSS and is characterised by the occurrence of fever and rash only. These syndromes have been associated with toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) and staphylococcal enterotoxins (SEs), particularly SEB (10). All of these staphylococcal toxins act as superantigens.

S. aureus strains associated with TSS are usually susceptible to methicillin and mainly correspond to the *agr*3 allele type. In 2006, we reported a new MRSA clone encoding the *tst* gene that was responsible both for TSS and suppurative infections. This emerging strain was designated as the Geraldine clone (4). This clone has the following characteristics: *agr*2, sequence type 5 (ST5), *spa* typing 002 or 002-related (*spa* t002 or t002-related), and capsular type 5. It also possesses the enterotoxin-encoding genes *sec*, *sed, sel* and *egc* and has a unique antibiotic resistance profile (usually resistant to oxacillin, kanamycin, tobramycin, and intermediately resistant to fusidic acid) (8).

Vojtov *et al.* reported that in RN4282 $^{(tst+)}$, TSST-1 determines its own expression level by repressing the transcription of many exoprotein genes (37). According to this model, strains causing TSS produce high levels of TSST-1 and small quantities of other exoproteins, which explains in part why primary focal infections of NMTSS are often minor or apurulent. Moreover, in a mouse model, Vojtov *et al.* showed that injections of RN4282 $^{(tst+)}$ into the flanks of mice produced no visible lesions, with inhibition of

inflammation after one day; in contrast, the knockout strain RN4282 (*tst*-) produced the usual abscess with visible inflammation.

In the present work, we report 88 infections associated with the ST5/TSST-1-positive MRSA strain. The aims of this study were as follows: (i) to complete the characterisation of this strain (including the Staphylococal cassette chromosome *mec,* SCC*mec*) and the spectrum of associated infections; (ii) to quantify the level of TSST-1 expression in strains responsible for either toxin–mediated syndromes or suppurative infections; (iii) to analyse the putative regulatory role of TSST-1 by constructing a *tst* knockout from one clinical isolate; and (iv) to attempt the discrimination of strains responsible for different diseases based on TSST-1 production, ECM adhesion, and Vß activation patterns.

MATERIALS AND METHODS

***S. aureus* strains.** Between 2002 and 2007, the French National Reference Centre for Staphylococci received 5716 strains of *S. aureus* from various countries. These strains were sent voluntarily to the Centre for clone designation by toxin gene detection and for genomic characterisation. One hundred and one *tst*+ *agr*2 MRSA isolates from 88 infected patients and 13 carriers were collected during this period in France, Switzerland, and Morocco.

Definitions and diagnoses. TSS was defined according to the CDC diagnostic criteria (http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/toxicsscurrent.htm). Both confirmed and probable cases of TSS were included. NTED (neonatal toxic shock-like exanthematous disease) and scarlet fever were diagnosed according to the description provided by Lina *et al*. (22). Most studies of hospitalised patients have used a time-based approach to distinguish between community-acquired and nosocomial infections; that is, infections present on admission or diagnosed within 48–72 h of admission were considered to be community acquired (33). The same approach was used in the current study.

DNA extraction. The *S. aureus* strains were grown overnight on brain-heart infusion agar or in brain-heart infusion broth at 37°C. Genomic DNA was extracted using a standard procedure (17). The *gyr*A gene was amplified to confirm the quality of each DNA extract and the absence of PCR inhibitors. All PCR products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gels containing ethidium bromide (Sigma, France).

Identification of *agr* alleles. The *agr* group (*agr* 1-4) of each isolate was determined by PCR as previously described (17).

Detection of the *mecA* gene. The *mecA* gene (codes for methicillin resistance) was detected by PCR as previously described (27).

SCC*mec* typing. To determine SCC*mec* types, two different methods were applied: multiplex PCR typing as described by Oliveira *et al*. (31) and PCR as performed by Kondo *et al.* (20). In the present study, M-PCR1 primers were used to amplify the *ccr* gene complex type with *mecA* and M-PCR2 primers were used to amplify the *mecA* gene complex class. For further confirmation of the SCC*mec* type, an internal fragment of *ccrB* was sequenced as described by Oliveira *et al.* (32).
The following reference strains (kindly provided by Herminia de Lencastre, Alexander Tomasz and Graeme Nimmo) were used as controls: COL (SCC*mec* I), BK2464 (SCC*mec* II), HU106 (SCC*mec* III), BK2529 (SCC*mec* IV), WCH100 (SCC*mec* V) and HDE288 (SCC*mec* VI).

Detection of toxin genes. Sequences specific for the following genes were detected by PCR using existing methods (15, 17): staphylococcal enterotoxins (*sea-e, seh, sek, sel sem,* and *seo*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), exfoliative toxins (*eta, etb,* and *etd*), and leukocidins (*lukS-PV, lukF-PV*, *luk*E, *luk*D, and *luk*M*), as well as* gamma (*hlg*), gamma variant (*hlgv*), and beta (*hlb)* hemolysins.

Antimicrobial susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of penicillin, oxacillin, cefoxitin, kanamycin, tobramycin, gentamicin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, pristinamycin, ofloxacin, fusidic acid, vancomycin, teicoplanin, fosfomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, rifampin, mupirocin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid were determined for each isolate using the standard agar dilution technique recommended by the French Society for Microbiology.

***spa* typing.** *spa* typing was performed on TSST-1-positive MRSA isolates as previously described (23). The repeat region of the protein A gene (*spa*) was amplified by PCR and sequenced. *spa* types were determined using the Ridom Staph Type software (Ridom GmbH, Würzburg, Germany), which automatically detects *spa* repeats and assigns a *spa* type according to Harmsen et *al.* (14) (http://spaserver.ridom.de). *spa* types were clustered into clonal complexes (*spa*CC) using the integrated BURP algorithm (Based Upon Repeat Patterns), a heuristic variant of the EDSI algorithm (24, 34). User-definable parameters were set as follows: “cluster *spa* types into *spa*CC if cost distances are less than 4” and “exclude *spa* types shorter than 5 repeats”. This parameter combination ensures optimal concordance (95.3%) between BURP and eBURST (25).

Multilocus sequence typing (MLST). MLST was performed on representative strains from each clonal group using established methods (9). The allelic profile of each strain was obtained by sequencing internal fragments of seven housekeeping genes (*arcC, aroE, glpF, gmk, pta, tpi,* and *yqiL*). The sequences obtained were entered into the *S. aureus* MLST home page (http://saureus.mlst.net), which then determined the sequence types (STs) of each strain based on their allelic profiles (9). Similar sequence types were grouped into clonal complexes (CC).

Quantification of TSST-1 by ELISA. TSST-1 production was measured by ELISA method. The quantities were compared according to the type (suppurative or toxinic) and severity of infections. TSST-1 was purchased from Toxin Technology (Sarasota, Fl). TSST-1 concentrations were determined using TSST-1-specific enzyme-linked

immunosorbent assays (Toxin Technology, Sarasota, FL, USA) with minor modifications (11), as recommended by the provider. Four positive control strains with different genetic profiles and harbouring the *tst* gene (*agr*3 *mecA*-negative, responsible for menstrual TSS; *agr*1, *mecA*-positive; *agr*2, *mecA*-negative; and *agr*3, *mecA*-positive) and one negative control strain (LUG 1200, *tst* knockout) were included in the study.

Production of isogenic strains. Inactivation of the *tst* gene was carried out by allelic replacement. A deletion/replacement Δ*tst::kana* mutant of *S. aureus* HT20030749 was obtained using pMAD, a thermo-sensitive plasmid that contains a constitutively expressed ß-galactosidase gene. Thus, positive selection of double crossing-over was possible by following the ß-galactosidase activity on X-gal agar plates (1). Two fragments flanking the *tst* gene were amplified with blunt ends (PWO DNA polymerase, Roche Diagnostics) using the tst51/tst606 and tst1369/tst2085 primers. The PCR products (550 bp and 715 bp) were ligated together before being re-amplified with the external primers tst51 and tst2085 and cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega). The resulting plasmid was digested with *Xho*I (restriction site present on primer tst1369). A 1159-bp DNA fragment from the pCRII cloning vector (Invitrogen) corresponding to the kanamycin resistance gene was amplified using the kcr1/kcr2 primer pair. The fragment was then digested with *Xho*I (restriction site present on each primer) and cloned between the two *tst* fragments. The resulting plasmid was digested with *Sal*I and *Sma*I (present on each site of the insert), ligated to the pMAD vector digested with the same enzymes, and finally transformed into *E. coli.* The resulting plasmid, pLUG668, contained *lacZ* and conferred resistance to ampicillin, kanamycin, and erythromycin. pLUG668 was incorporated into RN4220 and HT20030749 via electroporation. Transformants were grown at the non-permissive temperature (37°C) to select for cells in which the plasmid had been integrated into the chromosome by homologous recombination. To favour the second recombination event, a single colony was grown at 30°C for 10 generations and plated at 37°C overnight. Cells that lost the plasmid vector through double crossing-over were detected on X*gal* agar plates. PCR

amplification was used to confirm the loss of the *tst* gene, which was replaced by the kanamycin resistance gene.

Analysis of T-cell Vβ repertoires. The Vβ profiles of isogenic strains (HT20030749/LUG1200) were determined using previously published flow cytometry methods (36). Experiments were performed with two different blood donors using one negative control strains (FRI *seb*-positive and a *tst*-negative) and one positive control strain responsible for menstrual TSS (*agr*3, *mecA*-negative, *tst*-positive). Six strains of the TSST-1 ST5 clone isolated from patients with various diseases were analysed.

Analysis of supernatant proteins by SDS-PAGE. *S. aureus* cultures were grown in CCY broth without glucose, supplemented with glycerol phosphate (0.1 M), and inoculated with a heavy suspension of *S. aureus* in BHI broth. Cultures were incubated with vigorous shaking for 8 h at 37°C. Culture supernatants were filtered through 0.45 µm (pore size) disposable syringe filters (Millipore Corp., Bedford, Mass.) to remove bacterial cells. The supernatants were concentrated by VIVASPIN (Vivascience). SDS-PAGE was performed according to Laemmli (21) for the isogenic strains (HT20030749/LUG1200).

Adherence of *S. aureus* to ECM components. Adherence to human cellular fibronectin (Sigma), human plasma fibronectin (Sigma), fibrinogen fraction I from human plasma (Sigma), elastin from human lung (Sigma), type I collagen from rat tail, type IV collagen, laminin, and Matrigel™ from the basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma (Sigma) was assessed in ninety-six–well microtitre plates as previously described (5).

RESULTS

Clinical characteristics. Among a total of 88 infection-associated strains of the ST5/TSST-1 MRSA clone, 29 (33%) were associated with toxin-related syndromes, including 26 TSS cases (confirmed or probable; Table 1). The origin of these toxinic syndromes was reported for 18 of the 29 cases: 10 were hospital acquired and 8 cases were community acquired. Hospital-acquired syndromes occurred mainly for NMTSS. The median age of the patients was 25.6 (0-87) years.

The majority of the ST5/TSST-1 infections were suppurative (67%) and involved skin and soft tissues (72.9%), including abscesses, fasciitis, or varicella superinfection. Other infections involved the lungs (6 cases) or bones and joints (7 cases). Fifty-six percent were community acquired. The median age of the infected patients was 26.4 years (0-90).

The ST5/TSST-1 MRSA clone was also detected in 13 carriers (11 nasal swabs and 2 vaginal swabs). The median age of these carriers was 28.4 years (0-74).

Microbiological characteristics of *tst*-positive MRSA isolates. The 88 *tst*-positive *agr*2 MRSA strains all contained *sec*, *sed*, *sel*, *sem,* and *seo* (reflecting the presence of the *egc* cluster) as well as *lukD*, *lukE,* and *hlgv* toxin genes. All isolates tested (48.8%) were resistant to penicillin, oxacillin, kanamycin, and tobramycin and intermediately resistant to fusidic acid. Some isolates were resistant to other antimicrobial agents, such as erythromycin, lincomycin, or tetracycline. The 48 isolates tested all belonged to the same *spa* type complex; 83.3% were *spa* t002 and the remaining 16.7% were of related types (*spa* t010, *spa* t062, *spa* t088, *spa* t242, *spa* t509, *spa* t568, and *spa* t4040). Twenty-nine isolates, representing all *spa* types described above, belonged to ST5, as determined by MLST. Overall, the 88 *tst*-positive *agr*2 MRSA isolates were highly clonally related.

SCC*mec* cassette. The main difference between the present work and the earlier description of this clone concerns the type of SCC*mec* cassette. It was initially identified

as type IV using Oliveira's typing system (31) since the PCR assays were positive for locus D but negative for locus A (which corresponds to the *pls* fragment). However, the use of Kondo's typing system (20) revealed features associated with SCC*mec* type I (*mecA* gene complex class B and *ccrAB* allotype 1). We therefore assume that this clone harbours a new subtype of the SCC*mec* type I element characterised by deletion of the *pls* fragment and propose the name "truncated SCC*mec* type I."

Adhesion of *S. aureus* to ECM components *in vitro*. Fifty isolates of the ST5/TSST-1 MRSA clone detected in patients with infections of varying severity were analysed for their binding capacity to ECM components. Of these, 12 isolates were from TSS or related syndromes, 34 from suppurative infections, 3 from nasal carriage, and 1 from vaginal carriage. The median ECM-binding capacities for toxinic and suppurative strains are presented in Figure 1. Most of the strains tested exhibited a significant capacity to bind cFN, pFN, and laminin, but not type I and IV collagen or Matrigel® at concentrations of 5 and 50 µg/mL. No significant differences were observed among the various clinical origins of the strains (Figure 1).

Expression of TSST-1. The same fifty isolates of the ST5/TSST-1 MRSA clone as well as four TSST-1-positive control strains (see Materials and Methods) were tested for extracellular production of TSST-1 by ELISA. The negative control (*tst* knockout strain) yielded no measurable signal. One positive control strain (*agr*3, *mecA*-negative, *tst*-positive; typical TSS strain) responsible for MTSS displayed a strong positive result, producing 943 ng/mL of TSST-1. The three other positive controls (*agr*1 *mecA*-positive strain responsible for suppurative infection, *agr*2 *mecA*-negative strain responsible for varicella superinfection, and *agr*3 *mecA*-positive strain from nasal carriage) produced 835 ng/mL, 950 ng/mL, and 382 ng/mL of TSST-1, respectively. The clinical isolates in the present study produced TSST-1 in quantities ranging from 450 ng/mL to 1201 ng/mL. The strains responsible for TSS or related syndromes produced 489 ng/mL to 936 ng/mL of TSST-1. The median between the three groups (TSS or TSS-related, suppurative infections, and carriers) did not differ significantly. Unexpectedly, the strains

that produced the highest amounts of TSST-1 were from patients with skin and soft tissue infections (Figure 2).

Activation of the Vß 2 repertoire. Five isolates of the clone representing various types of infections (MTSS, NTED, NMTSS, necrotising fasciitis, and varicella superinfection) were analysed for their capacity to activate Vβ 2 (the "hallmark" of Vß expansion by TSST-1). The FRI *seb*-positive, *tst*-negative strain was used as a negative control. As expected, no Vβ 2 activation was detected for this strain. The positive control, an *agr*3 *tst*-positive, *mec*A-negative strain responsible for MTSS, caused Vβ 2/PHA T cells expansion above 1. This activation was detected for all five clinical strains, ranging from 1.91 for a strain responsible for super infected varicella to 3.13 for a strain responsible for NTED (Figure 3). As with the production of TSST-1 measured by ELISA, the ratio of T cells expressing the Vβ2 repertoire on PHA was not correlated to the type of infection.

Effect of *tst* deletion on total protein production. To test whether TSST-1 could affect global exoprotein production in the clone, a *tst* knockout was constructed by allelic replacement in the isolate HT20030749 (parental). The lack of TSST-1 production in Δ*tst* (LUG1200) was confirmed by ELISA and by the Vß pattern (Figure 3). Post-exponential phase culture supernatants of the parental strain and its Δ*tst* derivative were then compared. The supernatant of the parental strain (Figure 4, lane 1) contained numerous exoproteins in considerable quantities with a strong TSST-1 band. The *tst* knockout strain (Figure 4, lane 2) exhibited the same exoprotein pattern, except for the absence of the TSST-1 band. TSST-1 was not associated with a reduction in overall exoprotein production.

To test the effect of *tst* on the expression of other superantigens, the Vβ repertoires of the isogenic couple for *tst*, which contains the major enterotoxins genes *sec*, *sed, sel* and *egc*, were compared. The *tst*-positive strain resulted in activation of Vβ2/PHA only (1,92), and this effect was absent with the Δ*tst* strain, as expected. With this later strain, it was observed a slight expansion of the Vß repertoires 1, 5.1, 5.2, 5.3, 8, 12, 13.2 and 17, all known to be associated with SEC and SED/SEI (36)(Figure 5).

The isogenic couple was also tested for adhesion to ECM components as described above, and no differences were observed in their binding capacity (data not shown).

DISCUSSION

In the present work, we showed that the ST5/TSST-1-positive MRSA clone (Geraldine clone) is responsible for TSS and TSS-related as well as suppurative syndromes; it was also detected in carriers. Most of the suppurative syndromes were skin and soft tissue infections. The results confirm that the Geraldine clone causes a large spectrum of human diseases. These syndromes and infections occurred in young adults with a median age of approximately 26 years. The Geraldine clone-associated diseases occurred mainly in communities exhibiting suppurative infections (56%) but were either hospital- or community-acquired for the TSS or TSS-related cases (34% and 28%, respectively). The Geraldine clone also contains other enterotoxin genes and is characterised by an unusual, truncated SCC*mec*I. Most of the CA-MRSA strains that have spread worldwide harbour small SCC*mec* elements, such as the type IV or V cassettes. The Geraldine clone is the first example of a community strain with an SCC*mec* type I that is truncated in the *pls* gene. Savolainen *et al.* have previously shown that the presence of the *pls* gene reduces cellular invasiveness and adhesion to host proteins in MRSA (18, 35, 38). In the case of the Geraldine clone, the lack of the *pls* gene could potentially enhance infectivity and cellular adhesion. However, the level of adhesion to several ECM components was in the same range as other clinical strains for fibronectins and laminin, and was even lower level for collagens and Matrigel, which is a good *ex vivo* model of basal membrane (Figure 1) (30).

TSST-1 and some enterotoxins are encoded by genes located on pathogenicity islands (29). Menstrual TSS is predominantly associated with an ST30 MSSA clone of *S. aureus*, which produces both TSST-1 and enterotoxin A (28). In this ST30 clone, *tst* is carried by the SaPI2 pathogenicity island, whereas *sea* is carried by a phage (29). The *tst* gene carried by the ST5 MRSA clone is located on a variant of SaPI named

“SaPIm1, n1”, which also contains the *sec* gene. The *sed* gene present in the ST5 MRSA clone is plasmid-borne (3). These two genes (*sec* and *sed*) were detected in all isolates.

When comparing the characteristics of the isolates from TSS or TSS-related syndromes with those from suppurative infections, no differences in TSST-1 production, Vß2 activation, or adhesion to ECM components were found. Moreover, contrary to the results obtained by Vojtov *et al.* for a different strain background, no differences in protein expression were found between the Geraldine clone and the Δ*tst* derivative. In addition, analysis of T-cell Vβ expansions induced by these two strains revealed only a slight expansion of the the V-ß typical of SEC and SED/SEI with the Δ*tst* strain, Such expansion could be explained by the relief of the TSST-1-induced non-Vß2 anergy(26), and not by a de-repression of SEC and SED/SEI expression. However, we cannot rule out that the modulation of exoprotein production by premature TSST-1 described by Vojtov *et al.* could occur *in vivo* in response to a host environmental signal. Similarly, the level of TSST-1 production *in vitro*, which did not correlate with the clinical presentation, may be dramatically different *in vivo,* as was observed recently for PVL (2, 13). Factors that up-regulate TSST-1 synthesis *in vivo* could contribute to more severe diseases, such as TSS.

The emergence and spreading of community-acquired MRSA is mainly associated with PVL-positive strains. Recognition of the Geraldine clone is simplified by its specific and unusual antibiotic resistance pattern (resistant to methicillin, kanamycin, and tobramycin and intermediately resistant to fusidic acid), which is distinct from the most common PVL-positive European CA-MRSA (resistant to methicillin, kanamycin, and tetracycline and intermediately resistant to fusidic acid) and the most prevalent PVL-positive CA-MRSA in the US (resistant to methicillin, erythromycin, and fluoroquinolones). Detection of the *tst* gene in a large group of isolates with an antibiotic resistance profile typical of the Geraldine clone would allow a better knowledge of the actual epidemiology of this clone. In a recent French multicentre study, this clone represented 6.3% of the invasive MRSA isolates (4). In an unpublished study performed in France in 2008, the Geraldine clone appeared to be the predominant CA-MRSA clone across 99 laboratories (personal

communication Jerome Robert, 2008). This clone appears to be a well-adapted pathogen responsible for a wide range of infections. This diversity contrasts with the smaller extent of infections associated with PVL-positive MRSA, mainly abscesses and occasionally deep-seated infections, such as necrotising pneumonia, fasciitis, or bone and joint infections (7, 12, 16).

We characterised a *tst*-positive MRSA clone present in nasal and vaginal carriage that was responsible for both suppurative and toxinic infections of either hospital or community origin. No differences were observed between strains from suppurative infections and those from toxinic diseases. Based on the *in vitro* evidence, we cannot conclude that TSST-1 plays a determining role (either directly or indirectly) in the pathogenesis of this clone; however, *in vivo* evidence is needed. Presently, we can hypothesise that the unique SCC*mec* cassette of this clone may carry the specificity of this clone with respect to pathogenesis and epidemicity. Supporting this hypothesis is the growing evidence of genetic links between resistance and virulence, with the observation that deletion of *pls* affects cellular invasiveness (18, 35) and that the SCC*mec* cassette may carry genes such as the *fudoh* gene (19), which affects virulence and transmission.

Acknowledgments

We thank the bacteriologists who sent us ST5/TSST-1 MRSA strains; C. Courtier, C. Gardon, C. Bouveyron, C. Spinelli, C. Badiou, F. Couzon-Vincent, A. Martra and M. Rougier for technical help.

References

1. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 70:6887-6891.

2. Badiou, C., O. Dumitrescu, M. Croze, Y. Gillet, B. Dohin, D. H. Slayman, B. Allaouchiche, J. Etienne, F. Vandenesch, and G. Lina. 2008. Panton-Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. Clin Microbiol Infect 14:1180-1183.

3. Bayles, K. W., and J. J. Iandolo. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J Bacteriol 171:4799-4806.

4. Dauwalder, O., G. Lina, G. Durand, M. Bes, H. Meugnier, V. Jarlier, B. Coignard, F. Vandenesch, J. Etienne, and F. Laurent. 2008. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. J Clin Microbiol 46:3454-3458.

5. de Bentzmann, S., A. Tristan, J. Etienne, N. Brousse, F. Vandenesch, and G. Lina. 2004. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. J Infect Dis 190:1506-1515.

6. Descloux, E., T. Perpoint, T. Ferry, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, I. Mohammedi, and J. Etienne. 2008. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27:37-43.

7. Dohin, B., Y. Gillet, R. Kohler, G. Lina, F. Vandenesch, P. Vanhems, D. Floret, and J. Etienne. 2007. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus.* Pediatr Infect Dis J 26:1042-1048.

8. Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, and J. Etienne. 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome

toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol 44:847-853.

9. Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 38:1008-1015.

10. Ferry, T., D. Thomas, T. Perpoint, G. Lina, G. Monneret, I. Mohammedi, C. Chidiac, D. Peyramond, F. Vandenesch, and J. Etienne. 2008. Analysis of superantigenic toxin Vbeta T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. Clin Microbiol Infect 14:546-554.

11. Freed, R. C., M. L. Evenson, R. F. Reiser, and M. S. Bergdoll. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl Environ Microbiol 44:1349-1355.

12. Gillet, Y., P. Vanhems, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, D. Floret, and J. Etienne. 2007. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis 45:315-321.

13. Hamilton, S. M., A. E. Bryant, K. C. Carroll, V. Lockary, Y. Ma, E. McIndoo, L. G. Miller, F. Perdreau-Remington, J. Pullman, G. F. Risi, D. B. Salmi, and D. L. Stevens. 2007. In vitro production of Panton-Valentine leukocidin among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing diverse infections. Clin Infect Dis 45:1550-1558.

14. Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothganger, D. Turnwald, and U. Vogel. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol 41:5442-5448.

15. Holtfreter, S., D. Grumann, M. Schmudde, H. T. Nguyen, P. Eichler, B. Strommenger, K. Kopron, J. Kolata, S. Giedrys-Kalemba, I. Steinmetz, W. Witte, and B. M. Broker. 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 45:2669-2680.

16. Issartel, B., A. Tristan, S. Lechevallier, F. Bruyere, G. Lina, B. Garin, F. Lacassin, M. Bes, F. Vandenesch, and J. Etienne. 2005. Frequent carriage of Panton-Valentine leucocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. J Clin Microbiol 43:3203-3207.

17. Jarraud, S., C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 70:631-641.

18. Juuti, K. M., B. Sinha, C. Werbick, G. Peters, and P. I. Kuusela. 2004. Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing the surface protein Pls. J Infect Dis 189:1574-1584.

19. Kaito, C., Y. Omae, Y. Matsumoto, M. Nagata, H. Yamaguchi, T. Aoto, T. Ito, K. Hiramatsu, and K. Sekimizu. 2008. A novel gene, *fudoh*, in the SCC*mec* region suppresses the colony spreading ability and virulence of *Staphylococcus aureus.* PLoS One 3:e3921.

20. Kondo, Y., T. Ito, X. X. Ma, S. Watanabe, B. N. Kreiswirth, J. Etienne, and K. Hiramatsu. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 51:264-274.

21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

22. Lina, G., Y. Gillet, F. Vandenesch, M. E. Jones, D. Floret, and J. Etienne. 1997. Toxin involvement in staphylococcal scalded skin syndrome. Clin Infect Dis 25:1369-1373.

23. Mellmann, A., A. W. Friedrich, N. Rosenkotter, J. Rothganger, H. Karch, R. Reintjes, and D. Harmsen. 2006. Automated DNA Sequence-Based Early Warning System for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks. PLoS Med 3:e33.

24. Mellmann, A., T. Weniger, C. Berssenbrugge, U. Keckevoet, A. W. Friedrich, D. Harmsen, and H. Grundmann. 2008. Characterization of clonal relatedness among

the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using *spa* sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. J Clin Microbiol 46:2805-2808.

25. Mellmann, A., T. Weniger, C. Berssenbrugge, J. Rothganger, M. Sammeth, J. Stoye, and D. Harmsen. 2007. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. BMC Microbiol 7:98.

26. Miethke, T., C. Wahl, K. Heeg, and H. Wagner. 1993. Acquired resistance to superantigen-induced T cell shock. V beta selective T cell unresponsiveness unfolds directly from a transient state of hyperreactivity. J Immunol 150:3776-3784.

27. Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka, and S. Watanabe. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29:2240-2244.

28. Musser, J. M., P. M. Schlievert, A. W. Chow, P. Ewan, B. N. Kreiswirth, V. T. Rosdahl, A. S. Naidu, W. Witte, and R. K. Selander. 1990. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 87:225-229.

29. Novick, R. P. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 49:93-105.

30. O'Brien, L. M., E. J. Walsh, R. C. Massey, S. J. Peacock, and T. J. Foster. 2002. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol 4:759-770.

31. Oliveira, D. C., and H. de Lencastre. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 46:2155-2161.

32. Oliveira, D. C., C. Milheirico, S. Vinga, and H. de Lencastre. 2006. Assessment of allelic variation in the *ccr*AB locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. J Antimicrob Chemother 58:23-30.

33. Salgado, C. D., B. M. Farr, and D. P. Calfee. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis 36:131-139.

34. Sammeth, M., and J. Stoye. 2006. Comparing tandem repeats with duplications and excisions of variable degree. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform 3:395-407.

35. Savolainen, K., L. Paulin, B. Westerlund-Wikstrom, T. J. Foster, T. K. Korhonen, and P. Kuusela. 2001. Expression of pls, a gene closely associated with the *mec*A gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro. Infect Immun 69:3013-3020.

36. Thomas, D., O. Dauwalder, V. Brun, C. Badiou, T. Ferry, J. Etienne, F. Vandenesch, and G. Lina. 2009. *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human V{beta} patterns. Infect Immun.

37. Vojtov, N., H. F. Ross, and R. P. Novick. 2002. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10102-10107.

38. Werbick, C., K. Becker, A. Mellmann, K. M. Juuti, C. von Eiff, G. Peters, P. I. Kuusela, A. W. Friedrich, and B. Sinha. 2007. Staphylococcal chromosomal cassette *mec* type I, *spa* type, and expression of Pls are determinants of reduced cellular invasiveness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J Infect Dis 195:1678-1685.

Table 1. Syndromes and infections associated with the Geraldine clone.

	N(%)	hospital-acquired	community-acquired	ND **	sex ratio	median age
TSS & related syndrome	**29 (33)**	**10 (34)**	**8 (28)**	**11(38)**	**1.2**	**25.6 (0-87)**
- confirmed TSS	10	4	4	2		
- probable TSS	16	4	4	8		
- others *	3	2	0	1		
Suppurative and deep-seated infections	**59 (67)**	**10 (17)**	**33 (56)**	**16 (27)**	**1.0**	**26.4 (0-90)**
- skin & soft tissue infection	43	5	26	12		
- lung infection	6	3	1	2		
- peritonitis	1	0	1	0		
- urinary tract infection	2	0	2	0		
- bone & joint infection	7	2	2	3		
Total of infections	**88**	**20 (23)**	**41 (47)**	**27 (30)**	**1.1**	**26**

* scarlet fever, neonatal toxic shock like exanthematous disease

** not determined

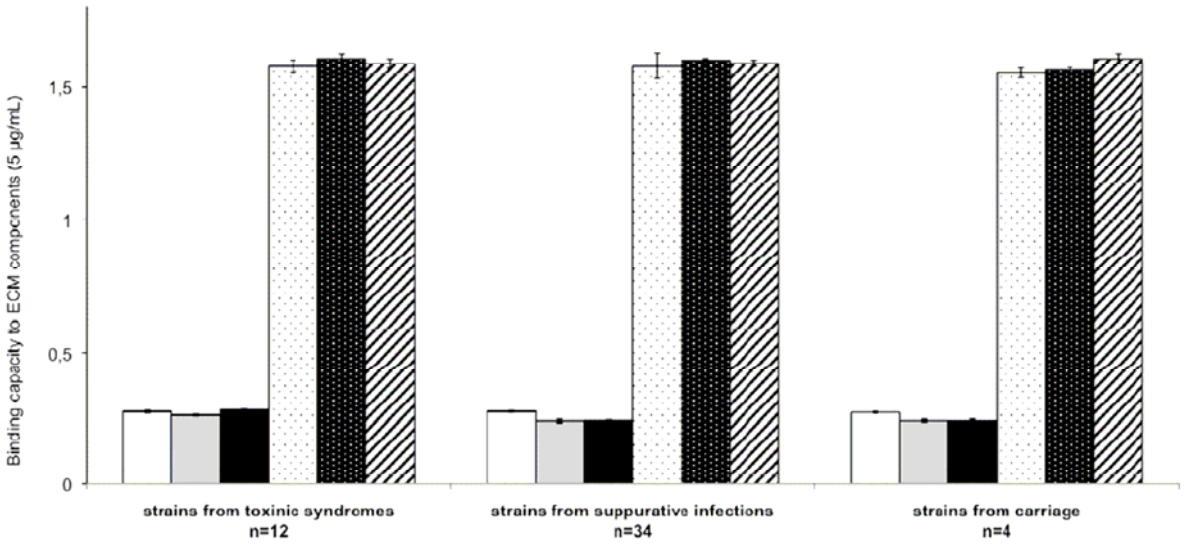


Figure 1. Binding capacity of various Geraldine clone strains to ECM components

Various strains (toxinic, suppurative infections, carriage) examined for their binding capacity (Y-axis, absorbance reading at 540 nm) to ECM proteins (Sigma) coated on 96-well plates, at concentrations of 5 µg/mL (identical results were obtained at concentrations of 50 µg/mL). Collagen I (white bars); collagen IV (grey bars); Matrigel® (dark bars); laminin (black dotted bars), cellular fibronectin (white dotted bars) and plasmatic fibronectin (scratched bars). The vertical lines indicate the standard deviation.

.

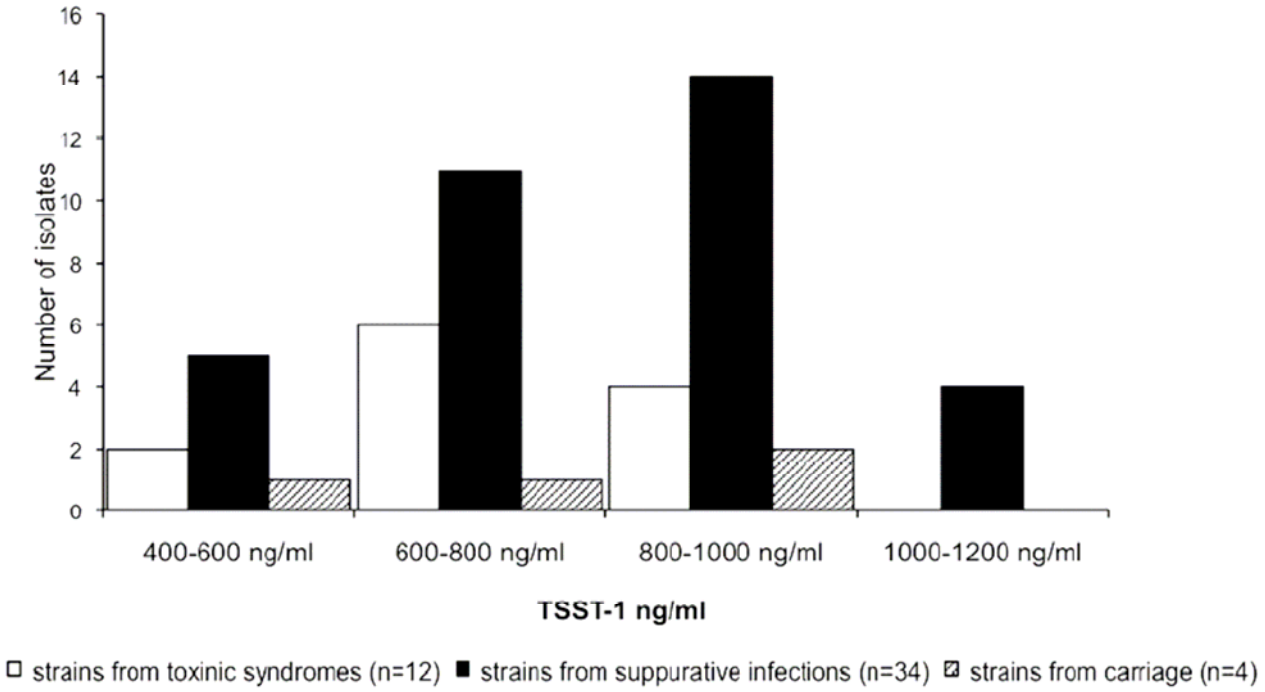


Figure 2. *In vitro* TSST-1 production measured by ELISA of Geraldine clone strains according to the type of infections.

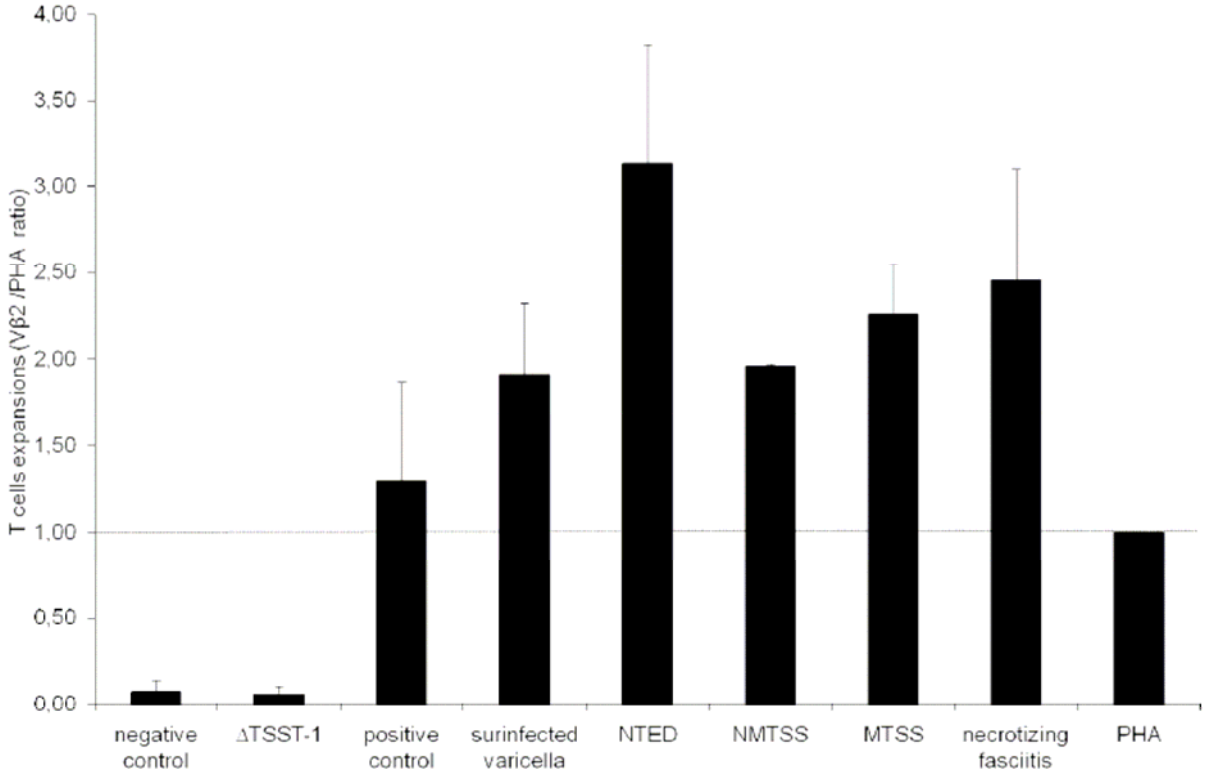


Figure 3. Activation of Vß2 repertoire by supernatants of broth culture of various Geraldine clone strains.

negative control: FRI strain *seb*+, *tst*–

ΔTSST-1: isogenic strain deleted in the *tst* gene

positive control: *agr*3, *mec*A-, *tst*+ strain

PHA (10µg/mL): phytohemagglutinin

MTSS: menstrual toxic shock syndrome

NMTSS: non menstrual toxic shock syndrome

NTED: neonatal toxic shock-like exanthematous disease

Results are expressed as ratio of the percentage of TCR Vß2 expression induced by each strain relative to that of PHA. The dotted line represented T cell activation obtained after PHA (10µg/mL) stimulation.

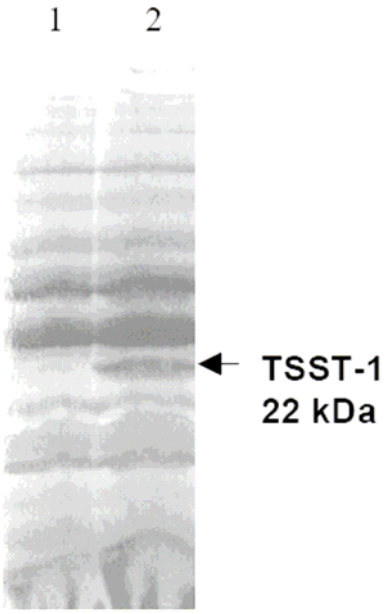


Figure 4. Exoprotein patterns of *tst* positive HT20030749 strain (Lane 2) and its isogenic derivative strain deleted in *tst* LUG1200 (Lane 1).
The arrow corresponds to the presence of TSST-1.

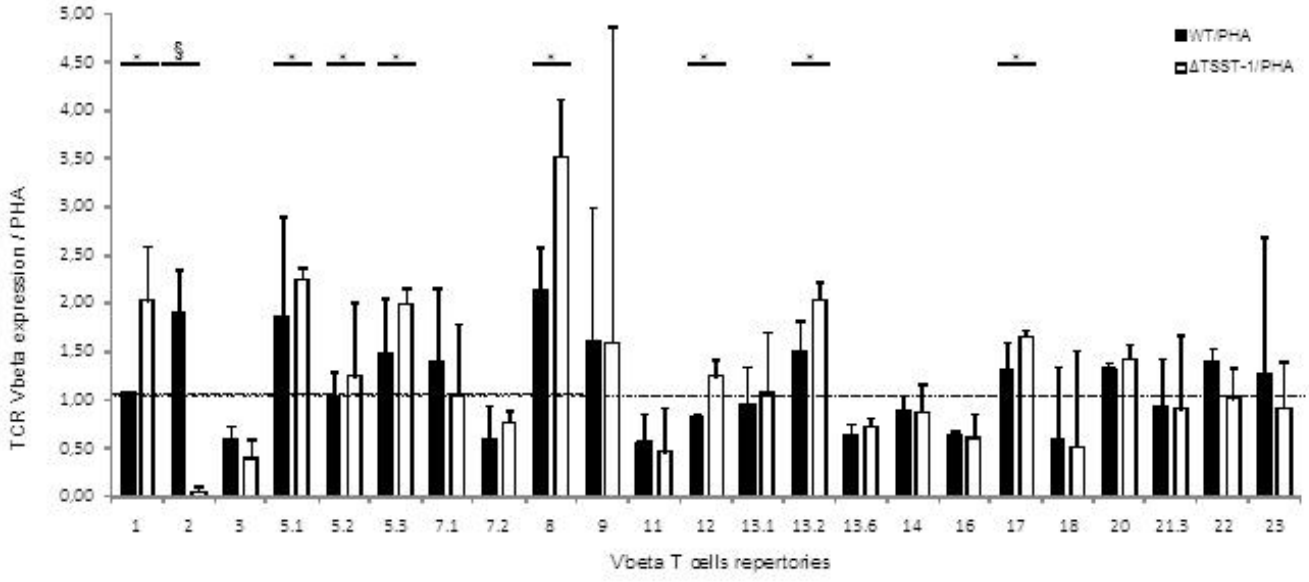


Figure 5. Activation of Vß repertoires by supernatants of broth culture of the isogenic couple for *tst*.

WT: parental strain (grey bars)

ΔTSST-1: isogenic strain deleted in the *tst* gene (black bars)

PHA (10µg/mL): phytohemagglutinin

* (ΔTSST-1-WT)/WT over 20%

§ massive reduction of Vβ 2 Tcells expansion over 90%

Results are expressed as ratio of the percentage of each TCR Vß expression induced by each strain relative to that of PHA. The line represents T cell activation obtained after PHA (10µg/mL) stimulation.

4ème PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre travail de thèse s'est inscrit dans la surveillance épidémiologique des SARM en France. Dans un premier temps, nous avons participé à l'élaboration de nouveaux outils de description des SARM tels le typage moléculaire du polysaccharide capsulaire et le typage de la cassette SCC*mec* par séquençage multilocus des gènes de recombinases. Dans un deuxième temps, à partir de la collection de souches de *S. aureus* reçues au CNR des staphylocoques entre 2002 et 2003, nous avons décrit l'émergence d'un nouveau clone de SARM possédant le gène *tst* codant la TSST-1. Jusque là, en France, toutes les souches de *S. aureus tst*$^+$ étaient sensibles à la méticilline et appartenaient majoritairement au clone *agr*3 ST30, mondialement impliqué dans des cas de chocs toxiques staphylococciques menstruels [209, 210].

Nous avons caractérisé le nouveau clone SARM, désigné sous le nom de clone Géraldine, par différents outils phénotypiques et moléculaires. Le clone Géraldine *tst*$^+$ possède de nombreux facteurs de virulence, notamment les gènes des entérotoxines *sec*, *sed* et *egc* et de nombreux gènes d'adhésines. Le typage capsulaire a rendu compte d'un type 5 que Watts et al ont identifié comme étant le plus virulent [24]. L'analyse du fond génétique a révélé que le clone Géraldine appartenait à la même lignée phylogénique *agr*2 ST5 que les clones pandémiques de SARM nosocomiaux, New York/Japon et Pédiatrique. L'origine du clone Géraldine reste à éclaircir. Par ailleurs, le fond génétique ST5 semble particulièrement propice à l'émergence *de novo* des SARM. Les études phylogéniques de Nübel et al sur le fond génétique ST5 ont montré que le phénomène d'acquisition de la cassette SCC*mec* était survenu 23 fois dans ce fond génétique [211].

Une des particularités du clone Géraldine réside dans son phénotype atypique de résistance aux antibiotiques : oscillant entre celui des SARM nosocomiaux par la résistance aux aminosides (kanamycine et tobramycine) et celui du clone de SARM communautaires ST80, PVL$^+$ par la résistance à l'acide fusidique. La prévalence de la résistance à l'acide fusidique chez les souches de SARM-C s'expliquerait par la pression antibiotique due à l'utilisation de l'acide fusidique en topique pour le traitement des infections cutanées staphylococciques. L'acide fusidique agit par inhibition de la synthèse protéique bactérienne en empêchant la dissociation du

facteur d'élongation du ribosome. A ce jour deux mécanismes de résistance à l'acide fusidique ont été identifiés chez *S. aureus* : (i) mutations sur le gène *fus*A codant le facteur d'élongation, conférant une résistance à haut niveau, (ii) acquisition de plasmides (PUB101 ou PUB102) portant un gène de résistance (*fus*B ou *far*-1) dont le mécanisme d'action est méconnu, conférant une résistance de bas niveau [200, 212]. La résistance plasmidique à l'acide fusidique concerne les souches épidémiques telles que les souches du clone épidémique responsable d'impétigo bulleux européen (*Epidemic European Fusidic acide resistant Clone*) et celles du clone de SARM-C ST80 PVL^+ [213, 214]. La caractérisation récente du clone Géraldine par puces à ADN a montré la présence d'un gène identique à celui conférant la résistance à l'acide fusidique chez la souche de SASM MSSA476 et chez une souche de SARM (CHE482) de fond génétique ST45 diffusant en Suisse chez des toxicomanes par voie intraveineuse (données internes au CNR des staphylocoques)[67, 215]. Le gène décrit dans les souches MSSA476 et CHE482, est convoyé par une cassette SCC-non *mec* venant s'associer en tandem avec la cassette SCC*mec*. Ainsi la résistance à l'acide fusidique chez le clone Géraldine ne semble pas liée à la diffusion d'un plasmide mais à l'acquisition d'un élément SCC. Toutefois, seul le séquençage de la cassette SCC*mec* permettra de confirmer cette hypothèse.

Les études épidémiologiques ont montré que le clone Géraldine diffusait partout en France. Il a été également détecté en Suisse et au Maroc. Le clone Géraldine est responsable d'infections à la fois hospitalières et communautaires survenant principalement chez les sujets jeunes avec un âge médian de 3 ans (publication p119) et de 26 ans (article en soumission p 155). L'étude portant sur les clones de SARM diffusant en France métropolitaine et responsables d'infections invasives a montré que 6.7% des isolats appartenaient au clone Géraldine. Quant à l'étude sur les surinfections de varicelle, les résultats soulignent la prévalence du clone Géraldine dans les infections pédiatriques communautaires. Par ailleurs, les données de l'ONERBA sur la surveillance des SARM en France en 2008 rendent compte de la prédominance du clone Géraldine parmi les SARM communautaires (Jérôme Robert, données de l'ONERBA).

Lemaire et al ont récemment décrit un cas de transmission intrafamiliale du clone Géraldine [216]. Nous avons observé un cas similaire en 2004 à Rennes où l'enquête diligentée par la DDASS avait révélé un portage nasal de cette souche chez 7 membres d'une même famille (données internes au CNR des staphylocoques). Ces données posent la question de la prévalence du portage nasal du clone Géraldine. Une étude prospective sur le portage nasal des SARM contribuerait à répondre à la question.

Nos données sur la pathogénie du clone Géraldine rendent compte d'infections très diverses, à la fois toxiniques et suppuratives. Dans sa manifestation toxinique, le clone Géraldine est notamment responsable de chocs toxiques staphylococciques majoritairement non menstruels et de NTED. Les cas de NTED impliquant le clone Géraldine ont été rapportés uniquement en France [217]. En effet, les cas de NTED décrits au Japon mettent exclusivement en cause le clone nosocomial NewYork/Japon. Quant au manifestations suppuratives du clone Géraldine, elles comportent surtout des infections cutanées et des tissus mous, majoritairement d'acquisition communautaire. Enfin, nos données sur les surinfections de varicelle ont confirmé la versatilité de l'expression clinique du clone Géraldine. La diversité des manifestations cliniques du clone Géraldine, nous a conduit à regarder s'il existait un lien entre la production de TSST-1 et le type d'infection. Sur des isolats du clone Géraldine impliqués dans des affections toxiniques et suppuratives, la quantification de la production de TSST-1 par ELISA et la mesure de l'activation du répertoire Vβ2 n'ont pas démontré de relation entre l'expression clinique et la production de la TSST-1. Cependant ces résultats obtenus *in vitro* ne préjugent pas de la production et de l'expression de la TSST-1 *in vivo*. En effet la production de TSST-1 est régulée d'une part, par de nombreux facteurs environnementaux comme le PH, le CO2, la température et le glucose, et d'autre part, par des sytèmes régulateurs comme le système Agr, SarA ou CcpA (*carbone catabolite protéine A*) agissant *via* la concentration de glucose [218, 219]. Par ailleurs, l'équipe de Nagao et al ont quantifié la production de TSST-1 par Western-Blot chez 152 isolats de SARM. De la même façon, ils ont montré que la production de TSST-1 était très variée parmi les isolats cliniques et qu'elle n'était pas corrélée au type d'infection, ni même à la structure du système A*gr* [220]. Ces faits rappellent que de nombreux facteurs liés à

l'hôte interviennent aussi dans l'expression de la TSST-1, tels des facteurs génétiques ou des facteurs liés à l'immunité anti-TSST-1[221, 222].

Afin d'étudier le rôle exact de la TSST-1 dans la pathologie du clone Géraldine nous nous sommes inspirés des travaux de Vojtov et al montrant que la TSST-1: (i) réprimait *in vitro* la production des autres exoprotéines comme la SEB ou la V8 sérine protéase, (ii) régulait sa propre production par un mécanisme de régulation transcriptionnelle et, (iii) dans un modèle de souris, supprimmait la réaction inflammatoire au niveau du tissu infecté en inhibant la production des protéases et des lipases qui induisent la réponse immunitaire innée de l'hôte [207]. De la même façon nous avons recherché si, dans le clone Géraldine, la TSST-1 pouvait jouer un rôle régulateur dans l'expression des autres exoprotéines. Dans ce but nous avons construit un couple isogénique *tst*+/Δ*tst* par délétion du gène *tst* dans un isolat du clone Géraldine. Nous avons testé ce couple isogénique dans différentes conditions afin de mettre en évidence une différence dans l'expression des exoprotéines. Nos résultats sont restés négatifs sauf pour l'analyse des répertoires Vβ qui a montré quelques différences. Alors qu'elle était absente du profil Vβ de la souche sauvage *tst*$^{+}$, une partielle expansion des répertoires de SEC et SED/SEI a été observée chez la souche délétée Δ*tst*. Cette partielle expansion s'expliquerait plus par la suppression de l'anergie induite par la TSST-1 sur les lymphocytes T non Vβ2 que par un véritable rôle régulateur de la TSST-1 sur les entérotoxines C et D. Nos résultats ne nous permettent pas d'établir le rôle de la TSST-1 dans la régulation des autres exoprotéines. De la même façon, les travaux de Russell et al chez *Streptococcus pyogenes* ont montré que les superantigènes SPEA et SMEZ n'affectaient pas non plus l'expression du secrétome de *S. pyogenes* [223].

Concernant le rôle de la TSST-1 dans la pathogénie du clone Géraldine, de nombreuses pistes restent donc à explorer. Dans un modèle *ex vivo* de muqueuse porcine vaginale, Brosnahan et al ont montré que la TSST-1 pouvait se lier spécifiquement à des récepteurs situés au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse vaginale [81]. L'intéraction de la TSST-1 à son récepteur induirait un relargage de chemokines et de cytokines proinflammatoires par la cellule épithéliale à l'origine d'une inflammation locale. Par extrapolation, nous pouvons imaginer que la TSST-1 possède des récepteurs spécifiques sur les cellules épithéliales cutanées.

La réaction inflammatoire locale induite par la TSST-1 contribuerait à l'expression clinique du clone Géraldine, principalement des infections cutanées et des tissus mous. En se calquant sur les travaux de Brosnahan et al, nous pourrions étudier l'intéraction de la TSST-1 avec les cellules épithéliales cutanées. Une autre piste à explorer est celle du rôle que pourrait jouer la TSST-1 dans l'épidémicité de la souche ainsi que sa persistance chez l'homme. Les travaux de Ferens et al sur les mammites bovines ont montré que les superantigènes joueraient un rôle dans la persistance de *S. aureus* au niveau des muqueuses [224]. Au site de colonisation, la production locale de superantigènes serait insuffisante pour promouvoir une immunosuppression systémique mais suffirait à induire une immunosuppression locale favorable à la survie de la bactérie. Ce phénomène doublé d'un phénomène d'internalisation de la bactérie par les cellules épithéliales permettrait à la bactérie munie de superantigène de persister chez son hôte.

Nous avons évoqué la particularité de l'antibiotype du clone Géraldine. Une autre particularité du clone Géraldine est illustrée par sa cassette SCC*mec* de résistance à la méticilline atypique de type I tronquée. Les résultats du typage de la cassette SCC*mec* par la PCR multiplex d'Oliveira et al ont rendu compte d'un type SCC*mec* IV. D'autres méthodes de typage SCC*mec* comme la PCR multiplex de Kondo et al et le séquençage *ccr*b ont révélé qu'en fait cette cassette possédait des gènes de recombinases *ccr*A-B de type 1 et s'apparentait donc à un SCC*mec* de type I. La PCR multiplex d'Oliveira et al étant basée sur un profil de bandes, l'absence de la bande correspondant au locus du gène *pls* a orienté la classification de la cassette du clone Géraldine vers un type IV (Annexe 4). Oliveira et al ont d'ailleurs décrit un cas similaire chez des souches polonaises (PL72 et POL3) qu'ils avaient d'abord identifiées SCC*mec* IV [164] et qu'ils ont finalement classées en type I variant [166]. De la même façon, lors de nos travaux de séquençage multilocus de la cassette SCC*mec*, l'analyse de deux isolats du clone Géraldine avait rendu compte de ce type de discordance. Les deux isolats étaient préalablement identifiés SCC*mec* IV par la PCR multiplex d'Oliveira et al. En revanche, le séquençage multilocus de la cassette SCC*mec* a révélé que ces deux isolats possédaient le profil allélique de gènes de recombinases ST-SCC*mec*1 commun aux souches SCC*mec* de type I. Ces résultats discordants mettent en évidence la fragilité du typage SCC*mec* et la nécessité de

vérifier les résultats par plusieurs techniques, notamment par une technique basée sur le séquençage.

La délétion du gène *pls* pourrait procurer au clone Géraldine un avantage sélectif. Le gène *pls* situé sur la cassette SCC*mec* de type I code une protéine de surface à motif LPXTG. Sa présence dans la cassette SCC*mec* de type IV a aussi été décrite [225]. Certains auteurs ont montré que la protéine Pls diminuerait l'adhésion des souches de SARM aux protéines de l'hôte comme la fibronectine, le fibrinogène, les IgG ou encore la laminine et serait impliquée dans une réduction de l'invasion cellulaire [226, 227]. Pls est une grosse protéine qui par encombrement stérique empêcherait l'adhésion des autres protéines de surface à leur ligand [228]. La délétion du gène *pls* dans la cassette SCC*mec* du clone Géraldine serait à l'origine d'un pouvoir exacerbé d'adhésion et d'invasion cellulaire [227].

D'autres facteurs de virulence liés à la cassette SCC*mec* pourraient être impliqués dans la pathogénie de ce clone. La description récente de peptides, les PSM-mec (*peptide phenol soluble moduline*) localisés sur la cassette SCC*mec*, notamment la cassette SCC*mec* IV de la souche américaine SARM-C de type USA300 et dotés d'une activité proinflammatoire et cytolytique suggère que la cassette du clone Géraldine pourrait elle aussi comporter des facteurs de virulence [229, 230]. Par ailleurs, Kaito et al ont identifié le gène *fudoh* dans la cassette SCC*mec* conférant à la souche une capacité de croissance amoindrie et une diminution de la production d'exotoxines [231]. Le gène *fudoh* est absent des cassettes SCC*mec* de type I et notamment des types IV et V, ce qui pourrait expliquer la virulence des souches de SARM-C par l'exacerbation de la production d'exotoxines et de la capacité de croissance de la bactérie.

La nature exacte de l'avantage sélectif conféré par la cassette SCC*mec* du clone Géraldine reste à élucider. La détermination de l'infrastructure génétique de la cassette SCC*mec* par séquençage permettra de répondre à beaucoup de nos interrogations.

.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. de Lencastre, H., D. Oliveira, and A. Tomasz, *Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive power.* Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(5): p. 428-35.
2. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.* J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(1): p. 135-6.
3. Dufour, P., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin.* Clin Infect Dis, 2002. **35**(7): p. 819-24.
4. Lyell, A., *Alexander Ogston, micrococci, and Joseph Lister.* J Am Acad Dermatol, 1989. **20**(2 Pt 1): p. 302-10.
5. Shittu, A., J. Lin, and D. Morrison, *Molecular identification and characterization of mannitol-negative methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. **57**(1): p. 93-5.
6. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections.* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
7. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks.* Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
8. von Eiff, C., et al., *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group.* N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 11-6.
9. Wertheim, H.F. and M.C. Vos, *Can mupirocin prevent methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections?* Crit Care, 2005. **9**(3): p. 257-8.
10. Afghani, B., V. Kong, and F.L. Wu, *Use of nasal mupirocin for eradicating meticillin-resistant Staphylococcus aureus: a dilemma?* J Hosp Infect, 2006. **64**(3): p. 299-300.
11. Cookson, B.D., *The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice.* J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(1): p. 11-8.
12. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections.* N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
13. Fellowes, C., et al., *MRSA on tourniquets and keyboards.* J Hosp Infect, 2006. **64**(1): p. 86-8.
14. Tenover, F.C. and R.V. Goering, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300: origin and epidemiology.* J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(3): p. 441-6.
15. Hiramatsu, K., et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Trends Microbiol, 2001. **9**(10): p. 486-93.

16. Baba, T., et al., *Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.* Lancet, 2002. **359**(9320): p. 1819-27.
17. Ito, T., et al., *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC.* Drug Resist Updat, 2003. **6**(1): p. 41-52.
18. Lindsay, J.A. and M.T. Holden, *Staphylococcus aureus: superbug, super genome?* Trends Microbiol, 2004. **12**(8): p. 378-85.
19. Novick, R.P., *Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of Staphylococcus aureus.* Plasmid, 2003. **49**(2): p. 93-105.
20. Chen, J. and R.P. Novick, *Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes.* Science, 2009. **323**(5910): p. 139-41.
21. Hiramatsu, K., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance.* Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): p. 147-55.
22. Kessler, C.M., E. Nussbaum, and C.U. Tuazon, *Disseminated intravascular coagulation associated with Staphylococcus aureus septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation.* J Infect Dis, 1991. **164**(1): p. 101-7.
23. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus.* Trends Microbiol, 1998. **6**(12): p. 484-8.
24. Watts, A., et al., *Staphylococcus aureus strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence.* Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3502-11.
25. O'Riordan, K. and J.C. Lee, *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides.* Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 218-34.
26. Luong, T.T., et al., *Type 1 capsule genes of Staphylococcus aureus are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element.* J Bacteriol, 2002. **184**(13): p. 3623-9.
27. Pohlmann-Dietze, P., et al., *Adherence of Staphylococcus aureus to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase.* Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4865-71.
28. Tzianabos, A.O., J.Y. Wang, and J.C. Lee, *Structural rationale for the modulation of abscess formation by Staphylococcus aureus capsular polysaccharides.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9365-70.
29. Chavakis, T., et al., *Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems.* Thromb Haemost, 2005. **94**(2): p. 278-85.

30. Clarke, S.R. and S.J. Foster, *Surface adhesins of Staphylococcus aureus.* Adv Microb Physiol, 2006. **51**: p. 187-224.
31. Tristan, A., et al., *Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4465-7.
32. Campoccia, D., et al., *The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections.* Biomaterials, 2009 *in press*.
33. Hussain, M., et al., *Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins.* J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
34. Foster, T.J., *Immune evasion by staphylococci.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(12): p. 948-58.
35. Jongerius, I., et al., *Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules.* J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2461-71.
36. Gomez, M.I., et al., *Staphylococcus aureus protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains.* J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20190-6.
37. Merino, N., et al., *Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2009. **191**(3): p. 832-43.
38. Goodyear, C.S. and G.J. Silverman, *Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin.* J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1125-39.
39. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 16-34, table of contents.
40. Cheung, A.L., S.J. Projan, and H. Gresham, *The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in Staphylococcus aureus.* Curr Infect Dis Rep, 2002. **4**(5): p. 400-410.
41. Bhakdi, S. and J. Tranum-Jensen, *Alpha-toxin of Staphylococcus aureus.* Microbiol Rev, 1991. **55**(4): p. 733-51.
42. van Wamel, W.J., et al., *The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages.* J Bacteriol, 2006. **188**(4): p. 1310-5.
43. Jayasinghe, L. and H. Bayley, *The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis.* Protein Sci, 2005. **14**(10): p. 2550-61.

44. Miles, G., L. Jayasinghe, and H. Bayley, *Assembly of the Bi-component leukocidin pore examined by truncation mutagenesis.* J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2205-14.
45. Labandeira-Rey, M., et al., *Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia.* Science, 2007. **315**(5815): p. 1130-3.
46. Diep, B.A., et al., *Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet, 2006. **367**(9512): p. 731-9.
47. Tristan, A., et al., *The signal peptide of Staphylococcus aureus panton valentine leukocidin LukS component mediates increased adhesion to heparan sulfates.* PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5042.
48. Ladhani, S., et al., *Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome.* Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 224-42.
49. Daugherty, S. and M.G. Low, *Cloning, expression, and mutagenesis of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Staphylococcus aureus: a potential staphylococcal virulence factor.* Infect Immun, 1993. **61**(12): p. 5078-89.
50. Banbula, A., et al., *Amino-acid sequence and three-dimensional structure of the Staphylococcus aureus metalloproteinase at 1.72 A resolution.* Structure, 1998. **6**(9): p. 1185-93.
51. Makris, G., et al., *The hyaluronate lyase of Staphylococcus aureus - a virulence factor?* Microbiology, 2004. **150**(Pt 6): p. 2005-13.
52. Shaw, L., et al., *The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus.* Microbiology, 2004. **150**(Pt 1): p. 217-28.
53. Kawabata, S., et al., *Isolation and characterization of staphylocoagulase chymotryptic fragment. Localization of the procoagulant- and prothrombin-binding domain of this protein.* J Biol Chem, 1986. **261**(3): p. 1427-33.
54. Nizet, V., *Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 13-22.
55. de Haas, C.J., et al., *Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus, a bacterial antiinflammatory agent.* J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 687-95.
56. Ricklin, D., et al., *A molecular insight into complement evasion by the staphylococcal complement inhibitor protein family.* J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2565-74.
57. Rooijakkers, S.H., et al., *Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor.* Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 721-7.

58. Fedtke, I., F. Gotz, and A. Peschel, *Bacterial evasion of innate host defenses--the Staphylococcus aureus lesson.* Int J Med Microbiol, 2004. **294**(2-3): p. 189-94.
59. Rooijakkers, S.H., K.P. van Kessel, and J.A. van Strijp, *Staphylococcal innate immune evasion.* Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 596-601.
60. Lina, G., et al., *Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus.* J Infect Dis, 2004. **189**(12): p. 2334-6.
61. Thomas, D.Y., et al., *Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster.* Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4724-34.
62. Ono, H.K., et al., *Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T.* Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 4999-5005.
63. Thomas, D., et al., *Diversity in Staphylococcus aureus enterotoxins.* Chem Immunol Allergy, 2007. **93**: p. 24-41.
64. Holtfreter, S. and B.M. Broker, *Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis?* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(1): p. 13-27.
65. Jarraud, S., et al., *egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus.* J Immunol, 2001. **166**(1): p. 669-77.
66. van Belkum, A., et al., *Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, egc, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(4): p. 1555-7.
67. Holden, M.T., et al., *Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9786-91.
68. Petersson, K., et al., *Staphylococcal enterotoxin H induces V alpha-specific expansion of T cells.* J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4148-54.
69. Llewelyn, M. and J. Cohen, *Superantigens: microbial agents that corrupt immunity.* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(3): p. 156-62.
70. Thomas, D., et al., *Staphylococcus aureus superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns.* Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 2043-50.
71. Choi, Y., et al., *Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome.* J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 981-4.
72. Matsuda, Y., et al., *Diagnosis of toxic shock syndrome by two different systems; clinical criteria and monitoring of TSST-1-reactive T cells.* Microbiol Immunol, 2008. **52**(11): p. 513-21.

73. 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.
74. Llewelyn, M., et al., *The TCR Vbeta signature of bacterial superantigens spreads with stimulus strength.* Int Immunol, 2006. **18**(10): p. 1433-41.
75. Lina, G., et al., *Detection of staphylococcal superantigenic toxins by a CD69-specific cytofluorimetric assay measuring T-cell activation.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 1042-5.
76. Kim, K.H., et al., *Role of staphylococcal superantigen in atopic dermatitis: influence on keratinocytes.* J Korean Med Sci, 2006. **21**(2): p. 315-23.
77. Shiobara, N., et al., *Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis.* Clin Exp Immunol, 2007. **150**(1): p. 13-21.
78. Abdelnour, A., T. Bremell, and A. Tarkowski, *Toxic shock syndrome toxin 1 contributes to the arthritogenicity of Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 1994. **170**(1): p. 94-9.
79. el-Fiky, L.M., et al., *Staphylococcal infection and toxin production in chronic rhinosinusitis.* Am J Rhinol Allergy, 2009. **23**(3): p. 264-7.
80. Davis, C.C., et al., *Penetration of toxic shock syndrome toxin-1 across porcine vaginal mucosa ex vivo: permeability characteristics, toxin distribution, and tissue damage.* Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**(6): p. 1785-91.
81. Brosnahan, A.J., et al., *Novel toxic shock syndrome toxin-1 amino acids required for biological activity.* Biochemistry, 2008. **47**(49): p. 12995-3003.
82. Peterson, M.L., et al., *The innate immune system is activated by stimulation of vaginal epithelial cells with Staphylococcus aureus and toxic shock syndrome toxin 1.* Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2164-74.
83. Brosnahan, A.J., et al., *Cytolysins augment superantigen penetration of stratified mucosa.* J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2364-73.
84. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 5**: p. S350-9.
85. Bronner, S., H. Monteil, and G. Prevost, *Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications.* FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(2): p. 183-200.
86. Dufour, P., et al.,, *Polymorphisme du système de régulation des exoprotéines chez Staphylococcus aureus.* Med Mal Inf, 2000. **30**: p. 739-744.

87. Jarraud, S., et al., *Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2000. **182**(22): p. 6517-22.
88. Brun, Y., Bes M., *Staphylococcus*, in *Précis de Bactériologie clinique*. 2000, ESKA: Paris. p. 783-834.
89. Rutar, T., et al., *Ophthalmic manifestations of infections caused by the USA300 clone of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Ophthalmology, 2006. **113**(8): p. 1455-62.
90. Pannaraj, P.S., et al., *Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* Clin Infect Dis, 2006. **43**(8): p. 953-60.
91. Moran, G.J., et al., *Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department.* N Engl J Med, 2006. **355**(7): p. 666-74.
92. Lee, Y.T., et al., *Necrotizing fasciitis in a medical center in northern Taiwan: emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the community.* J Microbiol Immunol Infect, 2007. **40**(4): p. 335-41.
93. Pedersen, M., et al., *Haematogenous Staphylococcus aureus meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases.* BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 49.
94. Ferry, T., et al., *Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes.* Curr Infect Dis Rep, 2005. **7**(6): p. 420-8.
95. Hoen, B., *Special issues in the management of infective endocarditis caused by gram-positive cocci.* Infect Dis Clin North Am, 2002. **16**(2): p. 437-52, xi.
96. Yamaguchi, T., et al., *Clonal association of Staphylococcus aureus causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan.* J Infect Dis, 2002. **185**(10): p. 1511-6.
97. Liassine, N., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(2): p. 825-8.
98. Mockenhaupt, M., et al., *Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany.* J Invest Dermatol, 2005. **124**(4): p. 700-3.
99. CDC, *Toxic-shock syndrome, United States, 1970-1982.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982. **31**(16): p. 201-4.
100. Chesney, P.J., et al., *Outpatient diagnosis and management of toxic-shock syndrome.* N Engl J Med, 1981. **304**(23): p. 1426.
101. Stevens, D.L., *The toxic shock syndromes.* Infect Dis Clin North Am, 1996. **10**(4): p. 727-46.

102. McCormick, J.K., J.M. Yarwood, and P.M. Schlievert, *Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update.* Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 77-104.
103. Hajjeh, R.A., et al., *Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979 1996.* Emerg Infect Dis, 1999. **5**(6): p. 807-10.
104. Todd, J., et al., *Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci.* Lancet, 1978. **2**(8100): p. 1116-8.
105. Descloux, E., et al., *One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(1): p. 37-43.
106. Bernardo, K., et al., *Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(2): p. 546-55.
107. Kikuchi, K., et al., *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease in neonatal and perinatal wards.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3001-6.
108. Takahashi, N., et al., *Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period.* Lancet, 1998. **351**(9116): p. 1614-9.
109. Takahashi, N., et al., *Change of specific T cells in an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen.* Microbiol Immunol, 2009. **53**(9): p. 524-30.
110. Takahashi, N., et al., *Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen.* J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1409-15.
111. Kato, H., et al., *The percentage of superantigen-reactive T cells in peripheral blood significantly decreases before massively increasing in patients with neonatal TSS-like exanthematous disease in the early acute phase.* J Infect Chemother, 2002. **8**(1): p. 111-4.
112. Leung, D.Y., et al., *Toxic shock syndrome toxin-secreting Staphylococcus aureus in Kawasaki syndrome.* Lancet, 1993. **342**(8884): p. 1385-8.
113. Tervaert, J.W., E.R. Popa, and N.A. Bos, *The role of superantigens in vasculitis.* Curr Opin Rheumatol, 1999. **11**(1): p. 24-33.
114. Gillet, Y., et al., *Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients.* Lancet, 2002. **359**(9308): p. 753-9.

115. Zetola, N., et al., *Community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging threat.* Lancet Infect Dis, 2005. **5**(5): p. 275-86.
116. Kahl, B.C. and G. Peters, *Microbiology. Mayhem in the lung.* Science, 2007. **315**(5815): p. 1082-3.
117. Oliveira, D.C., A. Tomasz, and H. de Lencastre, *Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(3): p. 180-9.
118. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7687-92.
119. Ito, T. and K. Hiramatsu, *Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Yonsei Med J, 1998. **39**(6): p. 526-33.
120. IWG-SCC, *Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements.* Antimicrob Agents Chemother, 2009 *in press*.
121. Shore, A., et al., *Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Ireland.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(5): p. 2070-83.
122. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu, *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1549-55.
123. Lim, T.T., et al., *Are all community methicillin-resistant Staphylococcus aureus related? A comparison of their mec regions.* Pathology, 2003. **35**(4): p. 336-43.
124. Heusser, R., et al., *Mosaic staphylococcal cassette chromosome mec containing two recombinase loci and a new mec complex, B2.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(1): p. 390-3.
125. Autiero, I., S. Costantini, and G. Colonna, *Modeling of the bacterial mechanism of methicillin-resistance by a systems biology approach.* PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6226.
126. Suzuki, E., et al., *Distribution of mec regulator genes in methicillin-resistant Staphylococcus clinical strains.* Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(6): p. 1219-26.
127. Ito, T., et al., *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1323-36.

128. Ito, T., et al., *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(7): p. 2637-51.
129. Zhang, K., et al., *Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2): p. 531-40.
130. Oliveira, D.C., C. Milheirico, and H. de Lencastre, *Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3457-9.
131. Hanssen, A.M. and J.U. Ericson Sollid, *SCCmec in staphylococci: genes on the move.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(1): p. 8-20.
132. Takano, T., et al., *Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan.* Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(3): p. 837-45.
133. Mongkolrattanothai, K., et al., *Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing pbp4 and tagF genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1823-36.
134. Archer, G.L., et al., *Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from Staphylococcus haemolyticus.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(4): p. 924-9.
135. Katayama, Y., et al., *Identification in methicillin-susceptible Staphylococcus hominis of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2003. **185**(9): p. 2711-22.
136. Wu, S., et al., *Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of mecA from a methicillin susceptible strain of Staphylococcus sciuri.* Microb Drug Resist, 1996. **2**(4): p. 435-41.
137. Hanssen, A.M., G. Kjeldsen, and J.U. Sollid, *Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 285-96.

138. Wisplinghoff, H., et al., *Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant Staphylococcus epidermidis isolates.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(11): p. 3574-9.
139. Wielders, C.L., et al., *In-vivo transfer of mecA DNA to Staphylococcus aureus [corrected].* Lancet, 2001. **357**(9269): p. 1674-5.
140. Baba, T., et al., *Complete genome sequence of Macrococcus caseolyticus strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci.* J Bacteriol, 2009. **191**(4): p. 1180-90.
141. Kreiswirth, B., et al., *Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in Staphylococcus aureus.* Science, 1993. **259**(5092): p. 227-30.
142. Struelens, M., François NR. Renaud, *Marqueurs épidémiologiques*, in *Précis de bactériologie clinique*. 2000, ESKA: Paris. p. p. 229-246.
143. Maslow, J.N., M.E. Mulligan, and R.D. Arbeit, *Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms.* Clin Infect Dis, 1993. **17**(2): p. 153-62; quiz 163-4.
144. Tenover, F.C., et al., *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 1994. **32**(2): p. 407-15.
145. Trindade, P.A., et al., *Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives.* Braz J Infect Dis, 2003. **7**(1): p. 32-43.
146. Weller, T.M., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus typing methods: which should be the international standard?* J Hosp Infect, 2000. **44**(3): p. 160-72.
147. Blanc, D.S., et al., *Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 1994. **32**(10): p. 2505-9.
148. van Belkum, A., et al., *Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study.* J Clin Microbiol, 1998. **36**(6): p. 1653-9.
149. Peacock, S.J., et al., *Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing Staphylococcus aureus isolates in a microepidemiological setting.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3764-70.
150. Murchan, S., et al., *Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its*

application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1574-85.

151. Jarraud, S., et al., *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease.* Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 631-41.
152. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
153. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.* Trends Microbiol, 2003. **11**(10): p. 479-87.
154. Robinson, D.A. and M.C. Enright, *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3926-34.
155. Feil, E.J., et al., *eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data.* J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1518-30.
156. Shopsin, B., et al., *Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(11): p. 3556-63.
157. Koreen, L., et al., *spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(2): p. 792-9.
158. Oliveira, D.C., et al., *Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2001. **39**(2): p. 574-80.
159. Strommenger, B., et al., *Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2533-40.
160. Mellmann, A., et al., *Characterization of clonal relatedness among the natural population of Staphylococcus aureus strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(8): p. 2805-8.

161. Hallin, M., et al., *Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of Staphylococcus aureus infections.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 127-33.
162. Robinson, D.A. and M.C. Enright, *Evolution of Staphylococcus aureus by large chromosomal replacements.* J Bacteriol, 2004. **186**(4): p. 1060-4.
163. Friedrich, A.W., et al., *A European laboratory network for sequence-based typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) as a communication platform between human and veterinary medicine--an update on SeqNet.org.* Euro Surveill, 2008. **13**(19).
164. Oliveira, D.C., et al., *Assessment of allelic variation in the ccrAB locus in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones.* J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(1): p. 23-30.
165. Oliveira, D.C., et al., *CcrB typing tool: an online resource for staphylococci ccrB sequence typing.* J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(4): p. 959-60.
166. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3374-7.
167. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'.* J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(1): p. 42-8.
168. Kondo, Y., et al., *Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(1): p. 264-74.
169. Chen, L., et al., *Multiplex Real-Time PCR for Rapid Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Typing.* J Clin Microbiol, 2009.
170. Oliveira, D.C., A. Tomasz, and H. de Lencastre, *The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements.* Microb Drug Resist, 2001. **7**(4): p. 349-61.
171. Crisostomo, M.I., et al., *The evolution of methicillin resistance in Staphylococcus aureus: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9865-70.

172. Deurenberg, R.H., et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(3): p. 222-35.
173. Daum, R.S., et al., *A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of diverse genetic backgrounds.* J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1344-7.
174. Aires de Sousa, M., et al., *Two international methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones endemic in a university hospital in Patras, Greece.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 2027-32.
175. Katayama, Y., et al., *Jumping the barrier to beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2003. **185**(18): p. 5465-72.
176. Katayama, Y., et al., *Genetic background affects stability of mecA in Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2380-3.
177. Waldron, D.E. and J.A. Lindsay, *Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into Staphylococcus aureus and between S. aureus isolates of different lineages.* J Bacteriol, 2006. **188**(15): p. 5578-85.
178. Noto, M.J., et al., *Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 2008. **190**(4): p. 1276-83.
179. Grundmann, H., et al., *Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat.* Lancet, 2006. **368**(9538): p. 874-85.
180. Conceicao, T., et al., *Replacement of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study.* Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(10): p. 971-9.
181. Montesinos, I., et al., *Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(6): p. 2119-25.
182. Campanile, F., et al., *Hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (HA-MRSA) in Italy.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2009. **8**: p. 22.
183. Lelievre, H., et al., *Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics.* J Clin Microbiol, 1999. **37**(11): p. 3452-7.

184. Ferry, T., et al., *Toxin gene content of the Lyon methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone compared with that of other pandemic clones.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2642-4.
185. Laurent, F., et al., *Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals.* J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(3): p. 277-83.
186. Finks, J., et al., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, Michigan, USA, 2007.* Emerg Infect Dis, 2009. **15**(6): p. 943-5.
187. Massey, R.C., et al., *The evolution and maintenance of virulence in Staphylococcus aureus: a role for host-to-host transmission?* Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(12): p. 953-8.
188. Naimi, T.S., et al., *Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* Jama, 2003. **290**(22): p. 2976-84.
189. Vandenesch, F., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.* Emerg Infect Dis, 2003. **9**(8): p. 978-84.
190. Nimmo, G.R., et al., *Community acquisition of gentamicin-sensitive methicillin-resistant Staphylococcus aureus in southeast Queensland, Australia.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(11): p. 3926-31.
191. Levine, D.P., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus endocarditis in the Detroit Medical Center.* Ann Intern Med, 1982. **97**(3): p. 330-8.
192. CDC, *From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus--Minnesota and North Dakota, 1997-1999.* Jama, 1999. **282**(12): p. 1123-5.
193. Naimi, T.S., et al., *Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Minnesota, 1996-1998.* Clin Infect Dis, 2001. **33**(7): p. 990-6.
194. Groom, A.V., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a rural American Indian community.* Jama, 2001. **286**(10): p. 1201-5.
195. Herold, B.C., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk.* Jama, 1998. **279**(8): p. 593-8.
196. CDC, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin or soft tissue infections in a state prison--Mississippi, 2000.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2001. **50**(42): p. 919-22.

197. CDC, *Methicillin-resistant staphylococcus aureus infections among competitive sports participants--Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles County, 2000-2003.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2003. **52**(33): p. 793-5.
198. CDC, *Outbreaks of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections--Los Angeles County, California, 2002-2003.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2003. **52**(5): p. 88.
199. Tristan, A., et al., *Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus, 2006.* Emerg Infect Dis, 2007. **13**(4): p. 594-600.
200. Monecke, S., et al., *Microarray-based characterisation of a Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(8): p. 718-28.
201. Garnier, F., et al., *Pneumonia and new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone.* Emerg Infect Dis, 2006. **12**(3): p. 498-500.
202. Ramdani-Bouguessa, N., et al., *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 1083-5.
203. Senior, K., *Vaccine against hospital-acquired Staphylococcus aureus.* Drug Discov Today, 2002. **7**(8): p. 443-4.
204. Shinefield, H., et al., *Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis.* N Engl J Med, 2002. **346**(7): p. 491-6.
205. Dauwalder, O., et al., *Epidemiology of invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones collected in France in 2006 and 2007.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3454-8.
206. Grimprel, E., et al., *Paediatric varicella hospitalisations in France: a nationwide survey.* Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(5): p. 546-9.
207. Vojtov, N., H.F. Ross, and R.P. Novick, *Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10102-7.
208. Miethke, T., et al., *Acquired resistance to superantigen-induced T cell shock. V beta selective T cell unresponsiveness unfolds directly from a transient state of hyperreactivity.* J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3776-84.
209. Fitzgerald, J.R., et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8821-6.

210. Musser, J.M., et al., *A single clone of Staphylococcus aureus causes the majority of cases of toxic shock syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 225-9.
211. Nubel, U., et al., *Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14130-5.
212. O'Neill, A.J., et al., *A fusidic acid-resistant epidemic strain of Staphylococcus aureus carries the fusB determinant, whereas fusA mutations are prevalent in other resistant isolates.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(9): p. 3594-7.
213. O'Neill, A.J., et al., *Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol, 2007. **45**(5): p. 1505-10.
214. Laurent, F., et al., *Presence of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone (EEFIC) of Staphylococcus aureus in France.* J Antimicrob Chemother, 2009. **63**(2): p. 420-1; author reply 421.
215. Ender, M., B. Berger-Bachi, and N. McCallum, *Variability in SCCmecN1 spreading among injection drug users in Zurich, Switzerland.* BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 62.
216. Lemaire, X., et al., *First case of intrafamily transmission of a new MRSA clone with toxic shock syndrome toxin-1.* Scand J Infect Dis, 2008. **40**(8): p. 675-6.
217. van der Mee-Marquet, N., et al., *Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4883-4.
218. Ross, R.A. and A.B. Onderdonk, *Production of toxic shock syndrome toxin 1 by Staphylococcus aureus requires both oxygen and carbon dioxide.* Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5205-9.
219. Seidl, K., et al., *Staphylococcus aureus CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(4): p. 1183-94.
220. Nagao, M., et al., *Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (agr) locus.* BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 52.
221. Parsonnet, J., et al., *Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)-producing strains of Staphylococcus aureus and antibody to TSST-1 among healthy Japanese women.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(8): p. 2731-8.

222. Rajagopalan, G., et al.,, *Evaluating the role of HLA-DQ polymorphisms on immune response to bacterial superantigens using transgenic mice.* Tissue Antigens, 2008. **71**(2): p. 135-5.
223. Russell, H.H. and S. Sriskandan, *Superantigens SPEA and SMEZ do not affect secretome expression in Streptococcus pyogenes.* Microb Pathog, 2008. **44**(6): p. 537-43.
224. Ferens, W.A. and G.A. Bohach, *Persistence of Staphylococcus aureus on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells.* J Lab Clin Med, 2000. **135**(3): p. 225-30.
225. Werbick, C., et al., *Staphylococcal chromosomal cassette mec type I, spa type, and expression of Pls are determinants of reduced cellular invasiveness of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates.* J Infect Dis, 2007. **195**(11): p. 1678-85.
226. Savolainen, K., et al., *Expression of pls, a gene closely associated with the mecA gene of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, prevents bacterial adhesion in vitro.* Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3013-20.
227. Juuti, K.M., et al., *Reduced adherence and host cell invasion by methicillin-resistant Staphylococcus aureus expressing the surface protein Pls.* J Infect Dis, 2004. **189**(9): p. 1574-84.
228. Hussain, M., et al., *Expression of Pls (Plasmin Sensitive) in Staphylococcus aureus Negative for pls Reduces Adherence and Cellular Invasion and Acts by Steric Hindrance.* J Infect Dis, 2009. **200**(1): p. 107-117.
229. Queck, S.Y., et al., *Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA.* PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000533.
230. Wang, R., et al., *Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.* Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1510-4.
231. Kaito, C., et al., *A novel gene, fudoh, in the SCCmec region suppresses the colony spreading ability and virulence of Staphylococcus aureus.* PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3921.
232. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(7): p. 2155-61.

ANNEXES

***cch* alleles**

```
                                                    11111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111122222 2222222222 2222222222 2222222222 2223333333 33
         1111111 2222233333 3333444444 5555666778 8800000111 2222233344 4444555566 6777888888 9999900000 1122233445 5566777777 7788888888 9990001111 12
      6790256789 0127801234 5679023458 0137359581 8925678467 3467934624 5689013623 9189014679 0158901247 6928901090 2847012345 6901245689 1474690235 61
cch9  TTCAGGGTAG ATTTGAGCTA AATGAAGATT AAGCCATTGT GTTAAAAAGT TTAGTGAAAC GCAAAAAACT GTGGTCAAAC TCACTCATAT TCTCATTGCA AGATAGGTGC TGAAAATAGT TGCTACTATA AT
cch2  .....A.... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... ..
cch8  .....A.... .......... .......... .......... ...G.....C ...T...... .......... ..AC...GG. .......... .......A.. .......... .......... .......... .G
cch5  .....A.... .......... ........CA C.ATTT.... ...G...... ...T...... ....T..... ..AC....G. .......... .T........ .......... .......... .......... ..
cch7  .....A.... .......... .........A C.ATTT.... ...G...... ...T...... ....T..... ..AC....G. .......... .......A.. .......... .......... .......... ..
cch4  .....A.... .......... .........A C.ATTT.... ...G...... ...T...... ....T..... ..AC....G. .......... .T........ .......... .......... .......... ..
cch1  .....A.... .......... .....CAG.A C.ATTT.... ...G...... .......... ......C... ...C....G. ...A...CGA G.AT.C.A.C TAT.TACA.. GA..G..... C..C.TGC.. ..
cch6  .AAG.ACAT. ....AT.AAT CC.......A C.AT.T.... ...G...... ...T...... ....T..... ..AC....G. .......... .......A.. .......... .......... .......... ..

cch3  CCA.T.CACC TAACA.A..C ..CAG.A.GA CC.TATGCAC ACA.CGTGAA CAT.CCCGTG AAGCTG.GTC ACTTAGTTGT AGGAAGCC.. ATATG.CATC T.TCCAC.AG GATC.CGCTA .ATAGT..CT G.
```

***ccrA* alleles**

```
                                1111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111122 2222222222 2222222222 2222222222 2222233333 3333333333 3333333333 3333333333 33333
       112222333 4445566678 8889990000 1111112222 3333333344 5556667777 8888999901 1122222222 3333344445 5566667777 8889900000 1111112222 2223333334 4444455556 66666
      9021249369 2352756922 3473695679 1567890389 0125678946 3890564789 1379056831 2301235678 0124601365 8914590236 2685703689 0234891234 5890234692 4678945791 23456
ccrA5 CATGATCATC CGCACCTACG ATTCCTAACC TGATAAAAAA GTGCCGAGTA TGCACATAAG GGGCACACGA ACAAACTCAC CATGCAAAAA GTGACGCTCT AAGGAAGACA TACGACACCG CCGCCTAATC AGGGCAAAAA ACACc
ccrA9 .......... .......... .......... .......... .......... .......G. .......... .......... T.....G... .......... .......... .........A .........C ....C
ccrA8 .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ......G... .......... ....G.A... .......... .......... .........C ...T.
ccrA2 .G........ .......T.. .......... .......... ....AA.... ........G. .......... .......... ......G... .........C .......... .......... .......... ...A.....C .....
ccrA6 .G....T... ....T..... ..C...G..T G......... .......... ........G. .......... .......... ......G... .........C .......... .......... .......... ...A.....C .....
ccrA7 .G........ .......... .......... .......... .......... .......... .....T.T.. .......... ......G... .......... .......... .......... .......... .........C ....C
ccrA3 A.AAC-.GAT TAT.TAAT.T CACAA...AT A.T.C..CCT ACAT.AGACT CAGCTT.T.A .ACTC.C.AG TGGCTAAAGT .GCA..G..T ACTCA.T.G. TTAA.GTTTG AGAA.AG.AC AAC.TATCCA G.ATAGT... CAT.a
ccrA1 ....CC...T T.TCT.ATT. .ACG.C.GAT AACA.GTTCG ACTT.AG.CT .AGCTTACCA ATCACAC..G .T.CTAAACT ..CCACGGG. A.AC.A.AA. .......... ....G..T.A A.CTTAT.A. GAC.T..TG. .AG.t
```

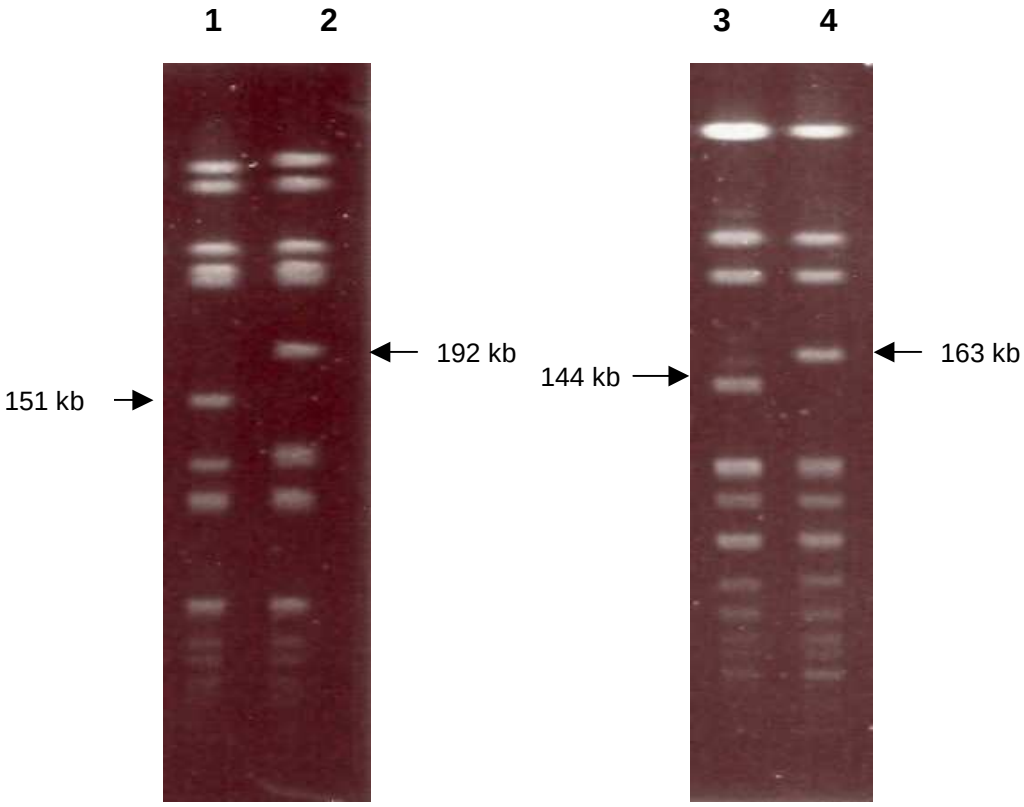
***ccrB* alleles**

```
                                11111 1111111111 1111111222 2222222222 2222222222 2222222233 3333333333 3333333333 3333344
         111122 3444666788 8899901112 2333355556 7778999011 1112222233 3444556667 7778889900 0112233334 4456666778 8899900
      3679025857 0258269212 4737924780 3167837895 3486258713 4692568901 7456281470 3690281403 6281703692 5870369561 7803602
ccrB4 TATAGTCAAC CTGAGAATGC GTAGGAGTTC CAGATAATGA TCCCTTTGCG CTACTACCAT CGGCTAACTA GTACTTGCAT TCATTTGCGT CAGACTATGG AGTTAAG
ccrB8 .......... .......... .......... .......... ....C.C... ......T..C .........C .....C.... .......... ........A. ....G..
ccrB6 .......... .......... .......... .......... ....C.C... ......T..C T........C .....C.... .......... ........A. ....G..
ccrB2 .......... .......... T......... .......... ....C.C... ......T..C .........C .....C.T.. .......... .......... ....G..
ccrB3 CC.....T.. .......... .......... .........G ....C.C... ......T..C .........C ..T..C.T.. .......... .......... ....G..
ccrB7 .C..T.T.GT TCAGA.G... ...AA..... TT..CCT.A. ...TCC.T.A TA.TCGT... A..TA.TTC. .C.TG.T.GA ATTCCCA.AC A.TGTCT... GAACCGT
ccrB1 .TCCTA...T TC..AT.AAT ACG.ACACAG TGTCAGGCAG .AGAC..CAT TATAA.TTCG .TCT.TGTCC AC....CT.. ..G...ATAC AGTGT.TC.C .AA.TGC
ccrB5 .TCCTA...T TC..AT.AAT ACG.ACACAG TGTCAGGCAG CAGAC..CAT TATAA.TTCG .TCT.TGTCC AC....CT.. ..G...ATAC AGTGT.TC.C .AA.TGC
```

***ccu* alleles**

```
                                                    1111111 1111111111 1111111111 1111111111 1222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222223 3333333333 3333
      111222233 3333344445 5555666677 7777888899 9990001112 2223333334 5555555666 6677888899 9000001111 1122222333 3334444445 5555566667 7777889990 0011111122 2223
     9278147801 2346925890 1478034723 5678123701 2670231474 5692345891 0146789025 6847034656 8015670236 7902578123 4790345690 5678914780 1679281790 7912456801 7890
ccu1 CTTATTATAT CACCTCATGT TTCCCTCTTA TACTACATTG CATCTGATAA GAACGAACCC CAATCCATCT GGTTTTTGGA TGTAGTCCAG ATCTTATTGC CTCGGCGAAG TATCGCTCGA CGAGAAATAA GAAAAGCCTC AGTA
ccu4 T...C..... .......... .....C..C. .T.A..GC.. .......CT. .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....
ccu8 T...C..... .......... .....C..C. .T.A..GC.. .......CT. .......... .......... .A........ .......... .......... .......... .......... .......... ....
ccu5 T...C..... .......... .....C..C. .T.A..GC.. .......CT. ..TA..GT.T ..GG...... ..A..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....
ccu6 T...C..... .......... .....C..C. .T.A..GC.. .......CT. A.TA..GT.T ..GG...... ..A..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....
ccu2 .......... .......... ........G. .T.A..GC.. .......CT. A..A..G..T T.GA..T.T. AAACCC..A. ..C..... ...A..... T......G.. .G.A.A.... .A...GG... .C.......T ..CC
ccu9 .......... .......... ..T.TC..G. .T.....T .......CT. A..A..G..T T.GA..T.T. ..A.AC.A.. A......... ..TAC....T T..A...TC. .G...A.T.G .......... ....G....A ..C.
ccu7 TA...C.... .....TC... .CT..C.... .T.....C.. ....A..CT. A..T.....T T.GG..T.TC AAAC.C.A.. .......... ...AC..A.. T......GT. CG...A.T.G .......... .C...A...T ....
ccu3 T.AT..TACA ACGTCT.ACA A.TG..AG.G A.AATG..C. GTAT.AT..G ATC.ATTTTA .G.CAGCCTC A.G..CATTG CAAGCCTGTT TATG.GG.T. .CGAAAA.TC GGAAATAGAT GATAC..CGT ACGTTATACA TCA.
```

Annexe 1. Sites polymorphiques des gènes *cch*, *ccrA*, *ccrB* et *ccu*. Les sites sont numérotés dans le sens vertical



Annexe 2. Profil en électrophorèse en champ pulsé d'isolats de *S. aureus*

Colonne 1 : isolat SASM *tst*-positive *agr*2

Colonne 2 : isolat SARM *tst*-positive *agr*2

Colonne 3 : isolat SASM *tst*-positive *agr*3

Colonne 4 : isolat SARM *tst*-positive *agr*3

Annexe 3

Poster 8ème Journées Nationales d'infectiologie Dijon 2007

A-09

Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* toxinogènes et résistantes à la méticilline impliquées dans des cas de surinfections de varicelle

Durand G.[1], Gillet Y.[2], Ferry T.[1], Bes M. [1], Lina G.[1], Vandenesch F.[1], Etienne J.[1]

[1] Centre National de Référence des Staphylocoques, UMR851, Faculté de Médecine Laennec, rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

[2] Service de Pédiatrie, Hôpital Edouard Herriot, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France

INTRODUCTION

Les complications bactériennes de la varicelle sont dues principalement à *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* est responsable de surinfections cutanées, d'infections des tissus mous comme de fasciites nécrosantes ou d'infections profondes comme d'ostéomyélites et de bactériémies exposant à un risque vital lié au choc septique.

OBJECTIFS

Caractériser les souches de *S. aureus* responsables de surinfections de varicelle sur le plan clinique et microbiologique

METHODES

Etude rétrospective incluant 44 isolats de *S. aureus* responsables de surinfections de varicelle reçus au CNR des Staphylocoques durant la période 2002-2006:

- détermination du profil toxinique
- typage *agr (accessory gene regulator)*
- recherche du gène *mec* A

Figure 1. Exfoliation généralisée (photo Y. Gillet)

N° CNR de l'isolat	Sexe	Age (ans)	Clinique	Ville	Gènes de toxines																				
					sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	tst	eta	etb	LukPV	LukDE	LukM	hla	hlb	hlg	hlg2	agr	mecA
MT20020188	M	1	choc toxinique	Lyon	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20020277	M	1	scarlatine	Paris	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20030157	M	3	scarlatine	Lille	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20030228	M	2	NR	Lyon	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20030651	M	4	dermohypodermite nécrosante	Lyon	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20040048	F	2	dermohypodermite	Bordeaux	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20040632	F	4	dermohypodermite nécrosante	Meaux	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20050448	M	1	NR	Nogent	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20050969	F	2	scarlatine	Bordeaux	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	+
MT20030273	M	2	scarlatine	Lyon	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	2	-
MT20040801	M	15	dermohypodermite nécrosante	Lyon	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3	-
MT20050155	M	3	NR	Paris	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3	-
MT20050705	M	3	NR	Lisieux	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-
MT20020372	F	2	NR	Lyon	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-
MT20040619	M	3	exfoliation généralisée	Paris	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-
MT20050693	F	2	impétigo bulleux	Colmar	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	2	-
MT20050974	M	2	exfoliation généralisée	Reims	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	2	-
MT20020651	M	3	exfoliation généralisée	Lyon	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	2	-
MT20040026	M	2	exfoliation généralisée	Lyon	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	2	-
MT20040637	F	1	impétigo bulleux	Bordeaux	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	4	-
MT20041077	F	4	impétigo bulleux	Moulins	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	4	-
MT20020943	M	1	exfoliation généralisée	Pointe à Pitre	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	4	-
MT20050276	M	1	abcès sous cutané	Papeete	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1	+
MT20051266	F	1	abcès sous cutané	Bordeaux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3	+
MT20051181	M	0	abcès sous cutané	Lyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
MT20050353	M	1	fasciite nécrosante	Lyon	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	4	-
MT20020533	M	1	scarlatine	Paris	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	1	+
MT20030165	M	1		Paris	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	1	-
MT20030295	F	3	impétigo bulleux	Paris	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	1	-
MT20030372	F	1	dermohypodermite	Paris	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	1	-
MT20040002	M	NR	impétigo bulleux	Annecy	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	1	-
MT20040489	M	3	NR	Lyon	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	1	-
MT20040643	M	22	Septicémie	Lyon	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	1	-
MT20050089	F	1	choc toxinique	Tours	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	1	-
MT20051180	F	1	NR	Lyon	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	1	-
MT20040419	M	3	dermohypodermite nécrosante	Paris	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	2	-
MT20040491	F	1	scarlatine	Lyon	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	2	-
MT20040730	F	3	dermohypodermite nécrosante	Mulhouse	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	2	-
MT20041042	M	1	dermohypodermite	Lyon	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	2	-
MT20030011	NR	0	dermohypodermite nécrosante	Pointe à Pitre	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-
MT20030012	F	7	NR	Lyon	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-
MT20050618	M	3	dermohypodermite nécrosante	Lisieux	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	3	-
MT20030927	F	2	dermohypodermite nécrosante	Auterive	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	2	-
MT20050518	F	0	angiome bulleux nécrotique	Marseille	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	3	-

Tableau 1. Caractéristiques cliniques et microbiologiques des isolats de *S. aureus* responsables de surinfection de varicelle reçus au CNR des Staphylocoques durant la période 2002-2006

NR: non renseigné

Dénomination des gènes : *sea* à *seo*, entérotoxines A à O; *tst*, toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1); *eta* et *etb*, *exfoliatine* A et B; *luk*-PV, leucocidine de Panton et Valentine (PVL); *luk*-DE et *luk*-M, leucocidines luk-DE et M; *hlb*, hémolysine Béta; *hlg* et *hlg2*, hémolysines gamma et gamma variant

RESULTATS ET DISCUSSION

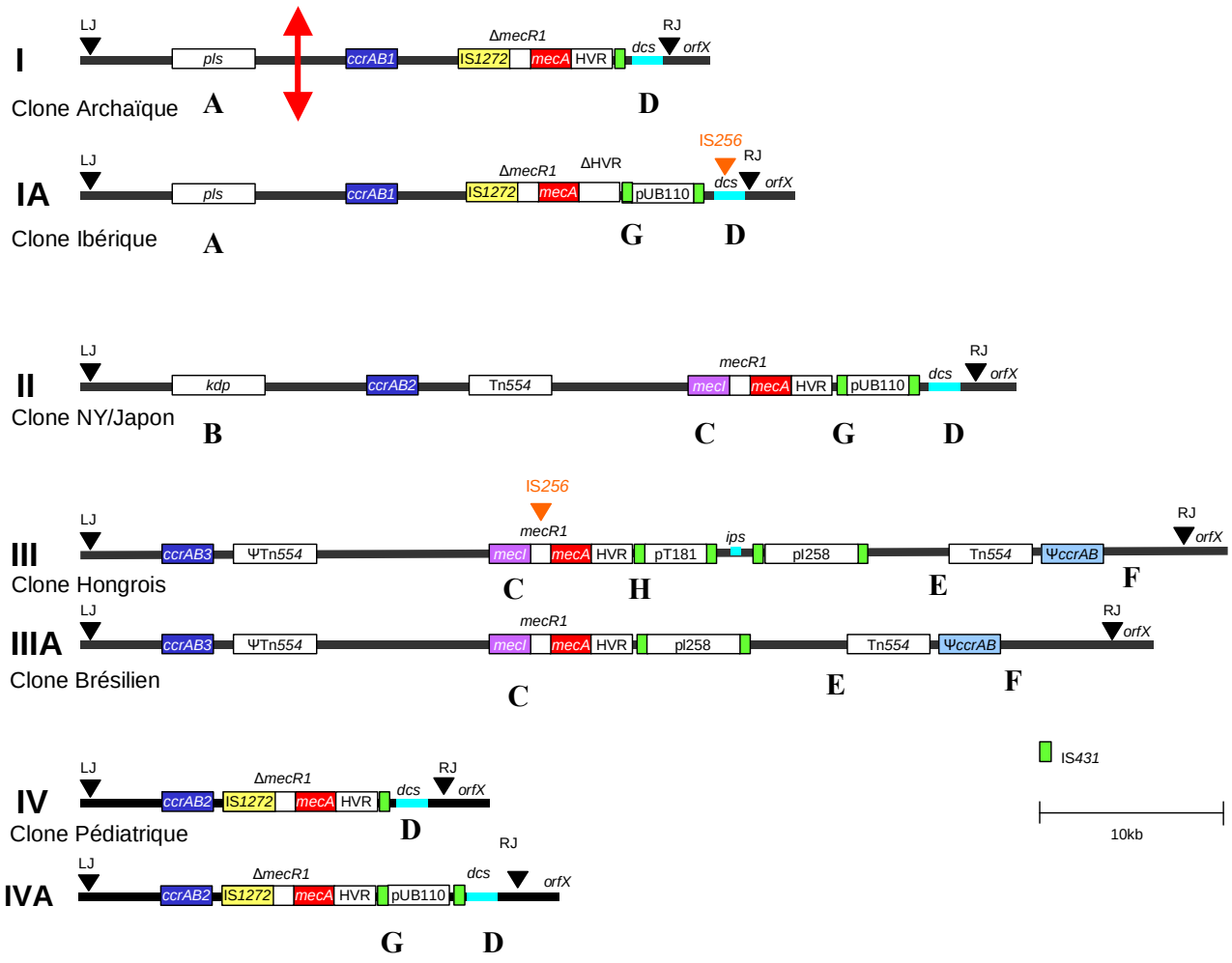
- Age médian : 2 ans, âges extrêmes : 1 mois à 22 ans, sex ratio : 1.5
- Principaux types de surinfections : dermohypodermite nécrosante (8 cas), scarlatine (6 cas), impétigo bulleux (5 cas), exfoliation généralisée (5 cas), dermohypodermite (3 cas), abcès sous-cutané (3 cas), choc toxinique (2 cas), fasciite nécrosante (1 cas)
- 12 isolats/44 (27%) sont des *S. aureus* résistants à la méticilline (*mec* A+, en jaune dans le tableau)
- 42 isolats/44 (95%) possèdent au moins un gène codant une toxine majeure (TSST-1, PVL, exfoliatine A, exfoliatine B, entérotoxines A, B ou C) (en gris sur le tableau)
  - 13 isolats/44 (30%) possèdent le gène de la TSST-1 dont 9 appartiennent à un clone épidémique de SARM (*agr* 2) impliqué dans des infections communautaires chez des sujets jeunes[1]. Ces 9 isolats sont responsables d'infections variées : choc toxinique (1 cas), scarlatine (3 cas), dermohypodermite (1 cas), dermohypodermite nécrosante (2 cas)
  - 9 isolats /44 (20%) possèdent le gène de l' exfoliatine A et sont responsables d'impétigos bulleux (3 cas) ou d'exfoliations généralisées (5 cas) dont 2 isolats possèdent également le gène de l' exfoliatine B
  - 4 isolats/44 (9%) possèdent les gènes de la PVL, 3 isolats sont responsables d'abcès et un isolat, de fasciite nécrosante
  - 16 isolats/44 (36%) possèdent une entérotoxine de type A, B ou C (un isolat possède deux entérotoxines) et sont responsables d'infections diverses.

CONCLUSION

La gravité et la diversité clinique des cas de surinfections de varicelle à *S. aureus* sont liées à l' implication de souches toxinogènes dont des souches résistantes à la méticilline, produisant la TSST-1 qui appartient à un clone épidémique en France.

Référence: [1]Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M.C. Enright, F. Forey, N. Liassine, A. Wenger, K. Kikuchi, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne. 2006. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital-and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol 44:847-853

geraldine.durand@chu-lyon.fr



Annexe 4. Typage de la cassette SCC*mec* par la PCR multiplex d'Oliveira et al [232]. A, B, C, D, E, F, G, H correspondent aux loci amplifiés en PCR multiplex. La double flèche indique la délétion du locus A dans la cassette SCC*mec* I tronquée. La présence unique du locus D entraîne la confusion avec la cassette SCC*mec* de type IV.

Abréviations: LJ, jonction gauche, RJ, jonction droite; *pls*, gène codant la protéine de surface Pls; *kdp*, copie de l'opéron contrôlant l'expression du gène du transporteur de potassium; *dcs*, région conservée dans le type I et II; *orf*X, séquence à cadre de lecture ouvert. Les sites d'insertion de la séquence IS*256* détectés au niveau du type IA et III sont représentés par des triangles orange sur ce schéma.

RESUME

La plasticité génomique de *Staphylococcus aureus* lui permet d'acquérir des gènes codant des facteurs de virulence mais aussi des gènes de résistance aux antibiotiques, notamment la cassette de résistance à la méticilline (SCC*mec*). La résistance à la méticilline est d'abord apparue dans des souches hospitalières à l'origine de grands clones pandémiques nosocomiaux, puis a ensuite émergé en milieu communautaire chez des souches virulentes possédant la leucocidine de Panton -Valentine. Nous avons observé en 2002, en milieu hospitalier et communautaire, l'émergence inquiétante de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) portant le gène *tst* de la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1). Notre travail a consisté à : (i) l'élaboration de nouveaux outils contribuant à la description de clones de SARM, notamment d'un outil de typage de la cassette SCC*mec*, (ii) la caractérisation phénotypique et moléculaire de ce nouveau clone, (iii) l'étude de l'épidémiologie de ce clone, (iv) l'exploration de la pathogénie de ce clone en recherchant les propriétés génétiques qui lui confèrent une telle virulence et épidémicité, et notamment en identifiant le rôle de la TSST-1.

Le clone de SARM *tst*$^+$ est un clone épidémique de fond génétique ST5 en *Multi Locus Sequence Typing*, atteignant principalement les sujets jeunes, et responsable d'infections variées à la fois toxiniques et suppuratives. Il est doté d'une cassette SCC*mec* atypique de type I tronquée dont le rôle dans le potentiel épidémique et de virulence de ce clone reste à déterminer. Enfin, la TSST-1 ne semble pas jouer un rôle déterminant, direct ou indirect, dans la pathogénie pléiotropique de ce clone.

TITLE

Characterisation, epidemiology and pathogeny of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone containing the toxic shock syndrome toxin-1 gene (TSST-1).

ABSTRACT

The plasticity of the *Staphylococcus aureus* genome confers to this specie the ability to gain accessory genes encoding virulence factors as well as antibiotic resistance determinants such as *Staphylococcal cassette chromosome mec* SCC*mec* that encodes methicillin-resistance. Methicillin resistance first emerged in hospital-acquired strains originally of successful nosocomial pandemic clones, and is also risen in virulent community-acquired strains containing the Panton-Valentine leucocidin.

In 2002, we observed the worrying emergence of a new methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clone that contains the *tst* gene encoding toxic shock syndrome toxin (TSST-1) responsible for both hospital and community-acquired infections. Our study was focused on: (i) new tools for MRSA description, mainly on a SCC*mec* typing tool, (ii) the characterisation of this new clone by molecular and phenotypic methods, (iii) the epidemiology of this clone, (iv) the pathogenic potential of this clone and the investigation of the genetic features that enhance transmission and virulence, particularly the role of TSST-1.

The *tst*+ MRSA clone is an epidemic clone of genetic background ST5 by multilocus sequence typing that occurs mainly in young people and is responsible for a wide diversity of clinical syndromes including toxin-mediated and suppurative diseases. This clone harbours a peculiar cassette "truncated SCC*mec* type I" which could play an important role in virulence and transmission but are still under investigation. TSST-1 does not play a determining role (either directly or indirectly) in the pleiotropic pathogenesis of this clone.

DISCIPLINE : Ecologie Microbienne

MOTS-CLES : *Staphylococcus aureus*, résistance à la méticilline, Toxic shock syndrome toxin-1, Staphylococcal cassette chromosome *mec*

INSERM U851 Equipe Pathogénie des Staphylocoques Faculté de médecine Laennec-7 rue Guillaume Paradin 69008 Lyon, France