

Coordonnées du Laboratoire de Référence

Dr M. STRUELENS Tél. : 02/555.45.19	Hôpital Erasme - Microbiologie Fax : 02/555.64.59	Route de Lennik, 808 1070 Bruxelles E-mail : Marc.struelens@ulb.ac.be
--	--	--

Le laboratoire de Référence pour les Staphylocoques - MRSA de l'**Université Libre de Bruxelles** assure les services suivants:

- Identification et antibiogramme de souches atypiques de staphylocoques par méthodes :
 - ❖ Phénotypiques : tests biochimiques, concentrations minimales inhibitrices, phénotype de sensibilité aux glycopeptides (études de population)
 - ❖ Génotypiques : identification des différentes espèces de staphylocoques par séquençage du gène *rpoB* détection des gènes *nuc* (pour l'identification des *S. aureus*), *mecA* (codant pour la résistance à l'oxacilline), *mupA* (codant pour la résistance à la mupirocine) et des gènes de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS), aux tétracyclines et aux aminoglycosides.
- Typage moléculaire : macrorestriction génomique par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), multi-locus sequence typing (MLST), *spa* sequence typing et typage de la cassette chromosomique *mec* du staphylocoque (SCC*mec*), détermination du groupe *agr*.
- Détection des gènes codant pour les toxines : exfoliatines A et B, leucocidine de Panton Valentine (PVL) et Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1).

Ces analyses sont réalisées à la demande des laboratoires hospitaliers pour des souches cliniques posant des problèmes diagnostiques ou sur des collections de staphylocoques provenant d'enquêtes épidémiologiques locales. Les formulaires de demande d'analyses sont téléchargeables sur le site Internet du laboratoire de référence des MRSA à l'adresse suivante : <http://www.mrsa.be>.

Le laboratoire a également participé en 2006-2007 à une étude sur la diversité clonale des souches de *S. aureus* (MRSA et MSSA) causant des infections invasives dans les hôpitaux européens. Cette enquête a été réalisée dans le cadre du programme européen EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) concernant la résistance de *S. aureus* comme agent de bactériémie chez les patients hospitalisés, en collaboration avec le service d'Epidémiologie de l'Institut Scientifique de la Santé Publique (ISP). Cette étude avait pour objectif d'identifier et d'établir la carte de dissémination des clones prédominants de *S. aureus*. Ces clones ont été identifiés par séquençage d'une région répétée de la protéine A (*spa* typing).

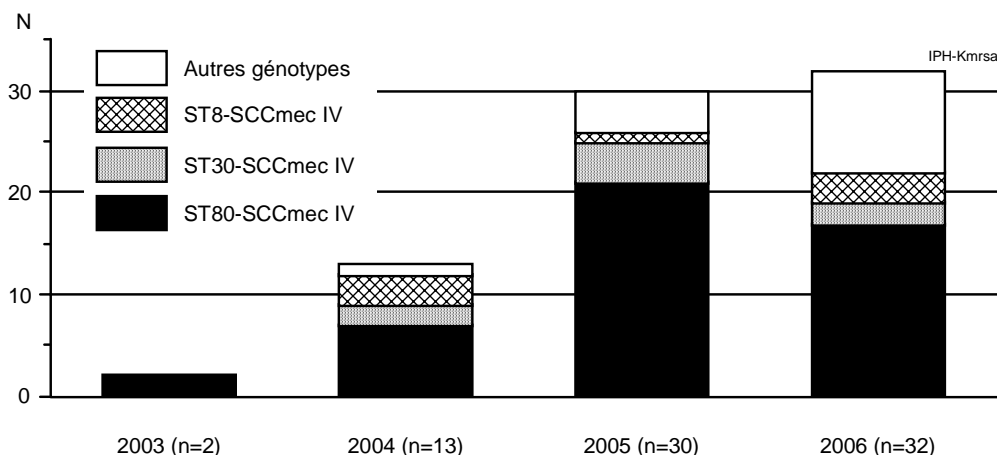
Caractérisation de souches atypiques de staphylocoques

En 2006, le laboratoire a caractérisé 220 souches cliniques de staphylocoques dans le cadre de demandes ponctuelles provenant de 39 laboratoires. L'identification phénotypique et/ou génotypique de 52 souches atypiques et l'analyse de résistance (oxacilline et/ou vancomycine) de 71 souches ont été réalisées. Aucune souche de MRSA de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) n'a été détectée. La résistance à la mupirocine a été analysée par détermination de la CMI et par PCR pour 142 souches provenant de 14 hôpitaux, parmi lesquelles 86 (60%) montraient un haut niveau de résistance à la mupirocine (CMI > 524 mg/l) et la présence du gène *mupA*.

Recherche de toxines

En 2006, 132 souches de *S. aureus*, 97 MRSA, 33 MSSA et 2 BORSA, provenant de 43 hôpitaux ont été envoyées au laboratoire de Référence pour la recherche de toxines. Les gènes *lukS-lukF* PV codant pour la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) ont été retrouvés chez 32 (33%) souches de MRSA provenant de 23 hôpitaux et chez 7 (21%) souches de MSSA. La plupart des souches de MRSA PVL positive présentaient un profil de résistance typique : sensibilité à la ciprofloxacine (88%) et résistance à l'acide fusidique (53%), la kanamycine (75%) et la tétracycline (72%). Dix sept d'entre elles (53%) appartenaient au pulsotype X correspondant au clone épidémique européen ST80-SCC*mec* IV. Les autres souches de MRSA appartenaient à 9 autres pulsotypes. Ces souches ont été isolées chez des patients jeunes (médiane 25 ans, intervalle : 1-62 ans) sans antécédents médicaux particuliers. Elles sont essentiellement associées à des infections cutanées de type furoncles, abcès, cellulite.

Figure 1 : *S. aureus* (MRSA) : évolution des principaux génotypes des souches de CA-MRSA PVL positives, 2003-2006



La toxine TSST-1 a été détectée dans 12 souches de MRSA et 9 souches de MSSA. Ces souches TSST-1 positive appartiennent aux pulsotypes J, C ou G. Deux souches de MRSA présentaient le gène de l'exfoliatine A. Trois souches de MSSA, isolées chez de jeunes enfants, montrent la présence des gènes codant pour les exfoliatines A et B et appartiennent au même pulsotype N. Deux souches de MSSA, de même pulsotype J et isolées dans une même famille, montraient la présence des gènes codant pour les PVL et TSST-1.

Typage pour enquête d'épidémies locales

En 2006, le typage moléculaire (PFGE) de souches de *S. aureus* a été réalisé pour 170 souches provenant de 20 hôpitaux dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques locales ou de la surveillance locale des MRSA. Le typage moléculaire a permis de confirmer une possible transmission de MRSA dans les services de 8 hôpitaux (n=69 souches). Parmi ces enquêtes, le pulsotype G10 est le plus souvent associé à l'épidémie (21 souches dans 3 hôpitaux). Malheureusement, les données épidémiologiques relatives à ces épidémies ou enquêtes locales sont rarement transmises au Laboratoire de Référence, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats de typage. Une diversité clonale a été observée parmi les 166 souches de MRSA analysées qui ont été classées en 13 groupes PFGE distincts. Les 3 groupes majeurs retrouvés dans les études de surveillance précédentes (génotypes épidémiques A20, B2 et G10) sont les plus fréquents. Ils sont retrouvés dans 54 (A20) et 31 souches (B2 et G10). Le génotype B2 est présent dans 13 (65%) hôpitaux, le génotype A20 est retrouvé dans 10 hôpitaux (50%) et le G10 est retrouvé dans 5 (20%) hôpitaux.

Programme EARSS de surveillance de la résistance des *S. aureus* isolés d'hémoculture

Depuis 2005, le protocole de surveillance a été modifié pour les participants belges. Les bactériémies à *S. aureus* sensibles ou résistantes à l'oxacilline font simplement l'objet d'une déclaration sur formulaire reprenant les données cliniques et bactériologiques. En 2006, 959 patients avec un premier épisode de bactériémie à *S. aureus* ont été enregistrés. Parmi ces patients, 188 cas de bactériémie à MRSA ont été confirmés, soit une proportion de 21,9% de MRSA. Le nombre de bactériémie à MRSA chez les patients hospitalisés en Belgique a spectaculairement diminué par rapport à 2005 (31,4% MRSA). Les données pour tous les pays participant au programme EARSS sont disponibles sur le site <http://www.earss.rivm.nl/>.

Enquête EARSS - SeqNet sur la diversité clonale des souches de *S. aureus* causant des infections invasives dans les hôpitaux européens

Dans le cadre du programme Européen de surveillance de la résistance des souches invasives de *S. aureus* (EARSS), un échantillon de 23 hôpitaux belges a été sélectionné sur base du nombre suffisant de souches de *S. aureus* (>15) isolées d'hémoculture en 2005 et de leur répartition géographique, pour participer à cette étude. Ces laboratoires étaient situés en Flandre (n=14), en Wallonie (n=7), et à Bruxelles (n=2). Ces souches ont été analysées par séquençage de la région hyper variable de la protéine A de surface (gène *spa*).

Dans le cadre de cette enquête, les laboratoires de microbiologie des hôpitaux sélectionnés ont été invités à récolter 10 souches cliniques, consécutives et non dupliquées de *S. aureus* (5 MRSA et 5 MSSA), isolées de sites normalement stériles chez des patients présentant une infection invasive à *S. aureus*. Ces souches ont été collectées sur une période de 6 mois (15/09/2006 au 15/03/2007).

Les souches ont été envoyées au Laboratoire de Référence des Staphylocoques – MRSA avec un formulaire reprenant des données démographiques: l'âge, le sexe, l'unité d'hospitalisation du patient, le site clinique d'isolement de la souche, la date d'isolement de la souche et le type d'acquisition (nosocomiale ou importée) de la souche. Une acquisition nosocomiale de MRSA a été définie comme étant l'isolement de MRSA chez un patient après les 48 premières heures de son hospitalisation.

Données démographiques

Le rapport homme/ femme des patients, pour lesquels une souche de MRSA a été envoyée, est de 1,53 et la médiane d'âge de 71 ans (intervalle : 22-92 ans) (tableau 1). La plupart des patients étaient hospitalisés (n=79, 88%) dont 9 (10%) aux soins intensifs. Dix sept patients (19%) sont décédés dans les 14 jours suivant leur infection à MRSA.

Le rapport homme/ femme des patients, pour lesquels une souche de MSSA a été envoyée, est de 1,05 et la médiane d'âge de 61 ans (intervalle : 1-90 ans) (tableau 1). Quatre vingt six patients (78%) étaient hospitalisés dont 21 (19%) aux soins intensifs. Dix neuf patients (17%) sont décédés dans les 14 jours suivant leur infection à MSSA.

Tableau 1 : Répartition par sexe et par âge des patients avec *S. aureus* en 2006-2007- Enquête EARSS-SeqNet, Belgique

Age (ans)	MRSA				MSSA			
	Femme		Homme		Femme		Homme	
	N	%	N	%	N	%	N	%
< 20	0	0,0	0	0,0	6	11,1	3	5,3
20-49	4	11,1	8	14,5	10	18,5	16	28,1
50-59	3	8,3	9	16,4	8	14,8	9	15,8
60-69	8	22,2	6	10,9	11	20,4	11	19,3
70-79	6	16,7	22	40,0	5	9,3	11	19,3
≥ 80	15	41,7	10	18,2	14	25,9	7	12,3
Total	36	100,0	55	100,0	54	100,0	57	100,0

mrsa_t1

Souches bactériennes

Parmi les 93 souches de MRSA reçues de 23 hôpitaux, 91 (98%) MRSA ont été confirmés par analyse génotypique (PCR 16sRNA, *nuc*, *mecA*). Une souche a été identifiée comme étant un staphylocoque à coagulase négative et une autre comme BORSA (Borderline oxacillin resistant *S. aureus*). Parmi les 113 MSSA récoltées, l'identification de 111 souches (98%) a été confirmée par PCR multiplex. Deux souches ont été identifiées comme étant des staphylocoques à coagulase négative. Chaque hôpital a collecté entre 2 et 5 souches de MRSA et 3 à 5 souches de MSSA. La majorité des souches de *S. aureus* ont été isolées d'hémocultures (78% des MRSA et 80% des MSSA). Deux MRSA ont été isolés de liquide céphalo-rachidien (2%) et le reste des souches provient d'autres liquides de ponction (20% des MRSA et 20% des MSSA).

Cinquante-neuf pour cent des souches de MRSA ont été acquises à l'hôpital. Le taux d'acquisition nosocomiale des MRSA a diminué par rapport à la dernière surveillance nationale (59% versus 64%).

Distribution des principaux génotypes épidémiques

Les *spa* types ont été déterminés grâce au logiciel Ridom StaphType 1.4 (Ridom GmbH) et analysés selon l'algorithme BURP avec les paramètres par défaut : les *spa* types de moins de 5 repeats ont été exclus, et deux *spa* types appartiennent au même groupe ou complexe clonal *spa* (*spa* CC) si le coût est inférieur ou égal à 6 selon l'algorithme EDSI.

Le génotypage réalisé pour les 202 souches de *S. aureus* classe celles-ci en 15 *spa* CC, chacun incluant un nombre de souches variant entre 2 et 41. La majorité des souches appartiennent aux *spa* CC008 (21%), CC740 (18%), CC002 (15%). Ces *spa* CC correspondent aux clones épidémiques majeurs déterminé par multilocus sequence typing (MLST), ST8 (ou « related » : ST247, ST250 et ST254) pour *spa* CC008, ST45 pour *spa* CC740 et ST5 pour *spa* CC002. Quatre souches ont été exclues (< 5 repeats), 13 souches ont été classées en singleton et 2 souches montrent un nouveau profil « repeat ».

Parmi les 91 souches de MRSA, 93% appartiennent aux *spa* CC008- ST8 (41%), *spa* CC740- ST45 (33%) et *spa* CC002- ST5 (19%). Par contre, les 111 souches de MSSA montrent une plus grande diversité clonale et sont classées en 15 *spa* CC incluant chacun entre 2 et 13 souches. Les *spa* CC majoritaires retrouvés dans les souches de MRSA sont également présents dans les souches de MSSA mais en proportion plus faible : CC008- ST8 (4%), CC740- ST45 (4%) et CC002- ST5 (12%). Ces observations confirment les résultats de Hallin et al. (2007) concernant la parenté entre MRSA et MSSA parmi les patients hospitalisés en Belgique. Certains *spa* types sont retrouvés uniquement dans les souches de MSSA, comme *spa* CC084 correspondant aux ST15 ou ST18 par MLST, retrouvé dans 11% des MSSA ou *spa* CC015- ST45 présent dans 11% et *spa* CC078 -ST26 ou 101 retrouvé dans 6% des MSSA. Une souche de MRSA communautaire portant les gènes *lukS-lukF* codant pour la PVL correspondant au clone MRSA ST59 a été détectée chez un patient.

Analyse de *S. aureus* d'origine animale

Depuis 2005, le Laboratoire de Référence analyse des souches de *S. aureus* isolées d'animaux et référées par des collègues vétérinaires (Faculty of veterinary Medicine, Ghent University et CODA CERVA). En 2006, 25 souches de *S. aureus* d'origine animale ont été envoyées pour typage moléculaire et recherche de toxines.

Dix souches de MSSA isolées de lapins ont été analysées, 4 d'entre elles appartiennent au pulsotype N2 associé aux souches de MSSA hyper-virulentes européennes (Dieter et al. 2006). Les 7 autres appartiennent à d'autres génotypes et l'une d'entre elles montre la présence des gènes *lukS-lukF* codant pour la PVL.

Quatorze souches de MRSA d'origine équine et une souche de MRSA porcine ont été analysées. Ces souches étaient principalement associées à des infections cutanées et sous-cutanées (n=11), respiratoires (n=2) ou péritonite (n=1). Toutes ces souches de MRSA sont non typables par PFGE après macrorestriction avec *Sma*I, appartiennent au clone t011 par *spa* typing et au clone ST398 par MLST. Les souches équines possèdent une cassette *SCCmec* de type IV et la souche porcine possède une cassette de type V. La recherche de toxines PVL et TSST-1 est négative. Elles présentent par ailleurs un antibiogramme très particulier : elles sont résistantes à la tétracycline (100%), gentamicine et tobramycine (100%), érythromycine-clindamycine (90%), co-trimoxazole (50%) et restent sensibles à la ciprofloxacine (90%). La résistance aux tétracyclines est principalement codée par le gène *tetM* codant pour une protéine cytoplasmique de protection ribosomiale. La résistance aux Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS) est médiée par le gène *ermC* codant pour une méthylase conférant un phénotype de résistance de type MLS_b inducible. Ce profil correspond au type décrit chez les souches porcines de MRSA en France, en Allemagne, au Danemark et surtout aux Pays-Bas (tétra-R; *spa* types t108, t011 et t034; PFGE NT; ST 398).

Des souches de MRSA présentant des profils phénotypiques et génotypiques (ST398) identiques à ceux retrouvés chez les souches animales ont été détectées chez des patients hospitalisés. Tous ces patients étaient soignés en Flandre, dans des provinces à haute densité d'élevage porcin.

- Cinq souches collectées durant les études de surveillance nationales des MRSA organisées en 2003 (n=2) et en 2005 (n=3), soit 0,5 à 1 % des souches isolées de patients hospitalisés au cours des enquêtes de surveillance nationale.
- Deux souches envoyées au laboratoire de référence pour typage et isolées à Roeselare en 2005, et à Ieper en 2006.

Tableau 2 : Données démographiques des souches humaines de MRSA de génotype identique aux souches porcines, 2003-2006

Année	Sexe	Age (ans)	Source	Unité d'hospitalisation	Acquisition	Commune %
2003	M	67	Respiratoire	Méd. Interne	Communautaire	St-Truiden
	F	76	Hémoculture	Autre	Nosocomiale	Brugge
2005	M	70	Dépistage	Autre	Nosocomiale	Brugge
	F	67	Urines	Méd. Interne	Nosocomiale	Roeselare
2006	F	76	Respiratoire	Gériatrie	Communautaire	Roeselare
	F	NP	Non précisée	Non précisée	Non précisée	Roeselare
	M	6	Hémoculture	Pédiatrie	Communautaire	Ieper
	F	64	Pus	Chirurgie	Non précisée	Roeselare

mrsa_t2

Conclusions

Depuis 2004, nous constatons une augmentation du nombre de souches MRSA PVL- positive responsables principalement d'infections cutanées. La plupart de ces souches appartiennent au clone MRSA ST80-*SCCmec* IV largement décrit en Europe mais on observe en 2006 une diversification des clones parmi ces souches (ST30- *SCCmec* IV, ST8-*SCCmec* IV, ST59-*SCCmec* IV).

Dans le cadre des enquêtes locales, le génotypage montre que les souches de MRSA associées à des épidémies/ cas groupés dans nos hôpitaux appartiennent principalement aux trois clones nosocomiaux épidémiques majeurs A20, B2 et G10.

Pour la première fois depuis le début du programme EARSS, on observe une diminution significative et importante du taux de résistance à l'oxacilline des *S. aureus* (21,9% en 2006 versus 31,4% en 2005) isolés de bactériémies chez les patients hospitalisés en Belgique. Cette tendance s'était déjà manifestée dans d'autres pays européens tels la France et la Slovénie.

Dans le cadre de l'enquête européen sur la diversité clonale des souches de *S. aureus* responsables d'infections invasives, les 23 hôpitaux participants ont correctement identifié (>98%) les souches de MRSA et de MSSA. Le génotypage par *spa* typing montre la présence de 3 génotypes majeurs parmi les souches de MRSA comprenant plus de 90% des souches : *spa* CC008-ST8 (pulsotype A20), *spa* CC740-ST45 (pulsotype B2) et *spa* CC002-ST5 (pulsotypes C et G). Par contre, les souches de MSSA présente une grande diversité clonale.

Depuis 2005, nous assistons à l'émergence et à la dissémination de souches de MRSA d'origine animale présentant les mêmes caractéristiques, non typable par PFGE, t011 par *spa* typing, *SCCmec* IV ou V et ST398 par MLST, correspondant au type décrit chez les souches porcines de MRSA en France et au Pays-Bas. Ces souches ont été occasionnellement retrouvées

comme cause d'infection humaine, parmi des patients hospitalisés en Flandre (< 1 % des souches isolées de patients hospitalisés au cours des enquêtes de surveillance nationale).

Références

- Deplano A, Witte W, van Leeuwen WJ, Brun Y, Struelens MJ.
Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries.
Clin Microbiol Infect 2000; 6(5):239-245.
- Denis O, Magdalena J, Deplano A, Nonhoff C, Hendrickx E, Struelens MJ.
Molecular epidemiology of resistance to macrolides lincosamides-streptogramins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causing bloodstream infections in patients admitted to Belgian hospitals.
J Antimicrob Chemother 2002; 50(5):755-757.
- Denis O, Deplano A, De Ryck R, Nonhoff C, Struelens MJ.
Emergence and spread of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals.
Microb Drug Resist 2003; 9(1):61-71.
- Denis O, Deplano A, Nonhoff C, De Ryck R, de Mendonça R, Rottiers S, Vanhoof R, Struelens MJ.
National surveillance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Belgian hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones.
Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48(9):3625-3629.
- Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, Hallin M, Huysmans G, Garrino MG, Glupczynski Y, Malaviolle X, Vergison A, Struelens MJ.
Polyclonal emergence and importation of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leukocidin genes in Belgium.
J. Antimicrob. Chemother. 2005; 56(12):1103-1106.
- Denis O, Deplano A, Nonhoff C, Hallin M, De Ryck R, Vanhoof R, De Mendonça R, Struelens MJ.
In Vitro activities of ceftobiprole, tigecycline, daptomycin and 19 other antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a national survey of Belgian Hospitals.
Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(8):2680-2685.
- Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonça R, De Ryck R, Struelens MJ.
Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long term, nation-wide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections.
J. Clin. Microbiol. 2007 (45) 127-133.
- Hallin M, Denis O, Deplano A, de Mendonca R, De Ryck R, Rottiers S, Struelens MJ.
Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey.
J. Antimicrob. Chemother. 2007 (59) 465-472
- Vancraeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemauwe C, K. Hermans K.
International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone.
J. Vet. Med. 2006 (53) 418-422.