



HAL
open science

Place de la PCR-hybridation dans le diagnostic de deux bactéries multirésistantes : les ERG et les SARM LPV

Alice Duroch

► **To cite this version:**

Alice Duroch. Place de la PCR-hybridation dans le diagnostic de deux bactéries multirésistantes : les ERG et les SARM LPV. Sciences pharmaceutiques. 2009. hal-01733214

HAL Id: hal-01733214

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733214>

Submitted on 14 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

FACULTE DE PHARMACIE

2009

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE pour le DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR en PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

le 26 juin 2009

par Alice DUROCH

Née le 8 juillet 1982 à Nancy (54)

**Place de la PCR-hybridation dans le
diagnostic de deux bactéries
multirésistantes :
les ERG et les SARM LPV**

Membres du Jury

Président : M. Christophe GANTZER, PU Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M^{lle} Corentine ALAUZET, PHU, Faculté de Médecine, Nancy
M. Alain LOZNIOWSKI, PU-PH, Faculté de Médecine, Nancy
M. Christian RABAUD, PU-PH, Faculté de Médecine, Nancy

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité)	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON	Pharmacologie
Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU.....	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie
Pierre LEROY.....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT.....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA.....	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS.....	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS.....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN.....	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON.....	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT.....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS.....	Parasitologie
Mariette BEAUD.....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT.....	Communication et Santé
Michel BOISBRUN.....	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX.....	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX.....	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Gérald CATAU.....	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN.....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT.....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB.....	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Bernard DANGIEN.....	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN.....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU.....	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique

Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD..... Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS..... Bactériologie

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET..... Directeur

Frédérique FERON..... Responsable de la section Pharmacie-Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Merci à...

M. Christophe GANTZER

Professeur de microbiologie environnementale, Faculté de Pharmacie, Nancy.

Je vous remercie d'avoir accepté la présidence de ma thèse. Je garde un bon souvenir de vos travaux pratiques à la faculté... mes premiers pas en microbiologie.

M^{elle} Corentine ALAUZET

Praticien Hospitalo-Universitaire au laboratoire de bactériologie, CHU de Nancy.

Merci de m'avoir fait découvrir le domaine de la biologie moléculaire et d'avoir accepté de diriger mon travail. Je te souhaite plein de réussite pour les événements à venir.

M. Alain LOZNIEWSKI

Professeur, Praticien Hospitalier et Chef du service du laboratoire de bactériologie, CHU de Nancy.

Je tiens à vous remercier pour les séances « brainstorming » et votre aide précieuse pour la rédaction de ce mémoire. Je souhaite vous adresser également toute ma reconnaissance pour mon inter-CHU à Paris qui, sans vous, ne serait resté qu'un projet.

M. Christian RABAUD

Professeur, Praticien Hospitalier dans le service de maladies infectieuses et tropicales, CHU de Nancy.

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Le DU d'antibiothérapie et notre présentation sur les ERG (encore eux !) à Lunéville restent deux excellents souvenirs.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont communiqué leur passion :

M. Capdeville, mes six mois vosgiens à vos côtés ont été une expérience très enrichissante.

Nejla, merci pour tes réponses à chacune de mes questions en ton implication pour la formation des internes.

M^{me} Lion, merci de m'avoir transmis votre goût pour la bactériologie.

M^{me} Conroy, votre œil expert n'a laissé aucune chance aux souches de SARM LPV de rester anonymes.

A l'équipe du P^r Jarlier qui m'a donné l'opportunité de travailler sur les BLSE.

Une grande pensée pour :

Mes parents :

A mon papa qui m'a transmis le virus de la biologie.

A ma maman qui m'a toujours encouragé tout au long de mon parcours.

Mon frère et ma sœur :

Jérôme, je te souhaite plein de réussite pour ta vie professionnelle.

Sibylle, sache que notre virus est très contagieux...

Mes grands-parents.

M. et M^{me} Thouvenot :

M. Thouvenot, j'attends avec impatience notre prochain « semi ».

M^{me} Thouvenot, j'attends avec impatience votre prochaine tarte Tatin.

A Françoise.

Aux techniciens et techniciennes que j'ai rencontré tout au long de mon parcours, en particulier l'équipe de Neufchâteau et de la bactériologie de Nancy.

A tous mes amis et en particulier Esther, Catherine et Bénédicte.

A Thomas,

Nous sommes partis au triple galop dans la vie, les obstacles ont été bien franchis ! A quelques mois de notre OUI... merci.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	1
ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION.....	4
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
I. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG)	6
I. 1. Généralités	6
I. 1. 1. Habitat et transmission.....	6
I. 1. 2. Pouvoir pathogène des entérocoques	7
I. 1. 3. Sensibilité aux antibiotiques	8
I. 1. 4. La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques.....	8
I. 1. 5. Résistance aux glycopeptides chez les autres bactéries.....	14
I. 2. Epidémiologie	15
I. 2. 1. Les facteurs de risque.....	15
I. 2. 2. Situation dans le monde	16
I. 2. 3. Situation en France	18
I. 2. 4. Situation en Lorraine.....	21
I. 3. La problématique	23
I. 4. Diagnostic au laboratoire	24
I. 4. 1. Les méthodes phénotypiques	25
I. 4. 2. Les méthodes génotypiques	27
II. Les SARM producteurs de la leucocidine de Panton-Valentine (SARM LPV)	28
II. 1. Généralités	28
II. 1. 1. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
II. 1. 2. <i>S. aureus</i> producteurs de LPV	32
II. 1. 3. Le SARM communautaire.....	36
II. 2. Epidémiologie.....	38
II. 2. 1. Facteurs de risque d'infections à SARM LPV	38
II. 2. 2. Situation dans le monde.....	39
II. 2. 3. Situation en France	39
II. 3. La problématique	41
II. 4. Diagnostic au laboratoire.....	41
II. 4. 1. Les méthodes phénotypiques.....	41
II. 4. 2. Les méthodes génotypiques.....	42
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	43
MATERIEL ET METHODES	44
I. Souches bactériennes étudiées	44
I. 1. Souches suspectes d'être des ERG	44
I. 1. 1. Souches isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique	44
I. 1. 2. Souches isolées à partir de prélèvements à visée épidémiologique.....	44
I. 2. Souches suspectes d'être des SARM LPV.....	48
I. 2. 1. Souches isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique	48
I. 2. 2. Souches isolées à partir de prélèvements à visée épidémiologique.....	48
II. PCR-hybridation.....	48
II. 1. Extraction.....	49
II. 2. Amplification.....	49

II. 3. Hybridation	50
II. 4. Interprétation des résultats	52
RESULTATS	54
I. Détection des ERG	54
II. Détection des SARM LPV	60
DISCUSSION	67
CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE	82
ANNEXES	95

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Figure 1 : Structure chimique de la vancomycine.....	8
Figure 2 : Structure chimique de la teicoplanine.....	9
Figure 3 : Interaction de la vancomycine avec le dipeptide terminal du peptidoglycane	10
Figure 4 : Structure du transposon Tn1546 et rôles de ses composants.....	12
Figure 5 : Etapes de la synthèse du peptidoglycane chez un entérocoque sensible aux glycopeptides (A) et chez un entérocoque VanA (B)	13
Figure 6 : Effets des antibiotiques (administration IV ou orale) sur la densité d'ERG dans les selles de patients colonisés	15
Figure 7 : Evolution du taux des ERG responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis de 1989 à 2003.....	16
Figure 8 : Proportion de <i>E. faecium</i> résistants aux glycopeptides responsables d'infections invasives en Europe en 2006 (gauche) et 2007 (droite).....	17
Figure 9 : Nombre de signalements d'ERG par mois en France, janvier 2003-juin 2008	18
Figure 10 : Evolution géographique du nombre de <i>E. faecium</i> résistants aux glycopeptides en France, 2001-2008.....	20
Figure 11 : Répartition et diffusion des clones de <i>E. faecium vanA</i> ou <i>vanB</i> en France (identifiés par ECP).....	21
Figure 12 : Cartographie des 36 établissements lorrains concernés par l'ERG, hors CHU de Nancy, France, au 31 juillet 2008	22
Figure 13 : Nombre de nouveaux cas de colonisations/infections à ERG découverts chaque mois au CHU de Nancy d'octobre 2004 à juillet 2008	23
Figure 14 : Mécanismes conduisant à la prolifération des BMR	24
Figure 15 : Relation entre la probabilité de détection d'ERG par la mise en culture d'un écouvillon rectal et la densité d'ERG dans les selles	25
Figure 16 : Méthodes de révélation du produit de PCR amplifié.....	27
Figure 17 : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> régulés par le système <i>agr</i>	31
Figure 18 : Structure schématique des SCCmec de type I à V	32
Figure 19 : Modèle hypothétique de l'apparition des SARM LPV.....	33
Figure 20 : Modèle du mécanisme d'apoptose et de nécrose tissulaire induit par la LPV	34
Figure 21 : Distribution des SARM communautaires et hospitaliers en fonction de l'âge.....	38
Figure 22 : Incidence des SARM communautaires en fonction de l'âge et de la race.....	38
Figure 23 : Comparaison des pulsotypes (ECP) de SARM, de SASM LPV et de SARM LPV isolés en France	40
Figure 24 : Aspect caractéristique de <i>E. faecium</i> (gauche) et de <i>E. faecalis</i> (droit) sur gélose ChromID VRE®	45
Figure 25 : Conduite à tenir n°1 face à des colonies bleu-vertes et violettes.....	46
Figure 26 : Conduite à tenir n°2 face à des colonies bleu-vertes et violettes.....	47
Figure 27 : Appareil d'hybridation automatique GT-Blot 48®	50
Figure 28 : Etapes d'hybridation et de révélation des produits de la PCR.....	52
Figure 29 : Matrice pour le test GenoType® Enterococcus (gauche) et pour le test GenoType® MRSA (droite).....	52
Figure 30 : Exemples illustrant les 4 catégories de résultats.....	54

Figure 31 : Répartition chronologique des résultats obtenus par l'analyse par PCR-hybridation des 276 souches suspectes d'être des ERG.....	55
Figure 32 : ECP des souches de <i>E. faecium vanA</i> sensibles à l'ampicilline	57
Figure 33 : Aspect morphologique de levures sur ChromID VRE®	59
Figure 34 : Aspects morphologiques d'un BGN associé à un <i>E. faecium</i> sur ChromID VRE®	59
Figure 35 : ECP des souches de SARM LPV isolées chez M ^{elle} B.	62
Figure 36 : Etapes du suivi de M ^{me} C et de sa famille avant et après l'accouchement.....	64
Figure 37 : ECP des souches de SARM LPV isolées chez M ^{me} C et son enfant	65
Figure 38 : Dépistages rectaux des ERG isolés chez M ^{me} H et leurs antibiogrammes.	74
Figure 39 : Evolution de la fréquence annuelle d'isolement des SARM suspects d'être producteurs de LPV au CHU de Nancy de 2005 à 2008.....	75

Tableaux :

Tableau 1 : La résistance aux glycopeptides chez les bactéries à Gram positif.....	11
Tableau 2 : Fréquence d'isolement des ERG responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis entre 1989 et 2003	16
Tableau 3 : Milieux sélectifs pour le dépistage d'ERG	25
Tableau 4 : Caractères d'identification de <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> et <i>E. casseliflavus</i>	26
Tableau 5 : Diversité des définitions d'une infection communautaire à SARM dans la littérature	37
Tableau 6 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des SARM LPV isolés en France entre mai et octobre 2008	40
Tableau 7 : Profils d'amplification et durées des PCR-hybridations	50
Tableau 8 : Résultats obtenus par l'analyse par PCR-hybridation des souches suspectes d'être des ERG	55
Tableau 9 : Caractéristiques démographiques, cliniques et épidémiologique des patients infectés par des souches de SARM LPV présentant ou non un antibiotype caractéristique du clone ST80	60
Tableau 10 : Sensibilité aux antibiotiques des 10 souches de SARM LPV positives.....	61
Tableau 11 : Sensibilité aux antibiotiques des 4 souches de <i>S. aureus</i> LPV négatives	61
Tableau 12 : Caractéristiques démographiques et cliniques des patients infectés par des souches de <i>S. aureus</i> LPV négatives	61
Tableau 13 : Résultats des prélèvements à visée épidémiologique réalisés chez 4 patients infectés par un SARM LPV	62
Tableau 14 : Antibiogrammes des différents SARM LPV isolés chez M ^{me} C.....	63
Tableau 15 : Antibiogrammes des différents SARM LPV isolés chez M ^{me} C et son enfant ..	66
Tableau 16 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de SARM LPV isolés dans des prélèvements à visée diagnostique à Nancy et au niveau national.....	70
Tableau 17 : Prise en charge des patients infectés par un SARM LPV.....	77

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
<i>Agr</i>	« Accessory gene regulator »
BGN	Bacilles à Gram négatif
BMR	Bactéries multirésistantes
CASFM	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
CC	Zone de contrôle conjugué
CCLIN	Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
CGP	Cocci à Gram positif
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMI	Concentrations minimales inhibitrices
CNR	Centre national de référence
EARSS	« European Antimicrobial Resistance Surveillance System »
ECP	Electrophorèse en champ pulsé
ERG	Entérocoques résistants aux glycopeptides
GSV	Gélose au sang avec un disque de vancomycine de 30 µg
IgG	Immunoglobulines G
InVS	Institut de veille sanitaire
MLST	« Multilocus sequence typing »
ONERBA	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PLP	Protéines liant les pénicillines
PYR	Pyrrolidonyl arylamidase
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline
SARM LPV	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline et producteurs de la Leucocidine de Panton-Valentine
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensibles à la méticilline
SASM LPV	<i>Staphylococcus aureus</i> sensibles à la méticilline et producteurs de la Leucocidine de Panton-Valentine
SCC <i>mec</i>	« Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> »
STIC	Programme de soutien aux techniques innovantes et coûteuses
TSST-1	Toxine du choc toxique staphylococcique
UC	Zone de contrôle universel

INTRODUCTION

La maîtrise de la résistance bactérienne aux antibiotiques est une priorité de santé publique qui nécessite des actions concertées, tant en médecine de ville que dans les établissements de santé. Une bactérie est dite multirésistante aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elle n'est plus sensible qu'à un petit nombre de molécules utilisables en thérapeutique. Dans le cadre de la lutte contre les infections nosocomiales, tout établissement de santé doit mettre en œuvre une politique active de lutte contre ces BMR. Il s'agit d'une priorité nationale qui implique l'adhésion de l'ensemble de la communauté hospitalière, médicale, paramédicale et administrative. Le rôle du laboratoire de microbiologie est déterminant en particulier dans le dépistage précoce des épidémies et dans leur surveillance. En situation épidémique, l'enjeu du laboratoire est double : assurer le meilleur service tout en optimisant sa propre productivité.

Nous nous sommes intéressés au diagnostic génotypique de deux modèles de BMR très différents : les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) et les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) producteurs d'une toxine nécrosante.

Les ERG sont des germes peu virulents qui causent depuis plusieurs années des épidémies hospitalières, en particulier aux Etats-Unis et dans plusieurs pays d'Europe. En France en 2007, la proportion de résistance à la vancomycine dans l'espèce *Enterococcus faecium* restait inférieure à 2% et la prévalence des infections nosocomiales à ERG en 2006 était inférieure à 0,01%. Cependant l'émergence des souches d'ERG paraît imprévisible. Tous les établissements peuvent être concernés par ce risque, d'où l'importance d'être vigilant et d'agir rapidement dès l'apparition d'un premier cas.

Depuis quelques années, nous assistons à l'émergence de souches de SARM d'origine communautaire, productrices d'une toxine nécrosante leur conférant un pouvoir pathogène particulier, la leucocidine de Pantone-Valentine (LPV). Ces souches provoquent des épidémies d'infections cutanées et de pneumopathies nécrosantes aux Etats-Unis, en Australie et dans quelques pays d'Europe du Nord. En France, les SARM LPV représentaient un peu moins de 1% de l'ensemble des souches de SARM isolées dans les hôpitaux entre 2001 et 2003 [1] et près de 1,6 % des souches isolées en 2008 [2]. Une fois introduits à l'hôpital par des malades infectés hospitalisés ou consultants, les SARM LPV sont à même de diffuser sous forme épidémique dans les hôpitaux.

Les sources de SARM et d'ERG sont à la fois la flore du patient (infection endogène), celle acquise d'un autre patient (transmission croisée) ou celle d'objets récemment contaminés par une source humaine (contamination par l'environnement). Afin de mettre en place rapidement des mesures de prévention de la diffusion épidémique des ERG et des SARM LPV, il faut pouvoir identifier rapidement les souches en cause [3]. Si aucun isolement probabiliste n'a été mis en place, le délai nécessaire au laboratoire pour diagnostiquer ces germes représente une fenêtre qui peut permettre au germe de disséminer. En cas d'isolement probabiliste, la durée de cet isolement peut être réduite pour les patients non porteurs, limitant ainsi les frais d'hospitalisation et allégeant la prise en charge du patient.

De nombreuses techniques sont actuellement disponibles pour détecter ces BMR et nous assistons depuis quelques années à la commercialisation de méthodes génotypiques permettant un diagnostic rapide [4]. Dans le cadre d'un programme national de Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses (STIC), nous avons participé à l'étude d'une nouvelle méthode génétique de diagnostic rapide de ces deux BMR : la PCR-hybridation (Genotype® Hain Lifescience). Ce programme avait pour objectifs de mettre en place cette technologie récemment mise au point dans une cohorte d'hôpitaux universitaires et d'évaluer le bénéfice de l'application de cette technologie en routine par comparaison aux autres méthodes diagnostiques utilisées.

Après avoir présenté une synthèse de la littérature concernant ces deux BMR, nous décrirons la mise en place de l'étude, le recueil des données et l'analyse des résultats obtenus. Ces derniers seront discutés afin d'évaluer la place de cette technologie innovante en routine par comparaison aux techniques existantes (méthodes phénotypiques et génotypiques), tant au niveau pratique qu'au niveau médico-économique.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG)

I. 1. Généralités [5]

Le terme “entérocoque” a été initialement utilisé par Thiercelin dans une publication de 1899 pour souligner l’origine intestinale de ces cocci à Gram positif (CGP) autrefois décrits en tant que streptocoques fécaux. Les entérocoques appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*, famille qui regroupe l’ensemble des CGP dépourvus de catalase. Organismes anaérobies aéro-tolérants, ils se distinguent des streptocoques par leur croissance dans des conditions hostiles de culture et par la structure originale de leur peptidoglycane. Le genre *Enterococcus* inclut actuellement 35 espèces, parmi elles les plus fréquemment rencontrées sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Bactéries commensales, les entérocoques sont avant tout des pathogènes opportunistes dont l’implication dans les infections nosocomiales a augmenté du fait du progrès des techniques médicales et des traitements (prothèses, chimiothérapie, immunosuppresseurs) à l’hôpital.

I. 1. 1. Habitat et transmission

Les entérocoques appartiennent à la flore normale de l’intestin de l’homme et des animaux (10^6 à 10^8 UFC/g de selles). Ils peuvent également coloniser la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin et la région périnéale.

La transmission des entérocoques se fait principalement par manuportage [6]. Dans l’étude de Bonilla et al., des entérocoques ont été retrouvés sur les mains de 13 à 41 % des soignants s’occupant de patients colonisés. La survie y a été estimée à plus de 30 min après la contamination [7]. Plus rarement, cette transmission a lieu par l’intermédiaire de l’environnement (via les surfaces contaminées, le matériel médical ou le linge souillé...) car les entérocoques ont la capacité de survivre plusieurs semaines à plusieurs mois dans l’environnement [8-10]. Cette transmission est facilitée par la diarrhée, l’incontinence fécale et les suppurations [11]. Enfin, plus exceptionnellement, une transmission via l’eau et les aliments a été décrite [12].

La colonisation intestinale par l'ERG peut persister un à plusieurs mois. Certains patients peuvent éliminer spontanément leur portage intestinal en quelques semaines tandis que d'autres, après avoir été dépistés négatifs, peuvent se recoloniser [11, 13-15]. L'utilisation de techniques de typage moléculaire a permis d'observer que cette recolonisation peut être due soit à la même souche, soit à une souche nouvellement acquise [16]. Ainsi, l'hospitalisation de patients porteurs d'ERG nécessite, en plus des précautions « standards », la mise en place de précautions complémentaires de type « contact » afin de limiter une éventuelle transmission lors de chaque séjour hospitalier [15]. La dissémination clonale des ERG serait le facteur majeur d'endémicité, tandis que le transfert de gènes de résistance d'une souche sensible à une souche résistante resterait secondaire [17].

I. 1. 2. Pouvoir pathogène des entérocoques

Les infections à entérocoques sont essentiellement dues à *E. faecalis* (80 à 90% des cas) et à *E. faecium* (5 à 10% des cas). Il s'agit principalement d'infections urinaires, de bactériémies et d'endocardites (4^{ème} étiologie bactérienne). Les entérocoques peuvent également être à l'origine d'infections abdomino-pelviennes, de surinfections de plaies cutanées, d'infections des tissus mous et d'infections broncho-pulmonaires. Le risque de développer une infection est augmenté en cas de grossesse, de diabète ou d'immunodépression. Le plus souvent, une procédure invasive (sondage urinaire, endoscopie) est à l'origine de la bactériémie.

Le pouvoir pathogène des entérocoques reste discuté. Des études expérimentales, menées chez plusieurs modèles animaux, ont démontré la faible pathogénicité des entérocoques par rapport à celle des staphylocoques, des entérobactéries ou des bacilles pyocyaniques. Schmitt et al. ont estimé qu'au moins un tiers des souches isolées au laboratoire correspondait à une colonisation plutôt qu'à une infection symptomatique [18].

La capacité naturelle des entérocoques de rapidement acquérir, accumuler et partager des éléments extra-chromosomiques, codant des facteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques, leur donne un avantage au niveau de leur survie en conditions hostiles. Divers facteurs de virulence permettent l'adhérence aux cellules, la formation de lésions tissulaires (cytolysine) et la modulation de la réponse inflammatoire locale (acides lipoteichoïques et superoxydes) [19]. L'ensemble de ces facteurs explique leur importance croissante en tant que pathogènes nosocomiaux.

I. 1. 3. Sensibilité aux antibiotiques

Les entérocoques occupent aujourd'hui une place importante en pathologie et posent des problèmes thérapeutiques du fait de leur sensibilité médiocre aux β -lactamines (PLP5 de faible affinité) et de leur résistance de bas niveau aux aminosides. Ces résistances nécessitent l'association synergique d'une β -lactamine et d'un aminoside. Ces bactéries sont naturellement résistantes aux céphalosporines et à de nombreux antibiotiques tels que le chloramphénicol, les tétracyclines, la rifampicine et les fluoroquinolones. Les entérocoques sont naturellement sensibles aux glycopeptides qui sont réservés aux patients allergiques aux β -lactamines ou à ceux infectés par des souches présentant des hauts niveaux de résistance aux β -lactamines et aux aminosides. Cependant, une résistance naturelle à bas niveau à la vancomycine est observée chez les espèces *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus flavescens*.

I. 1. 4. La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques

- Structure et mode d'action des glycopeptides

Les glycopeptides sont des molécules polycycliques volumineuses, hydrophobes et rigides qui présentent une structure tridimensionnelle en forme de poche (Figures 1 et 2).

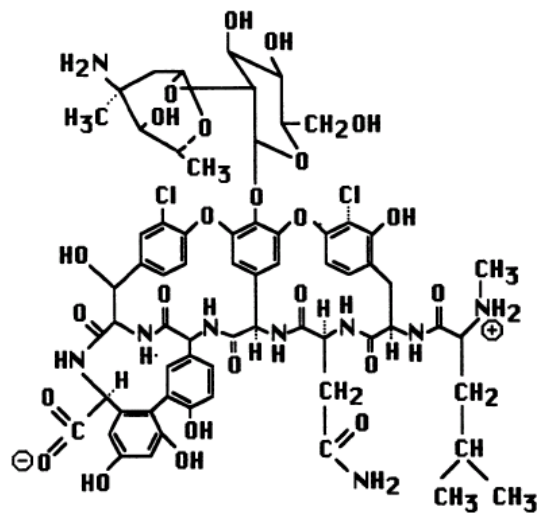


Figure 1 : Structure chimique de la vancomycine [20]

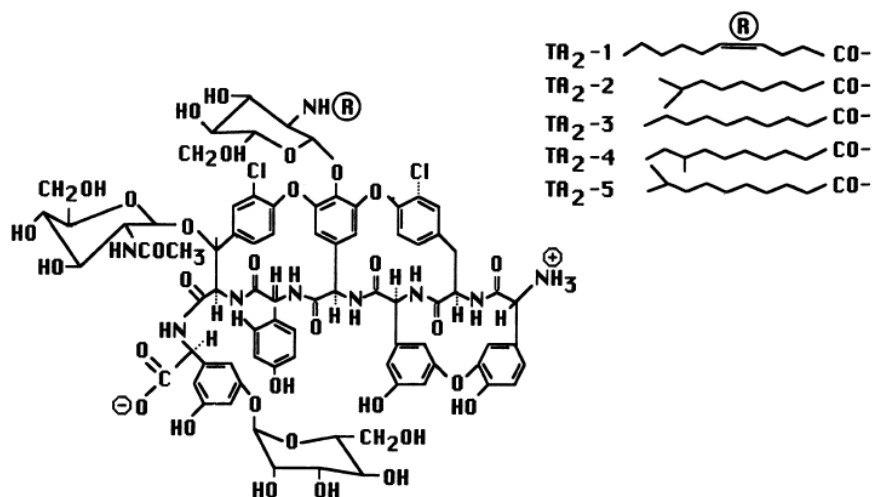


Figure 2 : Structure chimique de la teicoplanine [20]

La vancomycine a été isolée en 1954 dans un échantillon de sol de Bornéo et *Amycolatopsis orientalis*, un streptomycète tellurique, a été identifié comme étant à l'origine de la synthèse de cette molécule. Le second glycopeptide actuellement utilisé en médecine humaine, la teicoplanine, est produit par *Actinoplanes teichomyceticus*. Ces antibiotiques ont rapidement trouvé leur place du fait de leur efficacité sur les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, émergents dans les années soixante à l'hôpital [21]. En France, ces deux molécules sont des antibiotiques à prescription exclusivement hospitalière. Une troisième molécule, l'avoparcine, a été largement utilisée en Europe de 1975 à 1997 en tant que facteur de croissance dans l'alimentation animale. Il est intéressant de noter que la teicoplanine n'a pas d'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et que l'avoparcine n'a pas été utilisée chez l'animal.

Les glycopeptides agissent en se liant à la chaîne pentapeptidique (D-alanyl-D-alanine terminal) du peptidoglycane qui est le constituant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif (Figure 3). Cette liaison irréversible masque le site d'action des transpeptidases impliquées dans la synthèse normale de la paroi. L'arrêt de la synthèse du peptidoglycane entraîne une déstructuration de la paroi et conduit à la lyse de la bactérie [22]. Les glycopeptides, du fait de leur taille, ne peuvent pas traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui explique qu'ils soient inactifs sur ces bactéries.

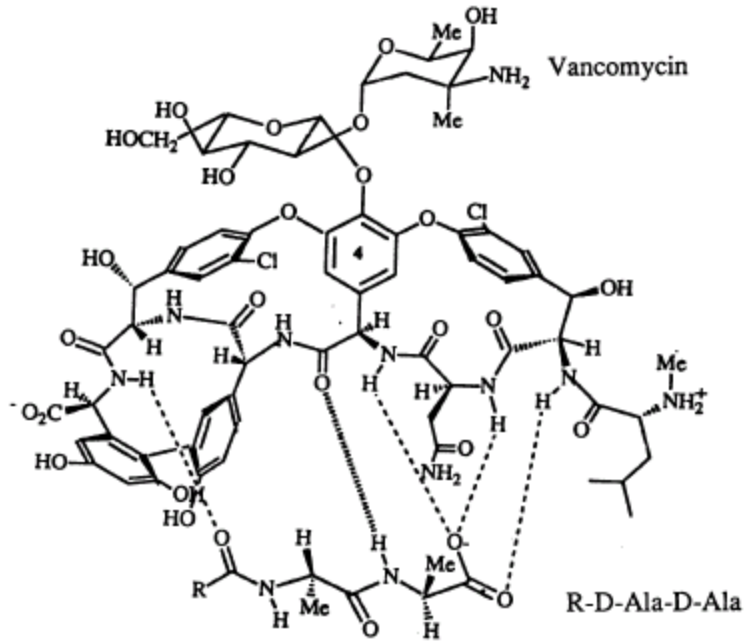


Figure 3 : Interaction de la vancomycine avec le dipeptide terminal du peptidoglycane [23]

- Mécanismes de la résistance aux glycopeptides

Le mécanisme de résistance est basé sur une mutation de la cible des glycopeptides [21]. Cette résistance est due à l'acquisition par la bactérie d'un opéron de gènes au niveau plasmidique ou chromosomique. Cet opéron code des enzymes impliquées à la fois dans la synthèse d'un précurseur du peptidoglycane de faible affinité et dans l'élimination du précurseur D-alanyl-D-alanine de haute affinité normalement synthétisé.

Cette résistance est phénotypiquement et génotypiquement hétérogène (Tableau 1). Les principaux phénotypes rencontrés sont les phénotypes acquis VanA et VanB et le phénotype naturel VanC. D'autres gènes sont responsables de la résistance aux glycopeptides mais restent anecdotiques (*vanD*, *vanE*, *vanF* et *vanG*), ils ne sont donc pas recherchés en routine.

Tableau 1 : La résistance aux glycopeptides chez les bactéries à Gram positif [24]

Resistance	Acquired						Intrinsic	
	High level	Variable level	Moderate level		Low level		Low level	High level
Type	VanA	VanB1/B2/B3	VanD	VanF	VanG	VanE	VanC1/C2/C3	Not applicable
MIC (mg/L)								
Vancomycin	64 -1000	4 -1000	64 -128	8	16	8-32	2 -32	≥1000
Teicoplanin	16 -512	0.5 -1	4 - 64	< 1	0.5	0.5	0.5 -1	≥256
Conjugation	+	+	-	Not reported	+	-	-	-
Mobile element	Tn1546	Tn1547 Tn1549-Tn5382	Unkown	Not reported	Unkown	Unkown	Not applicable	Not applicable
Species	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i> <i>S. aureus</i> <i>B. circulans</i> <i>P. apiarius</i> <i>P. thiaminolyticus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. bovis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>B. popillae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i>
Expression		Inducible	Constitutive	Not reported		Inducible	Constitutive Inducible	Constitutive
Location		Plasmid Chromosome	Chromosome	Not reported		Chromosome	Chromosome	Chromosome
Modified target		▼ D-Ala-D-Lac				▼ D-Ala-D-Ser		▼ D-Ala-D-Lac

- Résistance acquise de haut niveau aux glycopeptides : le phénotype VanA

Ce phénotype est le résultat de l'acquisition du transposon Tn1546 (11 kb), porté essentiellement par des plasmides autotransférables ou plus rarement par le chromosome bactérien, conduisant à une résistance de haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Il est principalement retrouvé chez *E. faecium* et *E. faecalis* mais également décrit plus occasionnellement chez d'autres entérocoques. Cet opéron est constitué d'un ensemble de neuf gènes dont trois sont essentiels à la résistance aux glycopeptides : *vanA*, *vanH* et *vanX* (Figure 4).

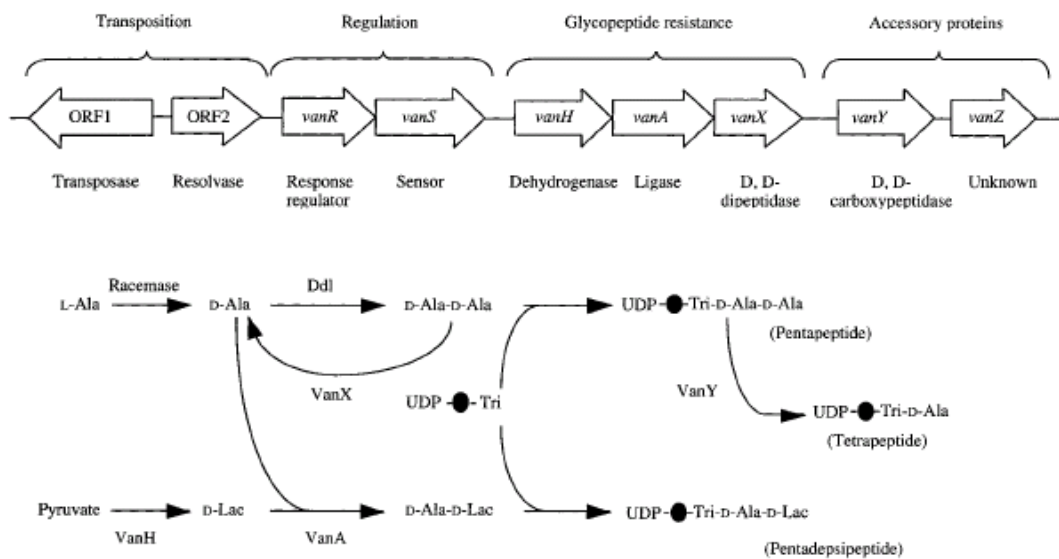


Figure 4 : Structure du transposon Tn1546 et rôles de ses composants[25]

(Ddl = D-Ala:D-Ala ligase naturelle, VanA = D-Ala:D-Lac ligase)

La protéine VanH est une déshydrogénase qui convertit le pyruvate présent dans la bactérie en D-lactate (D-Lac). Le gène *vanA* code une D-Alanine:D-Lac ligase qui relie une D-Alanine (D-Ala) au D-Lac pour former le dipeptide terminal du peptidoglycane. La protéine VanX clive les dimères de D-Ala-D-Ala synthétisés en parallèle par les ligases naturelles de la bactérie [26]. La coopération de ces trois gènes conduit à la synthèse d'un peptidoglycane d'affinité réduite pour les glycopeptides par substitution du dipeptide D-Ala-D-Ala par D-Ala-D-Lac. Cette modification se traduit par une diminution de l'affinité du glycopeptide pour sa cible d'un facteur 1 000 (Figure 5) [27].

Les régions ORF1 et ORF2 permettent la transposition de l'opéron dans le génome bactérien. Les gènes *vanR* et *vanS* constituent un système de régulation à deux composantes impliqué dans l'induction de l'expression des gènes *vanA*, *vanH* et *vanX* en présence de vancomycine ou de teicoplanine dans l'environnement de la bactérie [28]. Les protéines accessoires VanY et VanZ ne sont pas indispensables à l'expression de la résistance. VanY est une D,D-carboxypeptidase qui clive le peptide D-Ala terminal des précurseurs pentapeptidiques naturels du peptidoglycane [29]. VanZ quant à elle augmenterait modérément, sans que le mécanisme ne soit clairement élucidé, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la teicoplanine mais pas de la vancomycine [30]. Les étapes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane chez une souche sensible ou résistante (VanA) aux glycopeptides sont représentées dans la figure suivante.

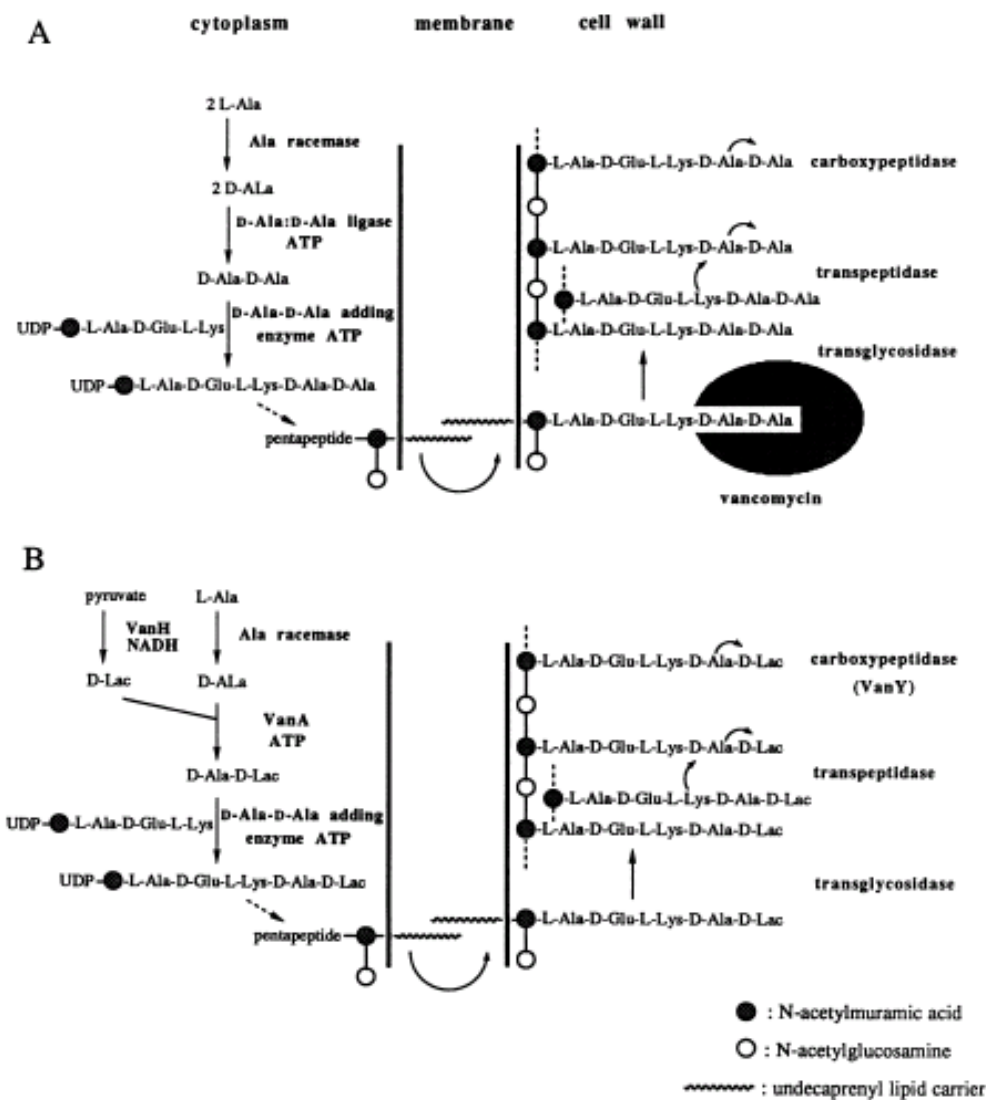


Figure 5 : Etapes de la synthèse du peptidoglycane chez un entérocoque sensible aux glycopeptides (A) et chez un entérocoque VanA (B) [23]

- Résistance acquise de niveau variable à la vancomycine : le phénotype VanB

Ce phénotype, retrouvé chez *E. faecium* et *E. faecalis*, regroupe des souches présentant un niveau de résistance à la vancomycine variable mais toujours sensibles à la teicoplanine. La ligase VanB est structurellement proche de la ligase VanA (76% d'homologies au niveau des acides aminés). L'opéron VanB est essentiellement chromosomique et peut être retrouvé sur divers transposons (Tn1547, Tn1549 ou Tn5382). Par un système de régulation identique à VanA, ce phénotype est inductible par la présence de vancomycine dans l'environnement de la bactérie [31].

- Résistance intrinsèque de bas niveau à la vancomycine : le phénotype VanC

L'opéron *vanC* est porté de façon constitutive par le chromosome bactérien des entérocoques mobiles (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*). Les gènes *vanC1*, *vanC2* et *vanC3* sont spécifiques respectivement de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens*. La ligase VanC entraîne la production d'un pentapeptide se terminant par D-Ala-D-Ser [12]. La vancomycine a une affinité 6 fois moindre pour le dipeptide D-Ala-D-Ser par rapport au D-Ala-D-Ala [27].

I. 1. 5. Résistance aux glycopeptides chez les autres bactéries

- Résistance naturelle

Une résistance à haut niveau aux glycopeptides est décrite chez *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. et *Pediococcus* spp.[31]. Le dipeptide terminal (D-Ala-D-Lac) est identique au dipeptide des entérocoques de phénotype VanA et VanB mais aucun gène de résistance de structure proche des gènes *van* n'a pu être mis en évidence chez ces espèces [32]. Une résistance intrinsèque à la vancomycine a également été décrite chez *Clostridium innocuum* en l'absence de gènes *van* [33].

- Résistance acquise

Des gènes de résistance aux glycopeptides ont été retrouvés chez d'autres espèces que des entérocoques. Ainsi, moins d'une dizaine de cas de *S. aureus* porteurs de *vanA* ont été rapportés dans le monde [34-38]. D'autre part le gène *vanA* a été trouvé chez une souche de *Bacillus circulans* [39], chez des souches de *Paenibacillus* spp. [40] et chez des souches d'*Oerskovia turbata* et de *Corynebacterium haemolyticum* [41]. Concernant *vanB*, diverses espèces de streptocoques ont été découvertes porteuses telles que *Streptococcus bovis*,

S. gallolyticus et *S. lutetiensis* isolés dans des selles [42-44]. D'autre part, un réservoir de gènes *vanB* chez les bactéries anaérobies commensales du tube digestif a été décrit, ce gène a été plus fréquemment isolé chez *Clostridium* spp. [45-48].

I. 2. Epidémiologie

I. 2. 1. Les facteurs de risque

Les nombreux facteurs de risque de colonisation ou d'infection à ERG ont été largement analysés. Ils incluent :

- la durée de séjour en milieu hospitalier (supérieure à 15 jours) ou les hospitalisations multiples.
- l'administration prolongée d'antibiotiques tels que les glycopeptides, les céphalosporines de troisième génération, le métronidazole, les fluoroquinolones ou les carbapénèmes. Ces antibiotiques sont connus pour entraîner un déséquilibre de la flore digestive et exercer une pression de sélection sur les entérocoques favorisant la sélection d'ERG (Figure 6) [49-51].

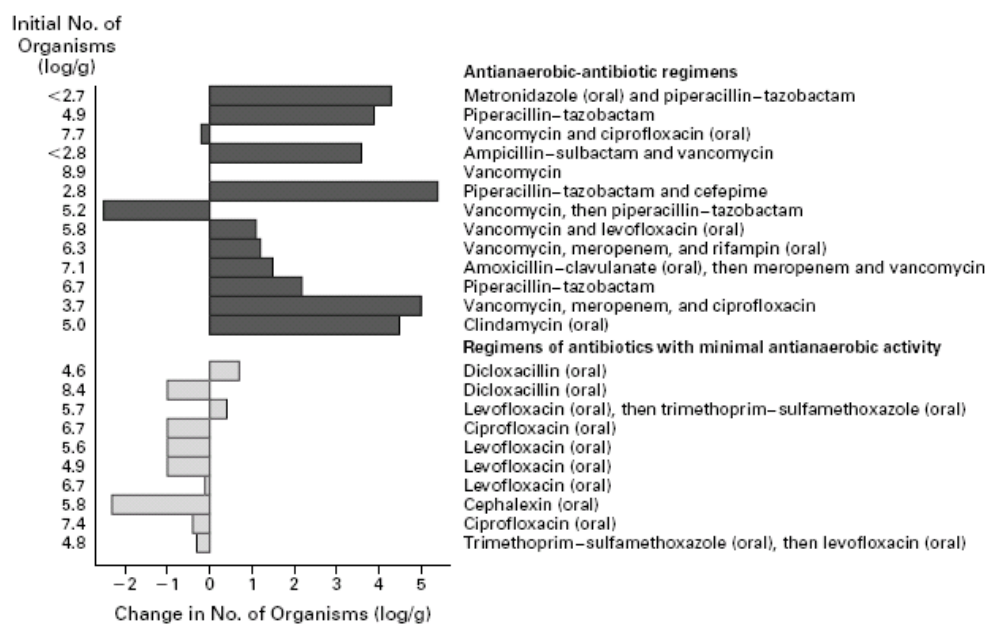


Figure 6 : Effets des antibiotiques (administration IV ou orale) sur la densité d'ERG dans les selles de patients colonisés [51]

- une maladie sévère sous-jacente (insuffisance rénale, cancer, diabète).
- des interventions instrumentales invasives (hémodialyse, sonde urinaire, présence de cathéter central...).
- la proximité avec un patient porteur ou le partage du même personnel de soins [11].

Ainsi les services les plus concernés sont en général la néphrologie-hémodialyse, la réanimation, l'hémo-cancérologie, la gastro-entérologie, la transplantation d'organes et la gériatrie.

I. 2. 2. Situation dans le monde

Aux Etats-Unis, une augmentation spectaculaire de l'incidence de la résistance a été observée. Depuis la première description de souches d'ERG en 1989-90, une diffusion continue a abouti à une situation endémique dans les hôpitaux (Tableau 2).

Tableau 2 : Fréquence d'isolement des ERG responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis entre 1989 et 2003 [52-55]

Année	1989	1993	2000	2003
Tous services confondus	0.3%	7.9%	ND	ND
Unités de soins intensifs	0.4%	13.6%	26.3%	28,5%

(ND = non disponible)

Aujourd'hui les ERG occupent le 3^{ème} rang des BMR isolées chez des patients hospitalisés en réanimation. Avec quelques années de décalage, l'évolution a été identique dans les autres services de soins (Figure 7).

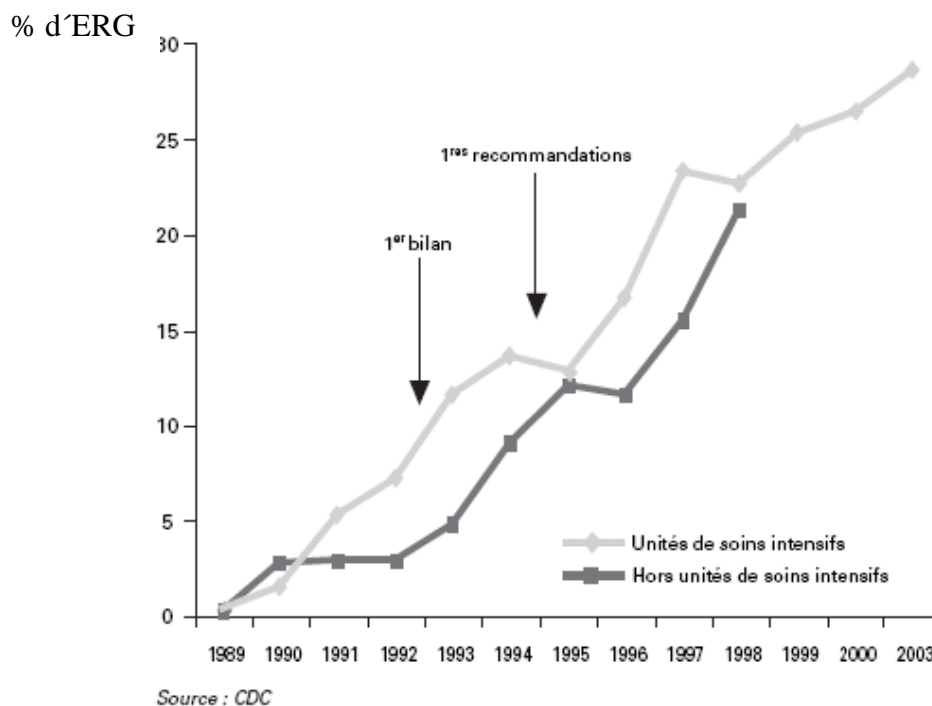


Figure 7 : Evolution du taux des ERG responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis de 1989 à 2003 [55]

L'émergence des ERG aux États-Unis semble être due à une utilisation 5 à 10 fois plus fréquente qu'en Europe de la vancomycine, notamment sous forme orale non absorbable pour le traitement présomptif ou curatif des infections digestives à *Clostridium difficile* [56]. Une fois cette résistance acquise, la transmission horizontale, manuportée entre patients ou à partir de l'environnement, a permis la diffusion épidémique des souches d'ERG [57]. L'échec du contrôle de ces souches aux États-Unis est attribué à la diffusion trop tardive de recommandations et à la difficulté de les appliquer uniformément dans tous les établissements [58].

En Europe, les données du réseau de surveillance des résistances bactériennes (EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System) montrent une augmentation du nombre d'ERG depuis 2001, avec néanmoins une évolution contrastée selon les pays. En 2006-2007, la proportion de *E. faecium* résistants aux glycopeptides, isolés de bactériémies, est supérieure à 25% dans plusieurs pays (Irlande, Portugal et Grèce) mais reste faible, inférieure à 1% dans d'autres pays comme les pays scandinaves (Figure 8) [59, 60].

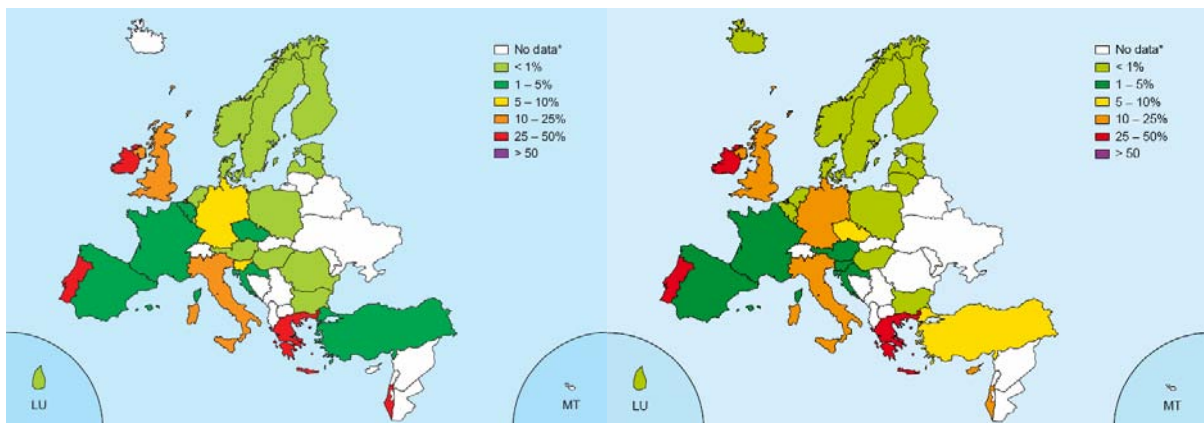


Figure 8 : Proportion de *E. faecium* résistants aux glycopeptides responsables d'infections invasives en Europe en 2006 (gauche) et 2007 (droite) [59, 60]

Cette dissémination des ERG en Europe pourrait être expliquée par une transmission via la chaîne alimentaire. En effet, les premiers ERG ont été isolés chez des personnes en bonne santé, des animaux fermiers (cochons et poules), des animaux domestiques (chiens) et dans l'environnement. Des études ont montré que les entérocoques isolés chez l'homme et chez l'animal partagent le même "pool" de gènes de résistance [61, 62]. Cette résistance omniprésente semblerait être la conséquence de l'utilisation massive d'avoparcine (non utilisée aux États-Unis) en tant que facteur de croissance dans l'alimentation animale [63]. Après son interdiction en 1997, le portage d'ERG a diminué chez l'animal dans les pays

européens [64] tout en restant cependant détectable dans l'environnement de certains élevages de volailles [65, 66].

I. 2. 3. Situation en France

Les premières souches d'entérocoques *vanA* ont été isolées en 1986 en France (cas isolés) [67]. Des études datant de la fin des années 90 ont montré qu'en milieu extra-hospitalier 2 à 9% des sujets sains hébergeaient des ERG au niveau intestinal. Ainsi, en France, et contrairement à ce qui était observé au même moment aux Etats-Unis, on notait que les ERG étaient surtout détectés dans les selles de sujets sains en milieu communautaire et rarement responsables d'épidémies hospitalières [68, 69]. Jusqu'en 2003, la proportion des ERG isolés en milieu hospitalier est restée stable : comprise entre 1 et 2% chez *E. faecium* et inférieure à 0,5% chez *E. faecalis*. En 2004, l'Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) a noté une augmentation du taux de résistance aux glycopeptides chez *E. faecium* (supérieur à 5%). Le nombre croissant de signalements d'ERG correspondait à des cas groupés d'infections et de colonisations avec des épidémies d'ampleur inhabituelle rapportées dans plusieurs établissements de santé [55]. Dès lors, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) mettait en place un renforcement de la vigilance et des recommandations de contrôle. Une enquête nationale a étudié le portage digestif dans les établissements de santé et a révélé que seul 0,3 % de l'ensemble des patients dépistés (n=3 939) au cours de l'enquête étaient porteurs d'ERG [70]. En 2007, le nombre de signalements a plus que triplé par rapport à 2005 et 2006 (Figure 9).

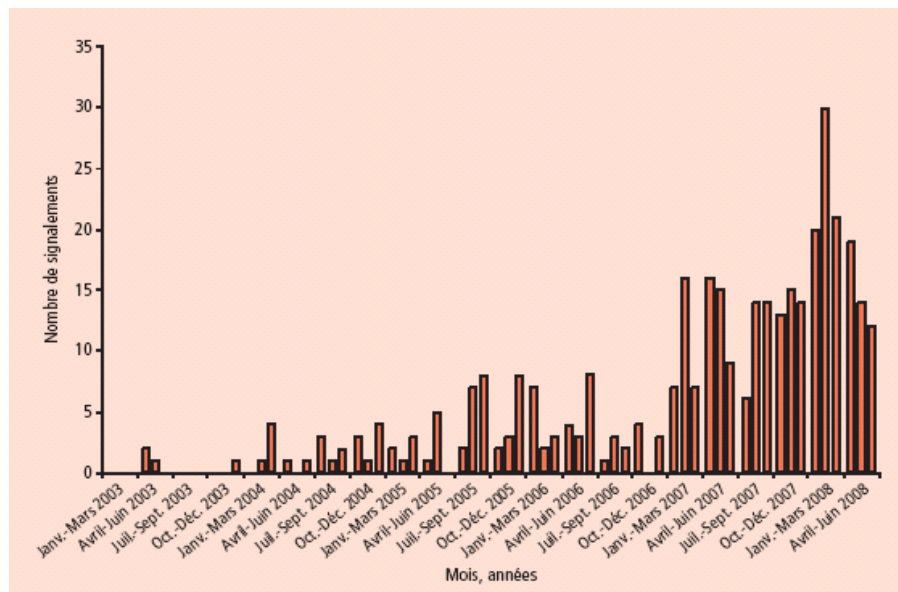
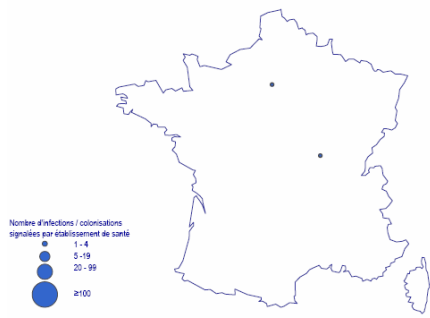


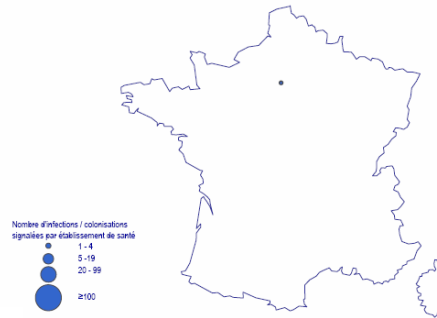
Figure 9 : Nombre de signalements d'ERG par mois en France, janvier 2003-juin 2008 [57]

Cette augmentation reflétait d'une part l'adhésion croissante des équipes hospitalières aux recommandations de signalement et, d'autre part la survenue de plusieurs épidémies, principalement dans l'Est et le Nord de la France. Ainsi, de janvier 2001 à juin 2008, 382 signalements à ERG ont été effectués par 157 établissements de santé différents. Il s'agissait de *E. faecium* dans 341 cas (89,2 %) et de *E. faecalis* dans 29 cas (7,6 %). Au total, 13% d'infections et 87% de colonisations ont été rapportées et la prévalence des infections nosocomiales à ERG reste inférieure à 0,01% [71]. Les données démographiques suggèrent qu'il n'y a pas, à ce jour, d'épidémie nationale à ERG, mais une succession d'épidémies régionales, plus ou moins bien maîtrisées en fonction de la rapidité et de l'intensité de la mise en place des mesures de maîtrise recommandées (Figure 10).

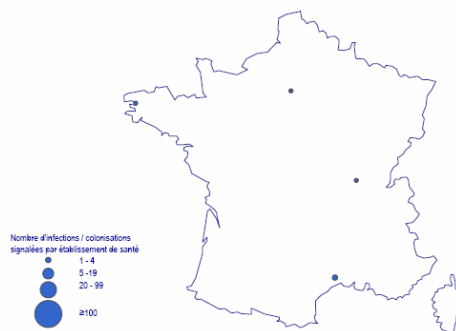
ERG (*E. faecium*), France, août – décembre 2001 (N=2)



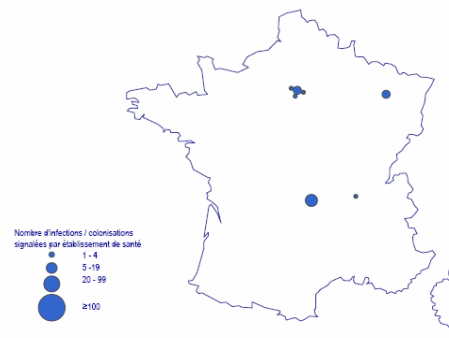
ERG (*E. faecium*), France, 2002 (N=1)



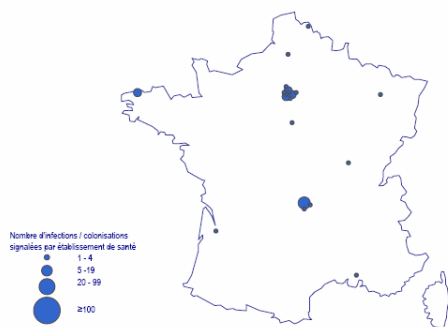
ERG (*E. faecium*), France, 2003 (N=5)



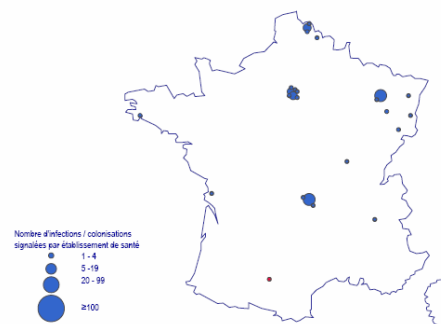
ERG (*E. faecium*), France, 2004 (N=14)



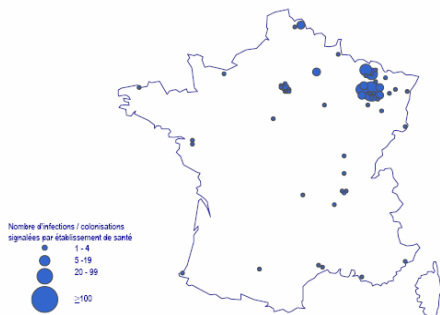
ERG (*E. faecium*), France, 2005 (N=36)



ERG (*E. faecium*), France, 2006 (N=37)



ERG (*E. faecium*), France, 2007 (N=131)



ERG (*E. faecium*), France, 1er semestre 2008 (N=115)

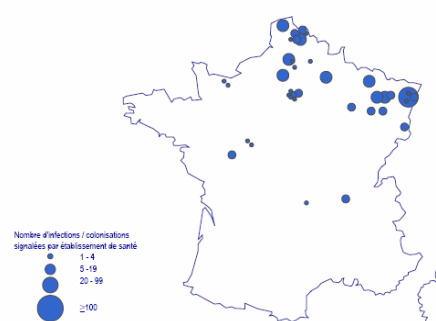


Figure 10 : Evolution géographique du nombre de *E. faecium* résistants aux glycopeptides en France, 2001-2008 [72]

La comparaison (ECP, électrophorèse en champ pulsé) des souches de *E. faecium vanA* ou *vanB* isolées dans les différents établissements a révélé que, pour chaque établissement confronté à une épidémie, il existait un petit nombre de clones majoritaires (en général 2 ou 3), différents d'un établissement à l'autre, et plusieurs clones minoritaires. Une diffusion de souches entre établissements impliqués dans la même filière de soins a cependant été observée (Figure 11).

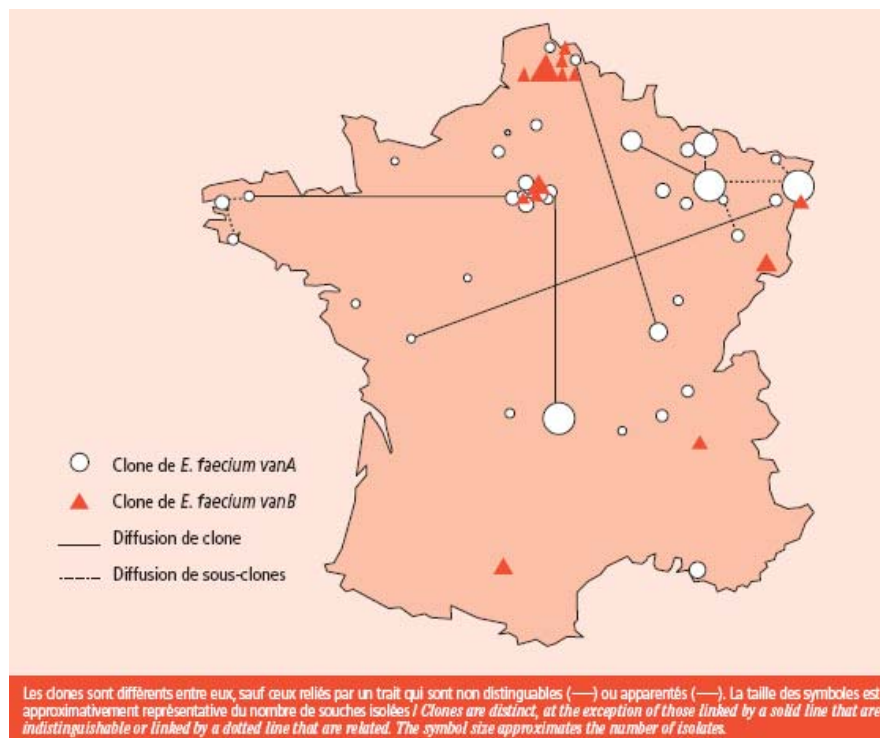


Figure 11 : Répartition et diffusion des clones de *E. faecium vanA* ou *vanB* en France (identifiés par ECP) [73]

I. 2. 4. Situation en Lorraine

Depuis la fin de l'année 2004, le centre hospitalier universitaire (CHU) de Nancy a été confronté à une épidémie de colonisation digestive à ERG. Cette épidémie a évolué en deux bouffées successives : la première (n=131) a été prise en charge avec des mesures de contrôle « classiques » (regroupement des patients positifs), alors que la seconde, plus importante (jusqu'à 40 nouveaux cas par mois), a nécessité la mise en place de secteurs de cohorting.

En 2007, une mission d'appui ministérielle a formulé plusieurs recommandations et a demandé qu'une enquête régionale de prévalence soit réalisée. En juin, cette enquête a confirmé la diffusion régionale de l'épidémie (prévalence égale à 1,8% vs 0,3% pour l'enquête ONERBA 2006) [74]. Une mission régionale ERG a alors été créée en juillet par l'Agence Régionale de l'Hospitalisation pour coordonner la lutte contre l'ERG. Les mesures

suivantes ont alors été renforcées ou mises en place au CHU de Nancy : création d'une « cellule enquête et action » pour la prise de décisions collégiales, analyse des facteurs de risque de la colonisation à ERG, mise à disposition d'une liste des patients colonisés, renforcement des mesures d'hygiène, regroupement et cohorting, gestion des patients contacts, dépistage et maîtrise de l'antibiothérapie.

Entre octobre 2004 et juillet 2008, 909 cas de colonisations ou d'infections ont été recensés en Lorraine (les infections ne concernaient que 5,4% des cas). Parmi eux, 328 patients sont décédés (36,1%) dont 2 pour lesquels le décès est probablement imputable à l'infection à ERG. De nombreux établissements lorrains sont ou ont été concernés par l'ERG (n=36) (Figure 12), avec un nombre de cas découverts par établissement qui varie de 1 à 72, sans compter le CHU au sein duquel 454 cas ont été découverts (49,9% des cas). Au début de l'année 2008, l'épidémie lorraine s'est étendue à la région Champagne-Ardenne. Elle a été rapidement maîtrisée grâce à l'implication rapide des différents acteurs responsables de l'hygiène et la mise en œuvre des mesures déjà appliquées en Lorraine.

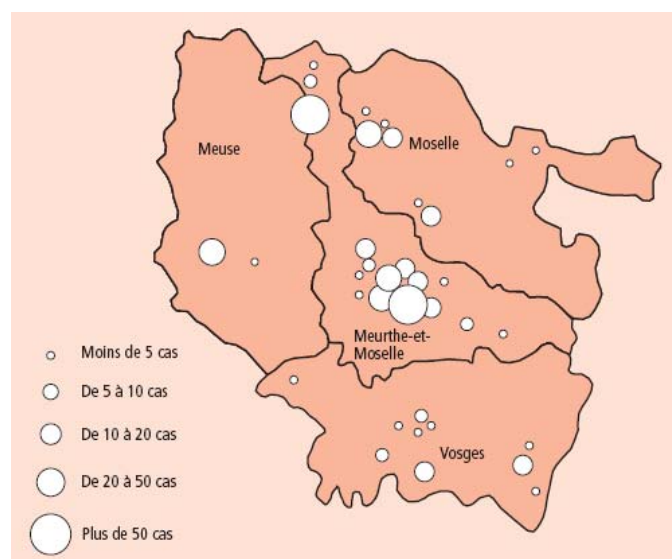


Figure 12 : Cartographie des 36 établissements lorrains concernés par l'ERG, hors CHU de Nancy, France, au 31 juillet 2008 [75]

Le nombre de nouveaux cas découverts en Lorraine a régulièrement augmenté jusqu'en janvier 2008. Puis, à partir de mars 2008, la mise en œuvre des mesures de contrôle portant leurs fruits, une maîtrise progressive de la situation a été observée (Figure 13).

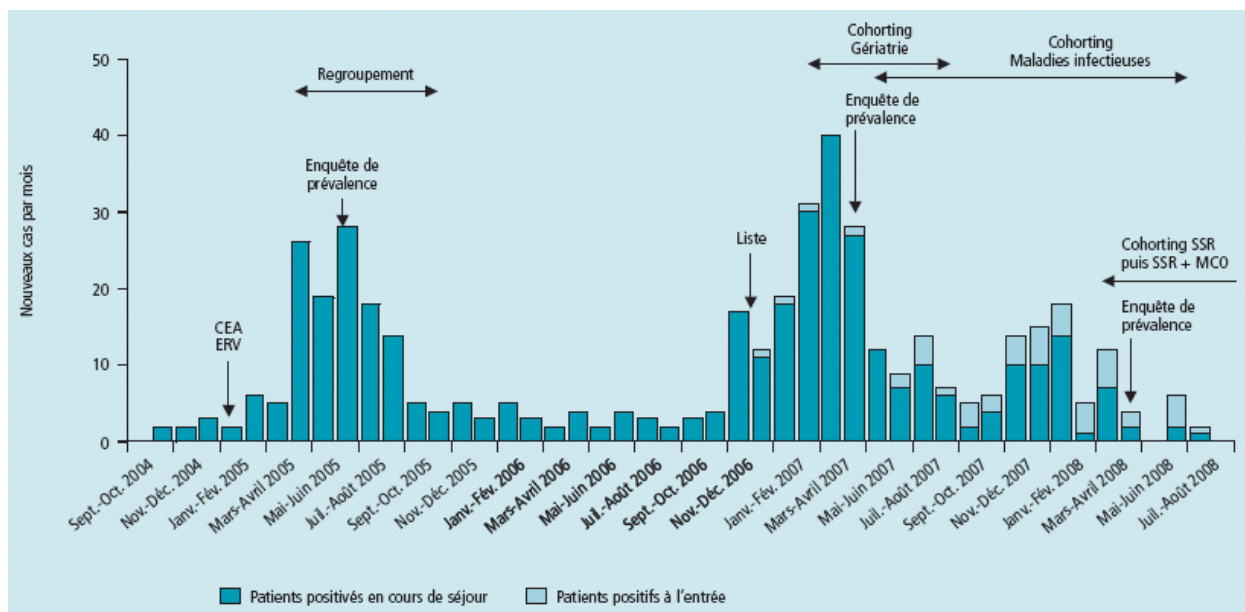


Figure 13 : Nombre de nouveaux cas de colonisations/infections à ERG découverts chaque mois au CHU de Nancy d’octobre 2004 à juillet 2008 [76]

I. 3. La problématique

La problématique posée par les ERG en terme de santé publique est double :

- l’apparition d’une résistance de haut niveau aux glycopeptides chez une bactérie à faible pouvoir pathogène, capable de coloniser rapidement les patients et l’environnement, expose au risque de constitution de réservoirs occultes et de diffusion de ces souches. Ce portage est asymptomatique et prolongé [77]. La résistance s’associe à une incidence accrue des infections nosocomiales à entérocoques et à un impact en termes de morbidité et de mortalité chez les patients bactériémiques. En effet, plusieurs études prouvent que les bactériémies à ERG présentent un excès de mortalité (sepsis sévère, choc septique) par rapport à la même infection provoquée par un germe sensible, indépendamment de la sévérité de la maladie [78-83]. Les ERG ne provoquent pas plus d’infections que les autres entérocoques mais les infections qui surviennent peuvent être plus longues et surtout plus difficiles à traiter [84]. Du fait de fréquentes résistances associées, le risque d’impasse thérapeutique est à redouter. Le mécanisme d’émergence des ERG est plurifactoriel, il suit le schéma commun à toutes les BMR (Figure 14).

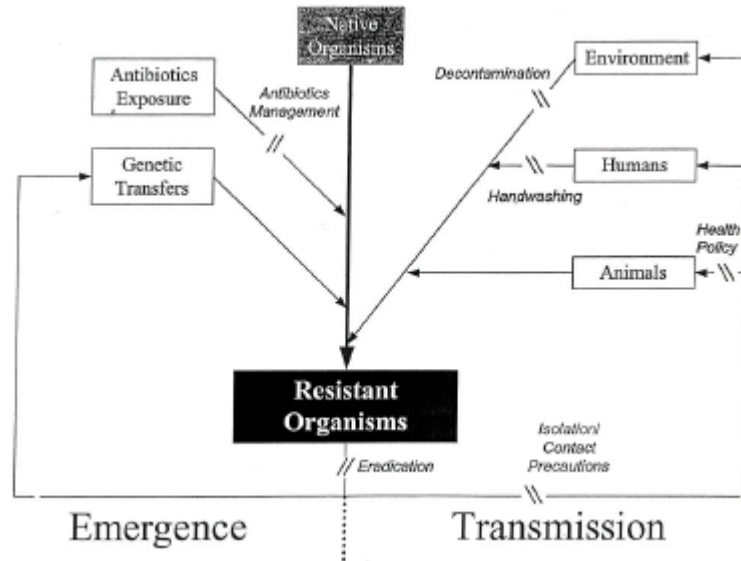


Figure 14 : Mécanismes conduisant à la prolifération des BMR [85]

- le taux élevé de staphylocoques résistants à la méticilline (SARM) dans les hôpitaux français expose, en cas de présence concomitante d'ERG, au risque de voir émerger des *S. aureus* résistants aux glycopeptides par transfert du gène de résistance *vanA*. Le caractère sporadique de ce phénomène (Etats-Unis et Japon) et le délai de 16 ans observé entre l'apparition des premiers ERG et du premier *S. aureus* porteur du gène *vanA* peuvent être expliqués par une instabilité génétique du transposon de l'ERG chez le staphylocoque (haut taux d'excision du transposon, réplication peu efficace) [86] ou par des réarrangements génétiques délétères (insertions, délétions) [87]. Ce risque de transfert ne doit cependant pas être sous-estimé car la propagation d'une telle résistance chez un germe pathogène comme *S. aureus* serait catastrophique en terme de prise en charge thérapeutique. Ainsi le diagnostic des ERG se doit d'être précoce et spécifique afin d'assurer un contrôle épidémiologique de cette BMR.

I. 4. Diagnostic au laboratoire

La détection de la présence d'une colonisation intestinale est réalisée par écouvillonnage rectal ou par coproculture. L'écouvillonnage, malgré sa moindre sensibilité (Figure 15), est plus adaptable à un dépistage de masse en cas d'épidémie [88]. Le portage est asymptomatique et prolongé, ainsi l'étude de Mascini et al. confirme qu'une série de 3 dépistages négatifs ne garantit pas l'élimination des ERG et souligne l'importance des précautions d'hygiène prolongées, particulièrement en cas d'administration d'antibiotiques [77].

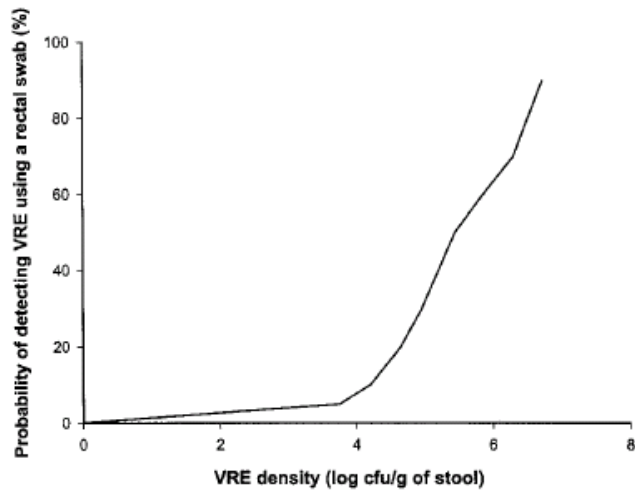


Figure 15 : Relation entre la probabilité de détection des ERG par la mise en culture d'un écouvillon rectal et la densité des ERG dans les selles [88]

Pour les prélèvements à visée diagnostique, l'ensemencement est réalisée sur milieux enrichis non sélectifs. Après incubation, une identification et un antibiogramme sont réalisés.

I. 4. 1. Les méthodes phénotypiques

- Culture sur milieux sélectifs

La flore fécale est composée de très nombreuses espèces bactériennes. Face à l'émergence des ERG, les industriels ont mis au point différents milieux sélectifs permettant l'isolement facile des entérocoques parmi cette flore. Les principaux milieux disponibles sur le marché sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Milieux sélectifs pour le dépistage d'ERG

Gélose	Fournisseur	Concentration de vancomycine	Identification directe d'espèce
BBL Enterococcosel agar [®]	BD Diagnostics	8 mg/l	non
VRE [®]	AES Chemunex	6 mg/l	non
CHROMagar VRE [®]	CHROMagar Microbiology	6 mg/l	non
ChromID VRE [®]	bioMérieux	8 mg/l	oui

Selon leur concentration en vancomycine ces milieux sont plus ou moins sélectifs. L'identification directe des espèces par ces milieux chromogènes nécessite des tests complémentaires (Cf chapitre Matériel et méthodes).

- Identification et antibiogramme

L'identification des colonies se base sur la recherche de pyrrolidonyl arylamidase (PYR) qui est spécifique de l'entérocoque et sur des tests biochimiques exploitant les caractéristiques métaboliques propres à chaque espèce. Les tests discriminants sont regroupés sous forme d'une galerie et l'identification est réalisée par comparaison du profil biochimique obtenu avec les profils d'une base de données. Un traitement statistique permet de définir la qualité de l'identification. Si le profil n'est pas satisfaisant, le système d'identification peut indiquer les tests discriminants supplémentaires à réaliser (Tableau 4).

Tableau 4: Caractères d'identification de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* [5]

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>
Mobilité	-	-	+	+
Pigmentation jaune	-	-	-	+
Résistance au tellurite de potassium	+	-	-	-
Production d'acétoïne	+	+	V	V
Hydrolyse de l'arginine	+	+	+	V
Fermentation :				
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	V
Arabinose	-	+	+	+
Raffinose	-	-	+	V
Saccharose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Méthyl- α -D-glucopyranozide	-	-	+	-
Sorbose	-	-	-	-
Présence d'antigène de Lancefield :				
Groupe D	+	V	+	+

(V = variable)

La méthode de détermination de la sensibilité aux antibiotiques peut être réalisée sur milieu solide (disques, Etest[®]) ou en milieu liquide (ex : Vitek2[®], MicroScan[®], Phoenix[®]...).

I. 4. 2. Les méthodes génotypiques

Il s'agit de méthodes basées sur l'amplification et la détection de séquences génétiques spécifiques. Dans le cadre du diagnostic d'ERG, l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des gènes *vanA* et *vanB* peut être réalisée selon les cas à partir de cultures ou directement à partir de prélèvements (le plus souvent après une phase d'enrichissement en bouillon qui permet d'éliminer les inhibiteurs de la Taq polymérase).

La visualisation de la séquence cible amplifiée est possible à l'aide des différentes méthodes présentées dans le Figure 16

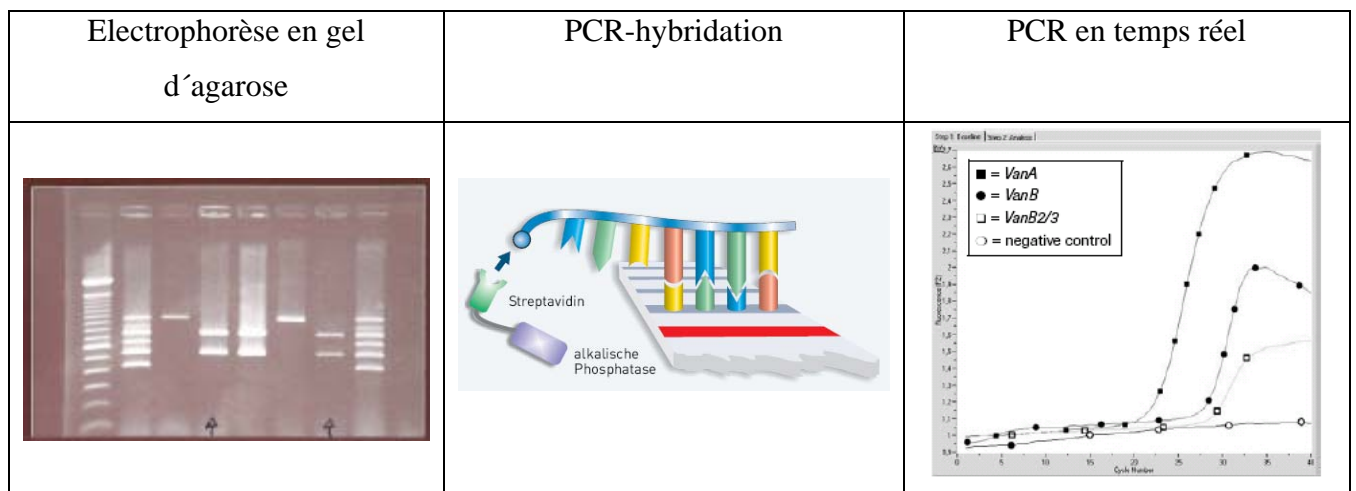


Figure 16 : Méthodes de révélation du produit de PCR amplifié

Différents systèmes de PCR en temps réel sont commercialisés comme en particulier le LC VRE Detection Kit[®]/LightCycler (Roche), le système Xpert VanA/VanB (Cepheid) ou le système BD GeneOhm VanR assay/SmartCycler (BD GeneOhm).

Le choix de la méthode par le laboratoire est fonction du contexte épidémique. Les arguments de choix seront abordés dans la partie Discussion de ce mémoire.

II. Les SARM producteurs de la leucocidine de Panton-Valentine (SARM LPV)

II. 1. Généralités

II. 1. 1. *Staphylococcus aureus*

- Caractéristiques bactériologiques

Les staphylocoques ont fait l'objet de deux premières communications par Pasteur à l'Académie des Sciences en 1876 et 1880. Il révéla l'existence de « vibron pyogénique » qu'il avait isolé à la fois dans un pus d'anthrax et d'ostéomyélite. La mise au point de la coloration de Gram en 1884 a permis d'affiner son observation. Le terme *Staphylococcus* provient du grec « *staphyle* » (grappe de raisin). Il a été nommé ainsi par le médecin écossais, Sir Alexander Ogson, en rapport avec l'aspect microscopique de la bactérie : CGP le plus souvent regroupés sous forme d'amas (grappes). Ceci est dû au mode de division cellulaire aléatoire dans l'espace des staphylocoques.

De la famille des *Micrococcaceae*, le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 41 espèces dont 18 sont retrouvées chez l'homme [89]. L'espèce *S. aureus* doit être différenciée des staphylocoques à coagulase négative. Plusieurs tests rapides peuvent être utilisés pour ce diagnostic différentiel [5] :

- la recherche de la coagulase libre est réalisée par la suspension de colonies dans un plasma de lapin. Une coagulation est observée avant la 24^{ème} h, le plus souvent dès les trois premières heures.
- la recherche du facteur d'affinité pour le fibrinogène présent à la surface de *S. aureus* (coagulase liée). Une suspension de colonies est mise en présence d'un plasma humain dilué et une agglutination rapide est observée.
- la recherche de la protéine A. Cette dernière est associée à la paroi de 90% des souches de *S. aureus* et a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines (Ig). Des hématies ou des particules de latex recouvertes d'IgG sont agglutinées en présence de cette protéine.
- la recherche de la nucléase thermostable.

- Habitat et transmission

S. aureus est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. L'homme en est le réservoir essentiel. La colonisation se fait rapidement après la naissance et fluctue au cours de la vie. Les niches écologiques de *S. aureus* sont principalement les fosses nasales antérieures (20 à 30% de portage). A partir de ce gîte, *S. aureus* peut coloniser d'autres sites : le périnée (20%), le pharynx, les creux axillaires, le cuir chevelu, les espaces interdigitaux (5 à 10%) et peut disséminer de façon transitoire sur l'ensemble du revêtement cutané.

La transmission interhumaine de *S. aureus* résulte d'un contact direct ou indirect via l'environnement. La transmission intrahospitalière est le plus souvent manuportée. La souche en cause peut être celle du soignant, d'un autre patient ou du patient lui-même. Il est possible qu'une transmission par l'air puisse survenir lorsque le patient est porteur de *S. aureus* au niveau trachéo-bronchique.

- Pouvoir pathogène

S. aureus est le plus virulent des staphylocoques. Il exprime de nombreux facteurs de virulence, notamment des protéines de surface qui initient la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la phagocytose et des toxines [5, 90].

La fixation de *S. aureus* aux cellules et à la matrice extracellulaire se fait par l'intermédiaire de protéines de surface dénommées adhésines. Certaines d'entre elles appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) c'est à dire qu'elles reconnaissent les molécules de la matrice extracellulaire. Parmi ces protéines, les mieux caractérisées sont : la protéine A, la protéine de liaison au collagène (type I, II et IV), les protéines de liaison à la fibronectine, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor A et B) et les facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose.

S. aureus est une bactérie à développement extracellulaire prédominant. L'extension de l'infection est favorisée par l'existence de facteurs permettant à *S. aureus* d'échapper à la phagocytose : capsule, présente chez 90% des souches, et formation d'un caillot de fibrine péribactérien induite par le complexe coagulase-prothrombine (staphylothrombine). Ce caillot peut ensuite être dissocié par la staphylokinase et entraîner des localisations septiques secondaires. D'autre part, *S. aureus* sécrète des enzymes capables de dégrader le tissu conjonctif (protéases, élastase et hyaluronidase) et des toxines formant des canaux ioniques

au niveau des membranes cellulaires (hémolysines α , β , δ et les toxines synergohyménotropes).

S. aureus provoque 2 types de syndromes : les infections suppuratives et les toxémies staphylococciques.

Parmi les infections suppuratives, on distingue les infections superficielles et les infections profondes qui impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, puis la destruction des tissus de l'hôte avec une réponse inflammatoire locale et systémique. *S. aureus* est principalement responsable d'infections suppuratives loco-régionales, cutanéomuqueuses comme les folliculites, les furoncles, les panaris, l'anthrax, les cellulites, les sinusites et les otites. Ces infections se compliquent parfois par une diffusion hématogène de la bactérie. *S. aureus* peut alors être responsable d'infections profondes comme les septicémies, les endocardites, les pneumopathies, les ostéomyélites, les arthrites, les méningites et les infections urinaires.

Parmi les infections toxiques, on distingue le choc toxique staphylococcique, le syndrome d'exfoliation généralisé, les toxi-infections alimentaires et la pneumonie nécrosante.

Le syndrome de choc toxique staphylococcique et sa forme mineure, la scarlatine staphylococcique, sont dus à la diffusion de TSST-1 et/ou d'entérotoxines. Il s'agit de toxines superantigéniques, c'est à dire capables de provoquer une activation polyclonale des lymphocytes T indépendamment d'une spécificité antigénique. Elles induisent à activation massive du système immunitaire responsable d'une libération de cytokines de l'inflammation et de la survenue du choc toxique. Le choc toxique staphylococcique survient le plus souvent au décours d'une infection suppurative et est plus rarement associé à une simple colonisation des voies aériennes supérieures. En cas de choc toxique, la mortalité est de l'ordre de 10 %. A côté de cette forme classique, d'autres formes cliniques incomplètes sont décrites comme le NTED (Neonatal toxic shock syndrome-like Exanthematous disease) et le REDD syndrome (Recalcitrant Erythematous Desquamating Disorder).

Les exfoliatines (A et B) sont à l'origine du syndrome d'exfoliation généralisée. Ce syndrome est appelé syndrome de Ritter s'il survient chez le nouveau-né, syndrome de la peau ébouillantée chez le jeune enfant ou impétigo bulleux en cas de forme mineure localisée. Les symptômes débutent par un rash scarlatiniforme douloureux (surtout au niveau du visage) qui est suivi en quelques heures d'un décollement spontané ou provoqué.

Les toxi-infections alimentaires surviennent après l'ingestion d'entérotoxines thermostables préformées dans les aliments contaminés par *S. aureus*. Elles se traduisent cliniquement par l'apparition, 1 à 6 h après ingestion, de nausées, vomissements, et d'une diarrhée dans un

contexte apyrétique. L'évolution est le plus souvent spontanément favorable en l'absence de traitement.

L'expression coordonnée des exoprotéines est sous le contrôle d'un régulateur global appelé système *agr* (accessory gene regulator) (Figure 17). Il existe 4 types d'allèle *agr*. Après une phase de croissance exponentielle, le système *agr* réprime la synthèse des protéines de surface et induit la synthèse des enzymes et exotoxines responsables de la dissémination de l'infection [91, 92].

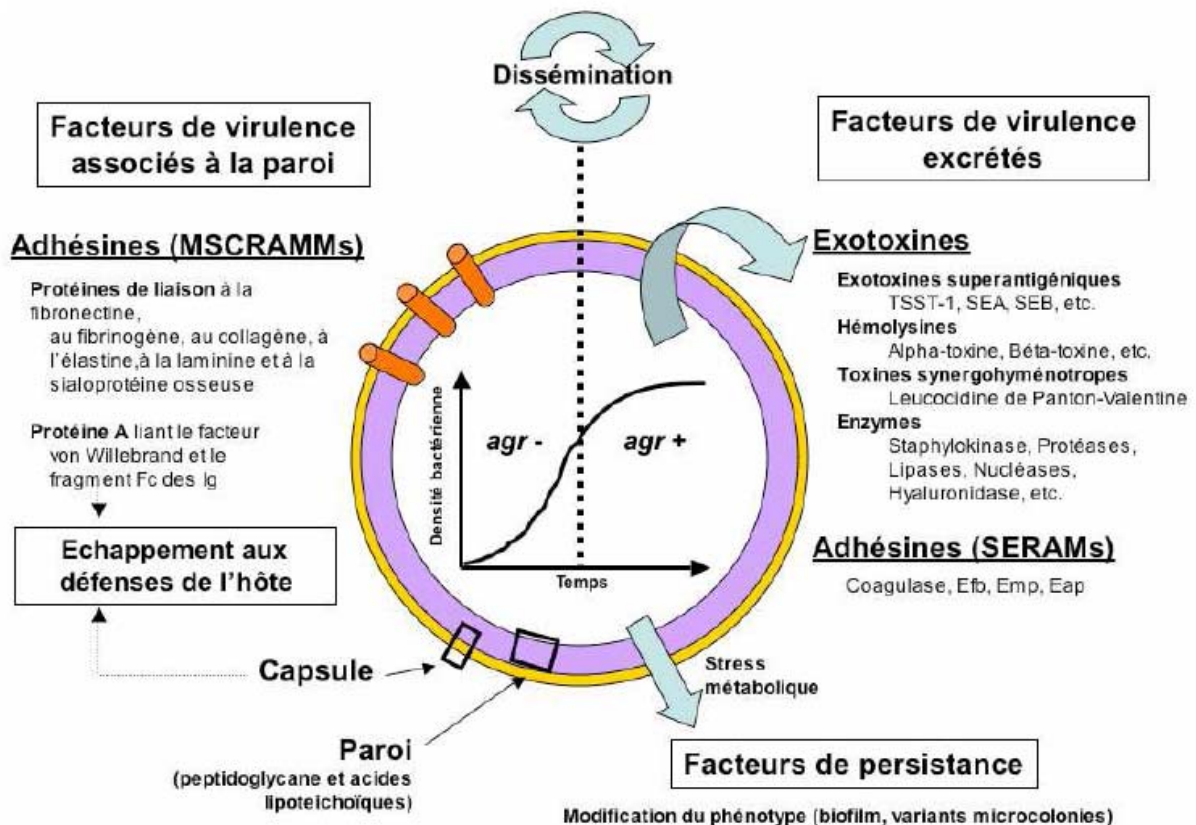


Figure 17 : Facteurs de virulence de *S. aureus* régulés par le système *agr* [93]

- Résistance aux antibiotiques et évolution

Dans les années quarante, la forte mortalité due aux infections à *S. aureus* a été réduite par l'utilisation de la pénicilline G. La sensibilité à cet antibiotique a été de courte durée car rapidement ont émergé des *S. aureus* producteurs de pénicillinases. Une nouvelle molécule fut alors commercialisée en 1959 : la méticilline, qui est une pénicilline semi-synthétique résistante aux pénicillinases. Deux ans après son introduction les premières souches résistantes à la méticilline ont été rapportées. Depuis, la dissémination de ces souches n'a cessé de croître au niveau mondial [92, 94, 95]. La résistance à la méticilline est une

résistance par modification de la cible des β -lactamines (PLP). La transcription du gène *mecA* conduit à la synthèse d'une nouvelle PLP, appelée PLP2a, qui présente peu d'affinité pour la méticilline ou pour toute autre β -lactamine [96]. Le gène *mecA* est véhiculé par un élément génétique mobile appelé « Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* » (SCC*mec*) [97-99]. Cinq types de SCC*mec* ont été décrits (Figure 18) et correspondent à des fragments d'ADN de taille variable (21 et 67 kb) [100].

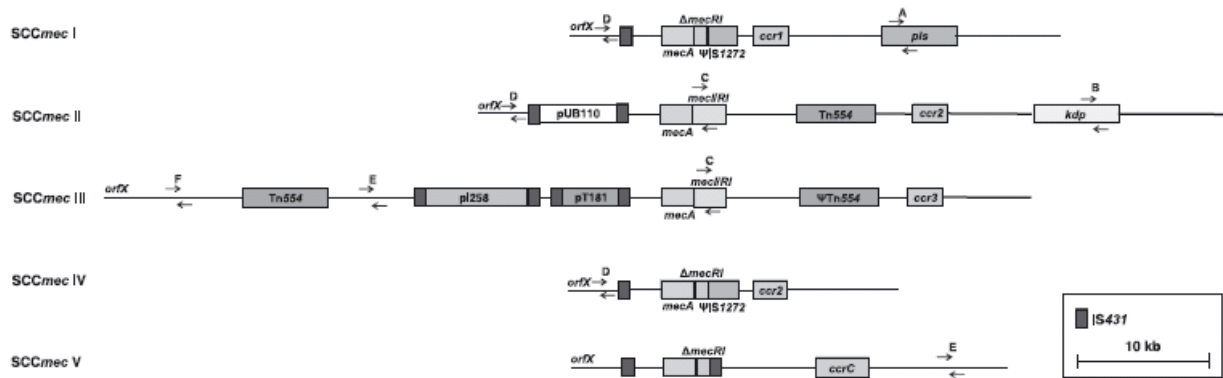


Figure 18 : Structure schématique des SCC*mec* de type I à V [100]

A partir des années 1970, les SARM hospitaliers sont devenus progressivement multirésistants aux antibiotiques (aminosides, chloramphénicol, macrolides, tétracyclines, rifampicine et fluoroquinolones). Depuis 1992, un nouveau phénotype de SARM est apparu en France, caractérisé par une résistance à la méticilline (hétérogène), aux fluoroquinolones et par sa sensibilité à divers antibiotiques notamment à la gentamicine [101]. Parallèlement à la stabilisation puis à la diminution de la prévalence des SARM au sein de l'espèce, la prévalence des souches sensibles à la gentamicine n'a cessé de croître jusqu'à atteindre 90% des souches de SARM isolées à l'hôpital.

II. 1. 2. *S. aureus* producteurs de LPV

- Historique

Découverte en 1894 par Van Develde, la LPV est qualifiée de « substance leucocidine » du fait de son effet lytique sur les leucocytes. L'implication de la leucocidine dans les infections de la peau et des tissus mous n'est élucidée qu'en 1932 lors d'une étude menée par Pantan et Valentine. Ces derniers remarquèrent en effet l'association entre la production de leucocidine et la présence de furoncles. En 1936, Valentine écrit que « les *S. aureus* qui sont

parvenus à envahir le tissu humain, sont capables de produire in vitro de grandes quantités de leucocidine ». En 1992, Cribier et al. démontrent que cette toxine est principalement associée aux infections cutanées primaires, furoncles et abcès en particulier [102].

- Origine des SARM LPV

Le modèle hypothétique permettant d'expliquer l'origine des SARM LPV est le suivant (Figure 19) [95, 98, 103-108].

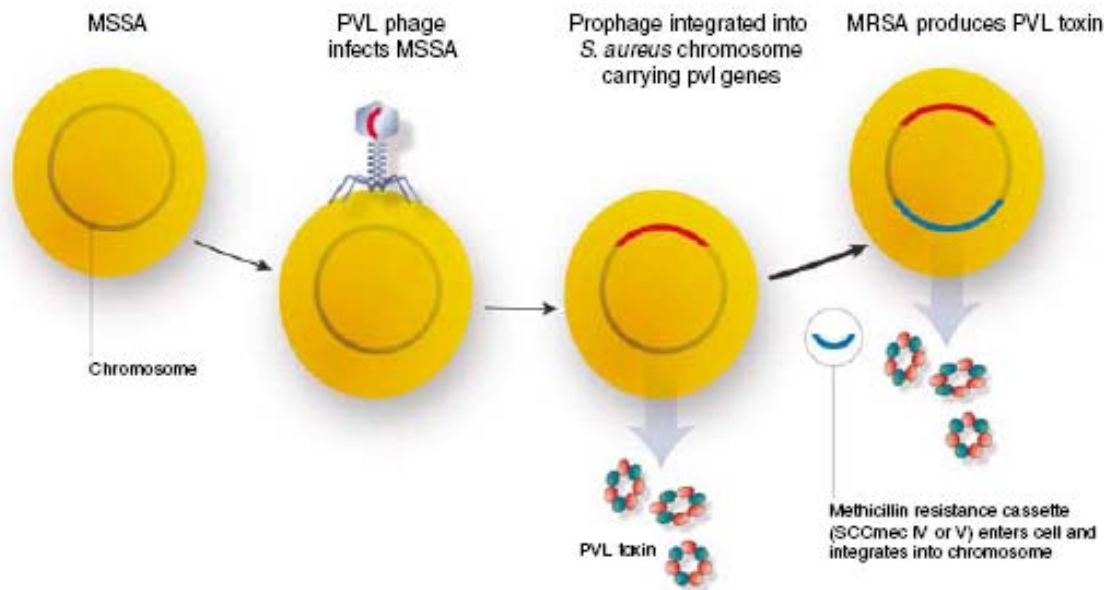


Figure 19 : Modèle hypothétique de l'apparition des SARM LPV [104]

Etape n°1 : les gènes codant la LPV ont été transduits par un phage dans une souche de *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM).

Etape n°2 : une cassette chromosomique de petite taille portant le gène *mecA* (SCCmec IV ou V) se serait intégrée dans le génome de nombreux clones ancestraux de SASM circulants dans différentes régions géographiques.

Etape n°3 : quelques clones auraient émergé de par le monde. La méthicillino-résistance aurait conduit à un avantage sélectif pour la dissémination des SARM LPV.

- La LPV : génétique et biochimie

La LPV est une toxine à deux composantes : LukS-PV (312 AA, 33 kDa) et LukF-PV (325 AA, 34 kDa). Ses deux unités sont codées par deux gènes contigus et co-transcrits [109]. Ces protéines appartiennent à la famille des « pore-forming » toxines qui agissent de façon synergique sur la membrane cellulaire pour la perforer (toxine synergohyménotrope) [110]. *S. aureus* est la seule bactérie chez laquelle cette toxine a été isolée [111].

- Effets pathogènes de la LPV

• In vitro

La pathogénicité de la LPV est liée à sa toxicité pour les globules blancs, en particulier pour les neutrophiles et les monocytes [112-114]. La sous unité LukS-PV possède une forte spécificité pour un récepteur membranaire unique [115]. La liaison de la sous-unité LukF-PV à LukS-PV induit la formation d'un canal ionique qui conduit à l'augmentation des concentrations du calcium (Ca^{2+}) libre intracellulaire activateur des polynucléaires [116, 117]. Cette activation conduit à l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales suivie par une dilatation des capillaires, une diapédèse, une activation de la cascade de l'inflammation et une nécrose vasculaire (libération de métabolites oxygénés, d'interleukines et d'enzymes) [118]. En fonction de la concentration locale en LPV, une apoptose ou une cytolysse des polynucléaires est observée. A faible concentration, l'apoptose serait provoquée par la formation de pores dans la membrane mitochondriale des polynucléaires alors que la nécrose tissulaire serait observée à de plus fortes concentrations suite à leur cytolysse (Figure 20) [119]. En plus de son effet cytotoxique direct, la LPV agirait indirectement par l'induction de la synthèse de protéines ancrées dans la membrane de *S. aureus*, notamment la protéine A [134].

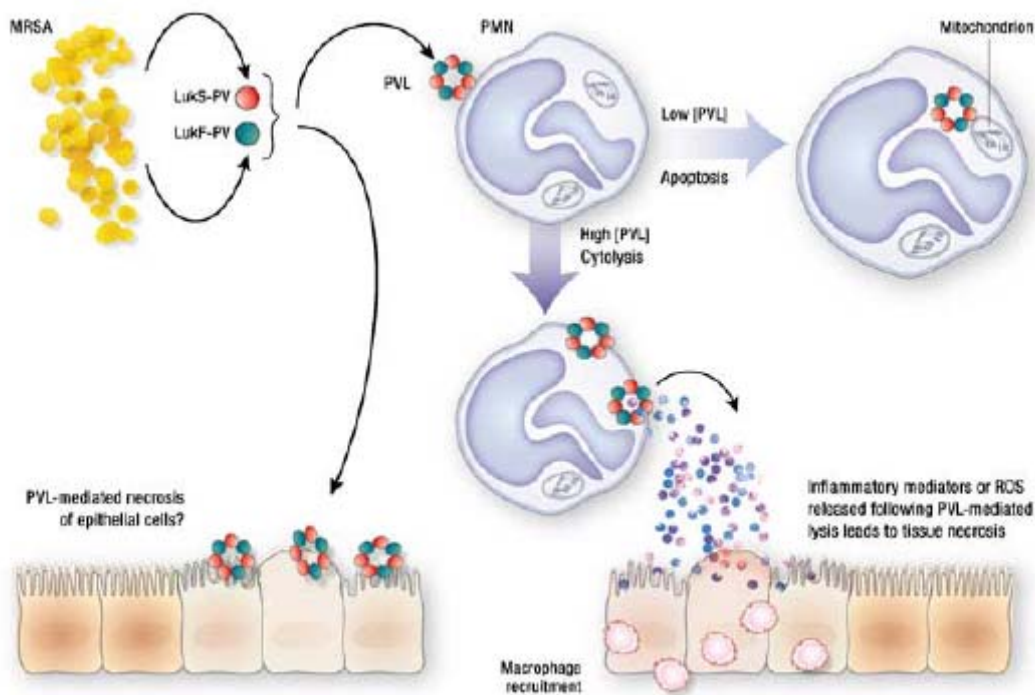


Figure 20 : Modèle du mécanisme d'apoptose et de nécrose tissulaire induit par la LPV [104]

Ces données sont cependant encore controversées, en effet certains auteurs n'ont pas observé de corrélation entre l'expression de la LPV et la cytolysse des polynucléaires in vitro [120].

- In vivo

Chez l'Homme, la présence de souches productrices de LPV est fortement associée à la survenue d'infections extensives primitives et/ou récidivantes de la peau et des tissus mous mais aussi à celle d'autres infections, plus rares comme les pneumonies nécrosantes et les ostéomyélites [121].

- ✓ Infections de la peau et des tissus mous

La LPV, par son effet dermo-nécrotique, est capable d'initier une infection cutanée en l'absence de lésion de la barrière cutanée. Les études montrant l'association de la LPV avec des infections de la peau et des tissus mous (cellulites et abcès) sont nombreuses [121-125]. Ainsi par exemple, Lina et al. décrivent la présence de la LPV dans 93% des furoncles [121]. Ces furoncles sont souvent multiples et associés à un érythème plus intense autour de la lésion. Ce phénomène est le reflet d'une forte inflammation provoquée par l'apoptose des polynucléaires et la dilatation des capillaires [125]. Certains auteurs, utilisant des modèles murins d'infection de la peau et des tissus mous, n'ont cependant pas observé de différences en terme d'extension locorégionale de l'infection et de létalité selon que la souche produisait ou non la LPV [133]. Cette discordance est probablement due au modèle expérimental.

- ✓ Pneumopathies nécrosantes

Les *S. aureus* associés aux pneumopathies nécrosantes possèdent une forte capacité à former un biofilm au niveau de la matrice extracellulaire des cellules pulmonaires. Suite à cette adhésion, le système *agr* entraînerait la production de LPV qui conduirait à une détérioration rapide de l'état du patient [126]. Ces pneumopathies nécrosantes touchent principalement les enfants et les jeunes adultes, sans antécédent particulier. Dans la moitié des cas, la pneumonie est précédée d'un syndrome pseudo-grippal, avec pour certaines observations l'isolement d'un virus de type influenza [127, 128]. Cette pneumonie sévère, souvent bilatérale, est rapidement progressive. Elle associe détresse respiratoire, atteinte pleurale, leucopénie et hémoptysie [112, 129]. Malgré l'antibiothérapie adaptée, la mortalité est très élevée. Le décès est observé dans 56 à 75% des cas, principalement dans les quarante-huit premières heures [112, 130].

✓ Infections ostéo-articulaires

Les *S. aureus* producteurs de LPV peuvent être à l'origine d'infections ostéo-articulaires sévères. Ces infections orientent la suspicion vers un SARM LPV du fait de leur présentation particulièrement aiguë (ostéomyélites par exemple). Elles sont caractérisées par l'existence d'une leucopénie relative à la phase précoce et par une évolution défavorable sous traitement bien conduit avec constitution d'abcès osseux et des parties molles adjacentes voire l'apparition de localisations viscérales secondaires. Ainsi, dès lors qu'il existe des abcès osseux ou souspériosté dans ce contexte, les indications de drainage chirurgical doivent être très larges, avec souvent nécessité d'interventions répétées [131, 132].

II. 1. 3. Le SARM communautaire

La méticillino-résistance est longtemps restée synonyme d'acquisition de *S. aureus* à l'hôpital. Cependant dans les années 1990, des infections à SARM acquises en ville ont été décrites en Australie [135-137], en Amérique du Nord [138] et en Europe [112, 121, 124, 139]. Ces infections sont rencontrées chez des personnes initialement en bonne santé [104]. Il s'agit d'un changement majeur dans l'épidémiologie du SARM. Ainsi, l'infection à SARM communautaire est définie comme une infection touchant des patients ne présentant pas les facteurs de risque qui caractérisent habituellement ceux qui ont acquis des SARM hospitaliers, il s'agit donc d'un diagnostic d'exclusion [140]. Cependant, la définition d'infection communautaire est délicate. Ainsi, Salgado et al. [141], dans le cadre d'une revue de la littérature publiée en 2003, ont constaté que cette définition était variable selon les études voire même absente dans certaines d'entre-elles (Tableau 5).

Tableau 5 : Diversité des définitions d'une infection communautaire à SARM dans la littérature [141]

Definition	No. of studies using definition, reference(s)
Isolated within 24 h of admission	1 [46]
Isolated within 24 h of admission, with other exclusions	1 [10]
Present at or within 48 h of admission	6 [19, 22, 24, 28, 30, 40]
Isolated within 48 h of admission, with other exclusions	9 [8, 12, 14, 20, 21, 26, 27, 29, 38]
Isolated within 48–72 h of admission	1 [47]
Isolated within 72 h of admission	4 [5, 16, 32, 37]
Isolated within 72 h of admission, with other exclusions	6 [17, 25, 34, 41, 42, 45]
Patient from a community clinic/facility	3 [13, 15, 31]
No definition reported	8 [18, 23, 33, 35, 36, 39, 43, 44]

NOTE. Most common definitions reported were patient isolates identified within 48 h of hospital admission, with or without other exclusions, which often included recent admission to hospital or long-term care facility or previous history of MRSA colonization.

Ainsi, il est préférable de définir une infection communautaire à SARM sur la base de l'association de critères cliniques, épidémiologiques et moléculaires [142].

L'analyse moléculaire permet de caractériser l'appartenance clonale des souches de SARM et ainsi d'en étudier la diffusion au niveau national et international [143]. Cette caractérisation repose sur le séquençage de gènes de ménage (MLST pour multilocus sequence typing) [144], la caractérisation du nombre et de la structure des répétitions présentes dans la séquence codante de la protéine A (*spa typing*) [145], la caractérisation de la *SCCmec* portant le gène de résistance *mecA* et du type d'allèle du système *agr* [146]. L'étude du profil de restriction de l'ADN chromosomique des SARM par ECP permet quant à elle de démontrer le lien entre des souches isolées dans un espace spatio-temporel plus restreint [16, 85, 173].

Les clones de *S. aureus* communautaires ont une spécificité continentale (Europe, Amérique du Nord, et Asie-Océanie). En effet, les souches décrites en Europe semblent identiques entre elles mais différentes des souches isolées des autres continents ce qui exclue la dissémination d'un clone unique à travers le monde, même si des transmissions entre continents ont été observées. L'hypothèse retenue est la co-évolution simultanée de SARM issus de clones communautaires différents d'une zone géographique à l'autre [147]. En France, les SARM producteurs de LPV appartiennent au clone européen de type MLST80 (ST80) et se caractérisent par leur cassette *SCCmec* de type IV ou V et par leur *agr* de type 3.

II. 2. Epidémiologie

II. 2. 1. Facteurs de risque d'infections à SARM LPV

Les populations à risque sont :

- les populations jeunes. Le risque décroît quand l'âge augmente à l'inverse des SARM hospitaliers (Figure 21) [95].

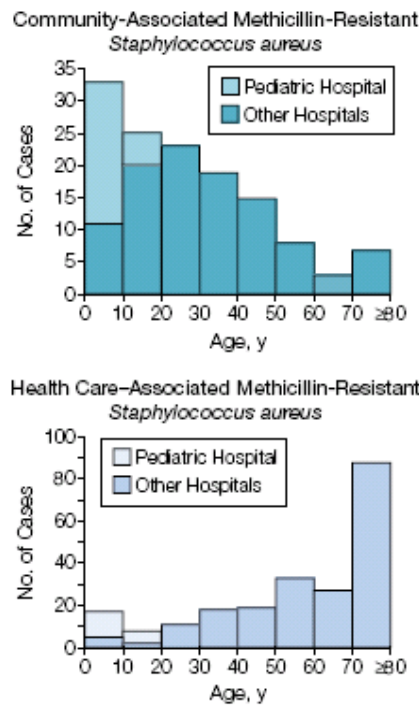


Figure 21 : Distribution des SARM communautaires et hospitaliers en fonction de l'âge [95]

- les populations non caucasiennes (Figure 22) [148] dont les minorités ethniques (habitants des îles Pacifiques, communauté autochtone d'Alaska, aborigènes australiens, canadiens, afro-américains ou indiens d'Amérique (62%)) [140, 149-151].

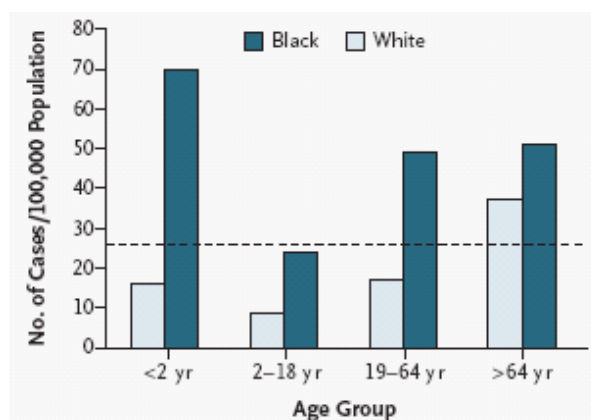


Figure 22 : Incidence des SARM communautaires en fonction de l'âge et de la race [140] (étude réalisée à Atlanta)

- les personnes vivant en promiscuité comme les militaires [152] et les détenus [153, 154].
- les sportifs : sport d'équipe ou de contact (risque d'abrasion cutanée) [155-159].
- les sujets ayant des comportements à risque : toxicomanie [160] et homosexualité [161].

Les environnements à risque sont :

- les classes socio-économiques défavorisées [162].
- les zones de forte densité de population [163].

Les antécédents à risque sont :

- la colonisation par un SARM communautaire [152].
- les patients souffrant de pathologies cutanées chroniques (abcès récidivants) [95].
- l'utilisation récente (dans les 6 mois) ou récurrente d'antibiotiques [152, 164].
- la notion de voyage récent dans un pays à forte prévalence (ex: pays du Maghreb) [165, 166].

II. 2. 2. Situation dans le monde

De nombreuses études signalent la prévalence croissante des infections communautaires à SARM à travers le monde [122, 147]. Des situations épidémiques sont même observées à ce jour dans certains pays. Ainsi, une étude menée aux Etats-Unis (Texas) a décrit une augmentation de ce taux de résistance de 2,9% en 1990 à 40,3% en 2001 [167]. Une étude menée par le CNR français des staphylocoques sur 469 souches isolées de par le monde de 1999 à 2005 a permis de constater la dissémination de clones (initialement spécifiques d'un continent) dans le monde entier, l'émergence de nouveaux clones et l'acquisition de nouveaux déterminants de résistance dans certains pays [168].

II. 2. 3. Situation en France

Les premiers cas de SARM communautaires isolés en France ont été rapportés en 1999 [169]. Une étude réalisée sur 14 souches isolées entre 1999 et 2001 a montré que ces souches présentaient des pulsotypes proches ou identiques (Figure 23) et se caractérisaient par leur appartenance à l'allèle *agr* de type 3 [170].

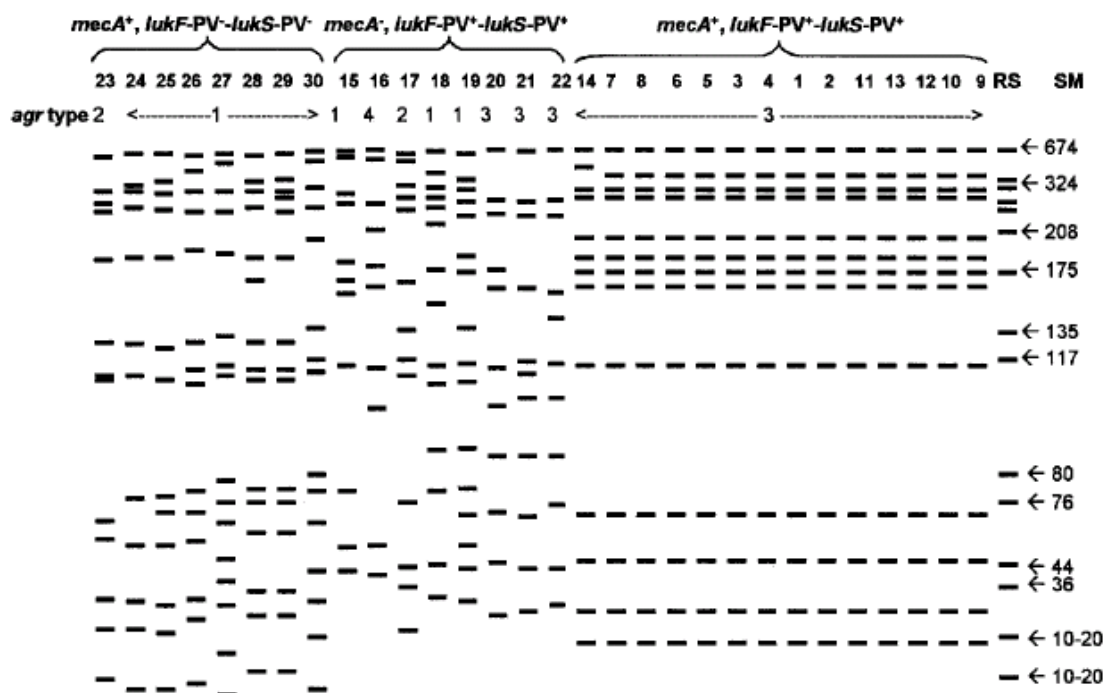


Figure 23 : Comparaison des pulsotypes (ECP) de SARM, de SASM LPV et de SARM LPV isolés en France [170]

(lignes 1 à 14 = SARM LPV, lignes 15 à 22 = SASM LPV, lignes 23 à 30 = SARM)

Entre 2001 et 2003, 50 souches de SARM LPV supplémentaires ont été isolées en France, elles appartenait toutes au même clone initial. Les résultats préliminaires de l'étude prospective de l'ONERBA, réalisée entre mai et octobre 2008, a permis d'établir le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de SARM LPV isolés en France [2] (Tableau 6).

Tableau 6 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des SARM LPV isolés en France entre mai et octobre 2008 (n = 58)

Fluoroquinolones ^S , gentamicine ^S et acide fusidique ^R	100%
Kanamycine ^R	100%
Tobramycine ^R	0%
Macrolides et apparentés ^S	71%
Erythromycine ^R	24%
Erythromycine et lincosanides ^R	2%
Pristinamycine ^R	3%
Tétracyclines ^R	73%
Rifampicine ^R	0%

D'après cette étude, le locus de la LPV est présent chez 1,6% des souches de *S. aureus* en France.

II. 3. La problématique

Concernant les SARM LPV, la problématique est double :

- le risque de diffusion à l'hôpital. Une fois introduits à l'hôpital par des malades infectés ou colonisés, les SARM LPV sont, en raison de leur double propriété de résistance aux antibiotiques et de contagiosité, à même de diffuser sous forme épidémique [171, 174-176]. Des transmissions intrahospitalières de ces souches communautaires ont été décrites à plusieurs reprises dans divers hôpitaux français [177, 178].
- le risque d'acquisition de résistances [168]. L'émergence de souches de SARM LPV communautaires multirésistantes a été observée au Japon et en Algérie [179, 180]. Ces auteurs ont en particulier observé au sein de clones préexistants l'apparition de souches ayant acquis des résistances supplémentaires à certains antibiotiques comme la gentamicine, la fosfomycine, les cyclines et les fluoroquinolones [181, 182].

II. 4. Diagnostic au laboratoire

II. 4. 1. Les méthodes phénotypiques

- Culture

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants qui peuvent être isolés en culture dans un bouillon ou sur des milieux gélosés ordinaires. Après 24 h d'incubation en aérobiose, les colonies sont opaques et mesurent de 1 à 3 mm. Pour *S. aureus*, les colonies typiques présentent une pigmentation caractéristique jaune dorée (pigment caroténoïde) et une β -hémolyse sur gélose au sang. En cas de prélèvements polymicrobiens, des milieux sélectifs tels que le milieu mannitol de Chapman (7,5% de NaCl) ou une gélose au sang contenant de l'acide nalidixique et de la colistine peuvent être utilisés [172].

- Identification et antibiogramme

En routine, l'identification de *S. aureus* est basée sur la mise en évidence de la coagulase libre ou liée, de la protéine A et/ou de la nucléase. Si 2 de ces tests sont positifs, l'identification est validée. En cas de discordance, une identification biochimique complète est nécessaire. Cette identification peut être réalisée par divers systèmes (galeries API[®], Vitek2[®]...). La détermination de la sensibilité aux antibiotiques peut être réalisée sur milieu solide (disques d'antibiotiques) ou en milieu liquide.

II. 4. 2. Les méthodes génotypiques

La mise en évidence des gènes codant la LPV peut être réalisée par des techniques de « PCR maison » basées sur l'utilisation d'amorces publiées dans la littérature. Le laboratoire du CNR des staphylocoques à Lyon a ainsi mis au point une technique de PCR multiplex permettant la recherche simultanée de plusieurs gènes codant des toxines (entérotoxines, TSST-1, exfoliatines, toxines synergohyménotropes dont la LPV...) et de ce fait établit un profil toxinique complet.

D'autres techniques permettant la détection des gènes *luk* par hybridation moléculaire ont été développées plus récemment. Le test Evigene[®] (AdvanDix) est une méthode commercialisée depuis 2009 qui peut détecter les gènes *nucA*, *mecA*, *luk*, *tst* et *mupA* par hybridation en microplaque. La méthode genotype[®] MRSA (Hain Lifescience) permet quant à elle de détecter les gènes *mecA*, *luk* et des gènes constitutifs de *S. aureus* ou *S. epidermidis* par hybridation sur bandelette.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Pour être à même de mettre en place rapidement des mesures de prévention de la diffusion épidémique des ERG et des SARM LPV, il faut pouvoir identifier rapidement ces souches. L'identification rapide de ces souches se heurte à des difficultés techniques :

- pour les ERG : les souches de l'espèce *E. faecium* porteuses du gène *vanA* (et plus rarement de *vanB*) sont les plus fréquemment responsables d'épidémies. Ces souches doivent donc être distinguées des autres espèces d'entérocoques, principalement de *E. faecalis* qui est une espèce 5 à 10 fois plus fréquente que *E. faecium*, et de deux espèces naturellement résistantes aux glycopeptides, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (gène *vanC*). Malgré l'utilisation de méthodes phénotypiques récentes, la distinction entre ces espèces résistantes est délicate et une méthode génotypique est nécessaire.
- pour les SARM LPV : si le caractère de résistance à la méticilline est facile à reconnaître, la présence des gènes de virulence *lukS*-PV et *lukF*-PV codant pour la toxine LPV ne peut se faire que par méthode génotypique.

Notre étude s'inscrit dans celle initiée au niveau national (étude multicentrique – STIC 2007) et portant sur l'« Evaluation en réseau de l'identification rapide de *E. faecium* résistant à la vancomycine et de *S. aureus* résistant à la méticilline et producteurs de la LPV par PCR-hybridation sur bandelette » (annexe 1). Les objectifs de cette étude étaient :

- de mettre en place dans une cohorte d'hôpitaux universitaires une technologie récemment mise au point et commercialisée sous forme de trousse permettant l'identification rapide des souches d'ERG et de SARM LPV par étude de biologie moléculaire.
- et d'évaluer le bénéfice de l'application de cette technologie en routine sur la durée d'isolement probabiliste des patients suspects.

Le bénéfice attendu était de limiter les coûts et dysfonctionnements hospitaliers entraînés par un isolement probabiliste inutilement prolongé en cas de résultats négatifs.

L'objectif spécifique de notre étude a été d'évaluer la place de la PCR-hybridation en routine pour la détection des ERG dans un contexte épidémique et pour la détection des SARM LPV dans un centre hospitalier où ces souches étaient rarement isolées.

MATERIEL ET METHODES

I. Souches bactériennes étudiées

Les souches étudiées dans ce travail correspondent à toutes les souches suspectes d'être des ERG ou des SARM LPV qui ont été isolées dans notre laboratoire, à partir de prélèvements à visée diagnostique ou épidémiologique réalisés chez des patients hospitalisés au CHU de Nancy et au Centre Alexis Vautrin d'août 2007 à juillet 2008. Pour ce qui concerne les SARM LPV, l'étude a été étendue jusqu'en septembre 2008.

I. 1. Souches suspectes d'être des ERG

I. 1. 1. Souches isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique

Il s'agit de toutes les souches d'entérocoques détectées au cours des analyses effectuées conformément au GBEA du laboratoire de bactériologie, pour lesquelles un antibiogramme a été réalisé et pour lesquelles une sensibilité réduite aux glycopeptide était suspectée sur la base des critères suivants [183] :

- en cas d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion en gélose avec disques (après 24 h d'incubation) :
 - diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'un des deux glycopeptides < 17 mm
 - diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de vancomycine inférieur d'au moins 3 mm à celui autour du disque de teicoplanine
 - présence de colonies dans la zone d'inhibition de l'un des deux glycopeptides.
- en cas d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par le système Vitek2[®] :
 - souches catégorisées intermédiaires ou résistantes à au moins l'un des deux glycopeptides.
- en cas de culture sur un milieu additionné de vancomycine

I. 1. 2. Souches isolées à partir de prélèvements à visée épidémiologique

Les souches suspectes d'être des ERG ont été isolées après culture d'écouvillonnages rectaux effectués dans le cadre des mesures destinées à maîtriser la diffusion des ERG au

CHU de Nancy. Seules les souches isolées de patients ayant fait l'objet d'une demande de dépistage de portage intestinal d'ERG et n'étant pas connus comme porteurs d'ERG (Cf. bases de données du laboratoire de bactériologie) ont été analysées.

Les produits d'écouvillonnage rectaux ont été ensemencés directement sur une gélose chromogène sélective, le milieu ChromID VRE® (bioMérieux). Cette gélose est constituée d'une base nutritive riche (peptones) contenant deux substrats chromogènes et un mélange d'antibiotiques dont la vancomycine (8 mg/l).

Ce mélange sélectif permet la croissance spécifique et sélective des entérocoques résistants à la vancomycine en inhibant :

- les souches d'entérocoques ne présentant pas de résistance acquise à la vancomycine
- les espèces d'entérocoques présentant une résistance naturelle à la vancomycine (phénotype VanC : *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*)
- la plupart des bactéries à Gram (-), Gram (+), les levures et moisissures.

La présence des 2 substrats chromogènes permet la détection de *E. faecium* et *E. faecalis* de par la coloration caractéristique des colonies (Figure 24) :

- *E. faecium* : coloration violette des souches productrices de β -galactosidase
- *E. faecalis* : coloration bleu-verte des souches productrices d' α -glucosidase



Figure 24: Aspect caractéristique de *E. faecium* (gauche) et de *E. faecalis* (droit) sur gélose ChromID VRE®

Dans un premier temps (avant septembre 2007), la conduite à tenir, schématisée dans la figure suivante, a été appliquée en cas de présence de colonies suspectes.

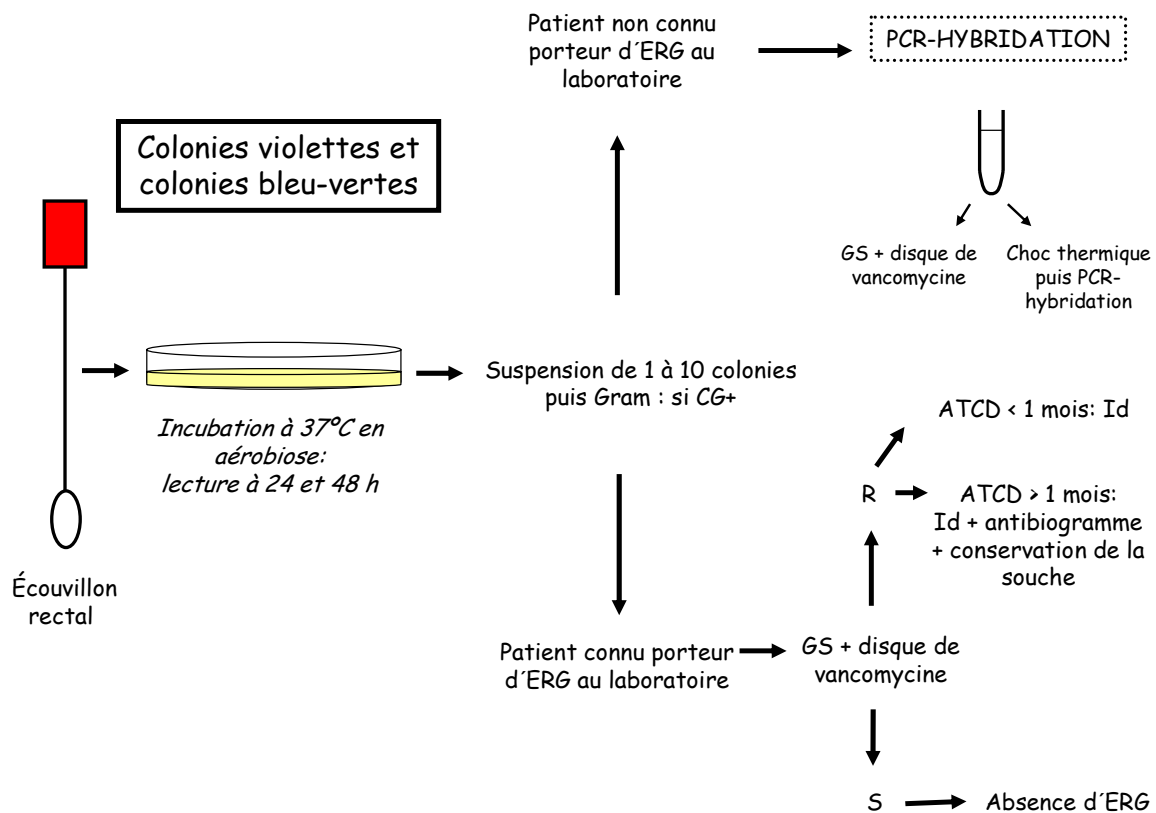


Figure 25 : Conduite à tenir n°1 face à des colonies bleu-vertes et violettes

(GS = gélose au sang, Id = identification par méthode phénotypique, S = sensible, R = résistant, ATCD = date du dernier diagnostic d'ERG au laboratoire)

Après ensemencement et incubation, les cultures étaient observées à 24 et 48 h. Cette deuxième lecture était le plus souvent nécessaire du fait de la taille trop faible et d'une coloration difficilement interprétable des colonies à 24 h. A 48 h, une suspension de 1 à 10 colonies était réalisée afin de vérifier que les colonies suspectes correspondaient bien à des CGP. Cette suspension était utilisée ensuite pour l'analyse par PCR-hybridation et pour l'ensemencement d'une gélose au sang à laquelle un disque de vancomycine (30 µg) était ajouté. Cette gélose (GSV) permettait, le lendemain, de valider les résultats de la PCR et de réaliser une conservation de la souche. Il est à noter que lorsque le patient était déjà connu et que des souches suspectes étaient détectées, l'analyse moléculaire n'a pas été réalisée et seule une GSV était ensemencée afin de confirmer la présence d'un ERG par les méthodes phénotypiques (identification et antibiogramme).

La conduite à tenir en cas de présence de colonies suspectes d'être des ERG a été dans un second temps (à partir de septembre 2007) adaptée au contexte épidémiologique. Cette modification (Figure 26) a été justifiée par le fait que la souche épidémique était une souche de *E. faecium vanA* et que dans un grand nombre de cas les colonies suspectes d'être des *E. faecalis* résistantes à la vancomycine se sont avérées être des *E. faecalis* sensibles aux glycopeptides.

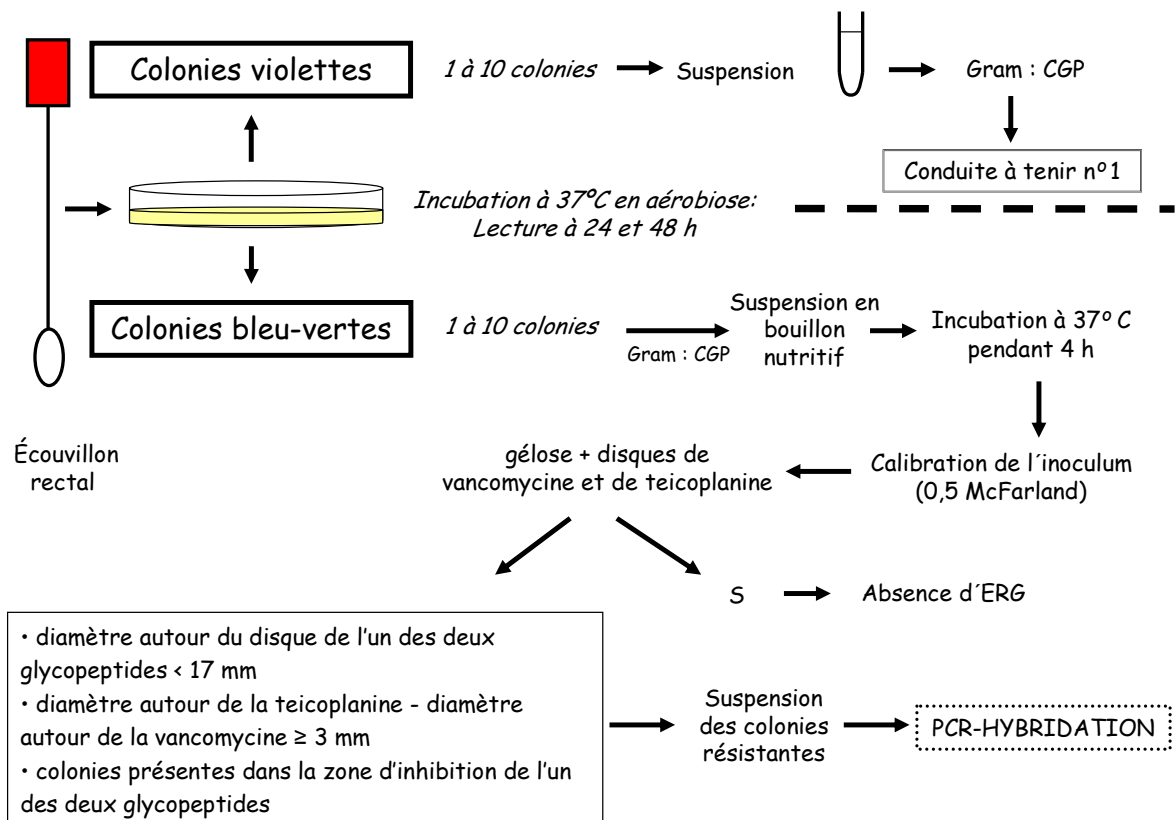


Figure 26 : Conduite à tenir n °2 face à des colonies bleu-vertes et violettes

(ATCD = date du dernier diagnostic d'ERG au laboratoire, S = sensible, R = résistant)

Dans ce nouveau protocole, seule la conduite à tenir en cas de présence de colonies bleu-vertes a été modifiée. Dans ce cas, 1 à 10 colonies étaient incubées dans un bouillon d'enrichissement pendant 4 h afin de pouvoir réaliser une suspension calibrée (0,5 McFarland ~ 10⁸ UFC/ml) telle que recommandée par le CASFM pour la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en gélose avec disques [183]. Cette suspension était utilisée pour étudier la sensibilité de chacune des souches à la vancomycine et à la teicoplanine selon cette méthode. Seules les souches présentant les caractéristiques faisant suspecter une sensibilité réduite aux glycopeptides ont fait l'objet d'une analyse par PCR-hybridation.

I. 2. Souches suspectes d'être des SARM LPV

I. 2. 1. Souches isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique

Les souches qui ont fait l'objet d'une étude par PCR-hybridation à la recherche d'un *S. aureus* producteur de LPV étaient :

- toutes les souches de SARM ayant un antibiotype caractéristique du clone ST80 c'est à dire : kanamycine^R gentamicine^S, tobramycine^S et acide fusidique^{L/R} [2].
- toutes les souches de *S. aureus* isolées dans un contexte clinique pouvant faire évoquer l'existence d'une souche productrice de LPV : infection de la peau et des tissus mous ayant nécessité une incision chirurgicale et/ou présentant un caractère extensif ou récidivant, pneumopathie nécrosante ou pneumopathie sévère communautaire du sujet jeune et infection ostéo-articulaire de type ostéomyélite aiguë ou toutes autres infections d'évolution sévères.

Nous avons défini comme origine communautaire toutes les cas pour lesquels la souche a été isolée avant la 48^{ème} h d'hospitalisation du patient.

I. 2. 2. Souches isolées à partir de prélèvements à visée épidémiologique

La recherche de portage de SARM LPV n'a été réalisée que pour certains patients, en concertation avec les cliniciens dans le cadre d'investigations destinées à évaluer la diffusion intrafamiliale ou intrahospitalière des souches. Cette recherche a été réalisée par PCR-hybridation sur des souches isolées à partir d'écouvillonnages nasaux et cutanés. Un antibiogramme a été réalisé de manière systématique afin de déterminer l'antibiotype.

II. PCR-hybridation

Les tests GenoType® Enterococcus et GenoType® MRSA ont été utilisés respectivement pour le diagnostic des ERG et pour celui des SARM LPV par PCR-hybridation. Commercialisés par la société Hain LifeScience, ces tests sont distribués en France par la société Biocentric. Le test GenoType® Enterococcus permet l'identification des principales espèces d'entérocoques (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* et *E. gallinarum*) et la détection des principaux gènes de résistance aux glycopeptides (*vanA*, *vanB*, *vanC1* et *vanC2/C3*). Le test GenoType® MRSA permet l'identification des souches de *S. aureus* et de *S. epidermidis* ainsi que la détection du gène *mecA* et des gènes codant la LPV.

Pour les 2 méthodes, l'analyse comporte 4 étapes :

- extraction de l'ADN bactérien (à partir de cultures)
- amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées
- hybridation inverse sur bandelette de l'ADN amplifié
- révélation chromogénique

II.1. Extraction

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon les recommandations du fabricant, à partir de cultures « fraîches » réalisées sur milieu solide. Le protocole était le suivant :

- prélèvement à l'aide d'une oese de 5 à 10 colonies et mise en suspension dans 150 µl d'eau pour biologie moléculaire.
- incubation de cette suspension à 95°C pendant 10 min (ERG) ou 15 min (SARM LPV).
- centrifugation pendant 5 min à 13 000 tours/min.
- récupération du surnageant (5 µl).

II.2. Amplification

Le mélange réactionnel (solution mère, 45 µl) a été préparé dans une pièce exempte d'ADN et contenait :

- 35 µl d'un mélange contenant les amorces et les nucléotides (solution fournie)
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10X – (non fourni)
- 1,5 µl de MgCl₂ à 50 mM – (non fourni)
- 3,2 µl d'eau pour biologie moléculaire - (non fourni)
- 0,3 µl d'ADN polymérase (Invitrogen®) – (non fourni)

Les 5 µl d'échantillon d'ADN sont ensuite ajoutés au mélange réactionnel dans une pièce séparée.

L'amplification a alors été réalisée selon les procédures résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Profils d'amplification et durées des PCR-hybridations

	ERG		SARM LPV	
Premier cycle	5 min à 95°C		5 min à 95°C	
Dénaturation	10 cycles	30 sec à 95°C	22 cycles	20 sec à 95°C
Hybridation		2 min à 58°C		30 sec à 60°C
Elongation				
Dénaturation	20 cycles	25 sec à 95°C		
Hybridation		40 sec à 53°C		
Elongation		40 sec à 70°C		
Dernier cycle	8 min à 70°C			
Durée	1h30		30 à 40 min	

II. 3. Hybridation

Le produit amplifié (double brin) est ensuite dénaturé. L'ADN simple brin s'hybride sur son brin complémentaire fixé sur la bandelette.

Les différentes étapes d'hybridation ont été réalisées à l'aide d'un système d'hybridation semi-automatique GT-Blot 48[®] (Hain Lifescience) (Figure 27), qui permet l'analyse de 48 produits de PCR dans une même série.

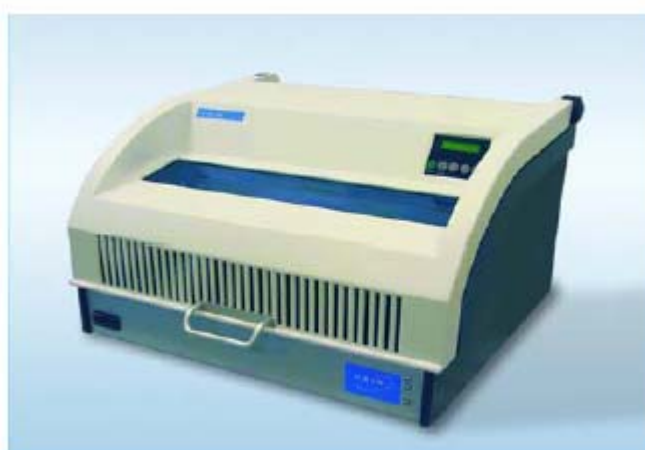


Figure 27 : Appareil d'hybridation automatique GT-Blot 48[®]

Après préchauffage des solutions d'hybridation et de lavage à 37-45°C et dilution au 1:100 du conjugué concentré et du substrat concentré dans un volume adéquat de leur tampon respectif, les étapes suivantes ont été réalisées manuellement :

- dépôt de 20 µl de solution de dénaturation à l'extrémité de chaque puits.
- ajout de 20 µl d'échantillon amplifié (le mélange est incubé 5 min à température ambiante).
- ajout d'1 ml de tampon d'hybridation préchauffé dans chaque puits suivi d'une agitation douce.
- dépôt d'une bandelette dans chaque puits, face sensibilisée (identifiable par le marquage coloré) et numérotée tournée vers le haut.

Les étapes suivantes ont été ensuite réalisées à l'aide du semi-automate :

- incubation à 45°C pendant 30 min (entérocoque) ou 10 min (staphylocoque).
- élimination du tampon d'hybridation.
- ajout d'1 ml de solution de lavage dans chaque puits et incubation à 45°C pendant 15 min (entérocoque) ou 5 min (staphylocoque).
- élimination de la solution de lavage.
- ajout d'1 ml de solution de rinçage et incubation pendant 1 min sous agitation.
- élimination de la solution de rinçage.
- ajout d'1 ml de conjugué dilué (phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine) et incubation sous agitation pendant 30 min (entérocoque) ou 10 min (staphylocoque).
- élimination de conjugué dilué et ajout d'1 ml de solution de rinçage puis agitation pendant 1 min.
- élimination de la solution de rinçage suivie d'une nouvelle étape d'ajout et d'aspiration de cette solution.
- ajout d'1 ml d'eau distillée pour le dernier rinçage.
- ajout d'1 ml de substrat dilué (substrat de la phosphatase alcaline) dans chaque puits et incubation sans agitation pendant 5 min.
- rinçage bref (deux fois) à l'eau distillée pour arrêter la réaction.

A l'aide de pincettes l'opérateur récupère les bandelettes et les sèche entre deux couches de papier absorbant.

Les étapes d'hybridation et de révélation sont schématisées dans la figure suivante :

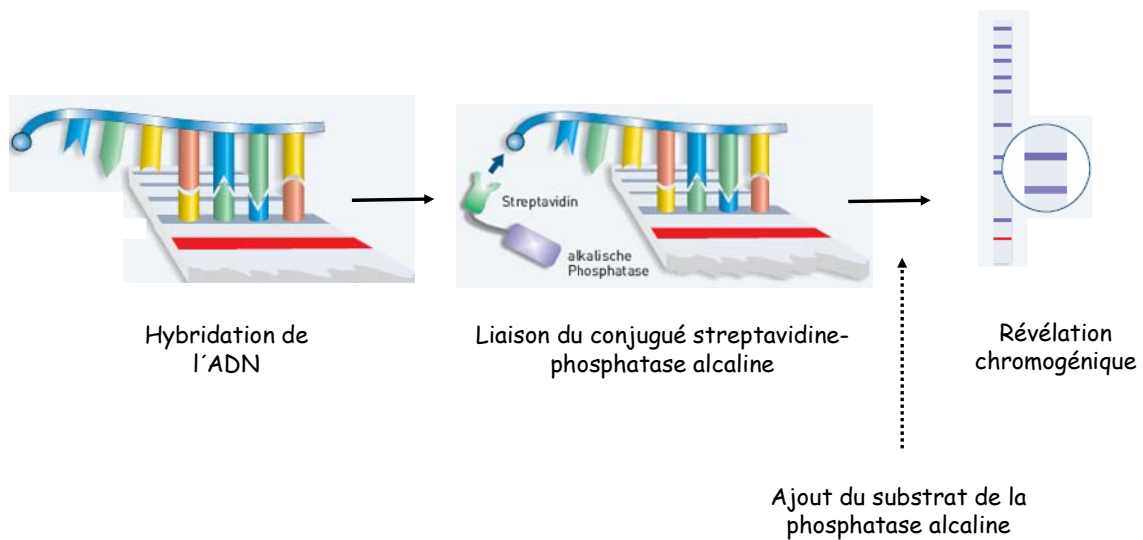


Figure 28 : Etapes d'hybridation et de révélation des produits de la PCR

II. 4. Interprétation des résultats

La matrice fournie avec le test permet d'identifier chaque zone réactionnelle (Figure 29).

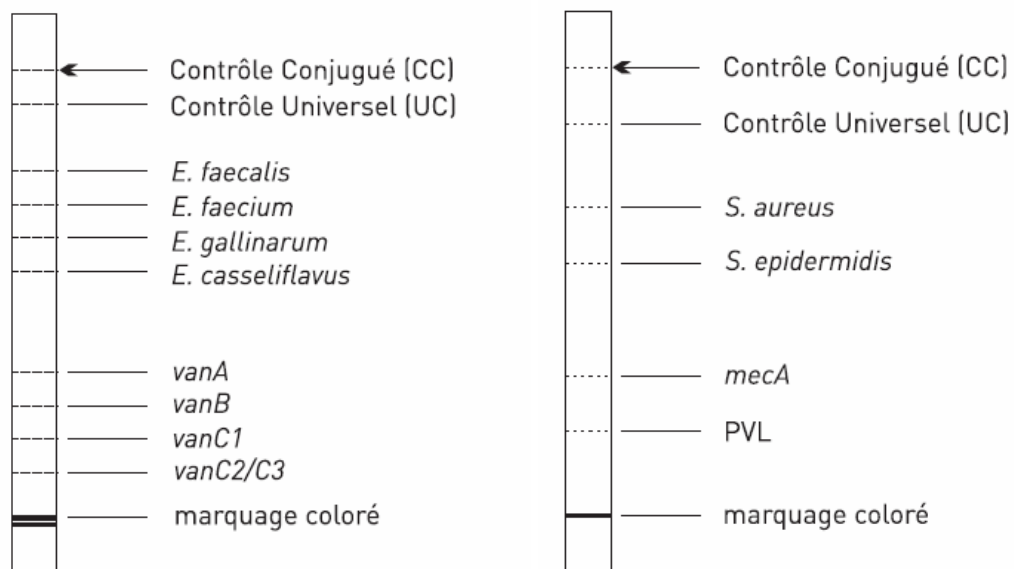


Figure 29 : Matrice pour le test GenoType® Enterococcus (gauche) et pour le test GenoType® MRSA (droite)

Afin de contrôler le bon déroulement du test et la bonne qualité des réactifs, chaque bandelette comporte 2 zones de contrôle :

- une zone de Contrôle Conjugué (CC), où est fixée la biotine qui interagit avec la streptavidine. Elle témoigne de la bonne fixation du conjugué (streptavidine et phosphatase alcaline) sur les zones réactives et du bon déroulement de la révélation chromogénique.
- une zone de Contrôle Universel (UC) qui détecte toutes les espèces bactériennes. Cette zone comprend une sonde s'hybridant au niveau d'une région d'ADN hautement conservée au sein de toutes les espèces bactériennes testées à ce jour, l'ADN ribosomal 23S (63 pb). Le développement d'une ligne colorée dans cette zone reflète la présence d'ADN bactérien dans l'échantillon testé et implique que l'extraction et l'amplification ont été correctes.

Une zone réactionnelle est définie comme positive quand une coloration violette apparaît. Il est à noter, selon le fabricant, que l'amplification du contrôle UC peut être atténuée par compétition avec l'amplification des séquences spécifiques recherchées. D'autre part, l'absence de coloration dans les zones réactives et l'absence de contrôle UC rend le test ininterprétable.

L'ensemencement d'une GSV parallèlement à la réalisation de la PCR-hybridation nous a permis de :

- valider les résultats de la PCR-hybridation des cas d'ERG communiqués sous réserve et en urgence la veille et d'isoler chaque souche pure au contact du disque de vancomycine pour conservation.
- valider les résultats de la PCR-hybridation des cas d'absence d'hybridation au niveau des zones réactionnelles *vanA* et *vanB* pour les souches présentant un aspect caractéristique des colonies suspectes sur ChromId VRE[®] (faux positifs).
- d'identifier d'éventuels contaminants, associés aux CGP, ayant un aspect caractéristique des souches suspectes sur ChromId VRE[®] (faux positifs).
- de réaliser des tests complémentaires à partir des colonies poussant au contact de la vancomycine lors de discordances entre les résultats et en cas de bandelettes ininterprétables.

RESULTATS

I. Détection des ERG

Afin de simplifier l'analyse, nous avons groupé les différents types de résultats en 4 catégories (Figure 30):

- « **ERG +** » : souches de *E. faecium* ou de *E. faecalis* porteuses du gène *vanA* ou du gène *vanB* (résistance acquise).
- « **ERG -** »: souches de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus* ne possédant ni le gène *vanA*, ni le gène *vanB* (absence de résistance acquise). Les souches de *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* présentant une résistance naturelle de bas niveau à la vancomycine (gène *vanC*) ont été classées de manière arbitraire dans cette catégorie.
- « **Bandelette négative** » : souches bactériennes différentes de *E. faecium*, de *E. faecalis*, de *E. gallinarum* et de *E. casseliflavus* et ne portant pas de gènes de résistance détectables. Dans ce cas seuls les contrôles CC et UC étaient positifs.
- les bandelettes « **Ininterprétable** » lorsque seul le contrôle CC était positif (absence de coloration violette dans les zones réactionnelles et dans la zone du contrôle UC).

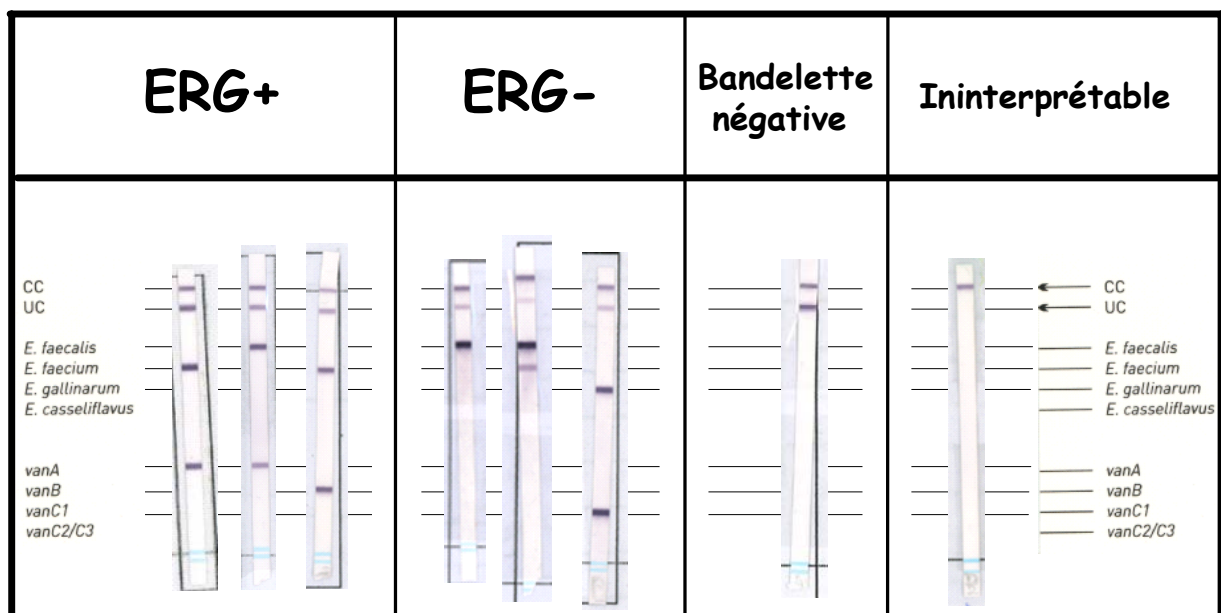
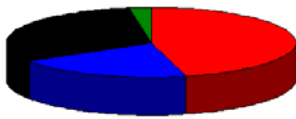


Figure 30 : Exemples illustrant les 4 catégories de résultats

D'août 2007 à juillet 2008, 276 souches ont été analysées par PCR-hybridation : 267 isolées à partir d'écouvillons rectaux (97%) et 9 isolées à partir de prélèvements urinaires (3%). Les résultats sont présentés dans le Tableau 8 et la Figure 31.

Tableau 8 : Résultats obtenus par l'analyse par PCR-hybridation des souches suspectes d'être des ERG

Interprétation	Nombre de souches (n = 276)
« ERG + »	127
« ERG - »	55
« Bandelette négative »	87
« Ininterprétable »	7



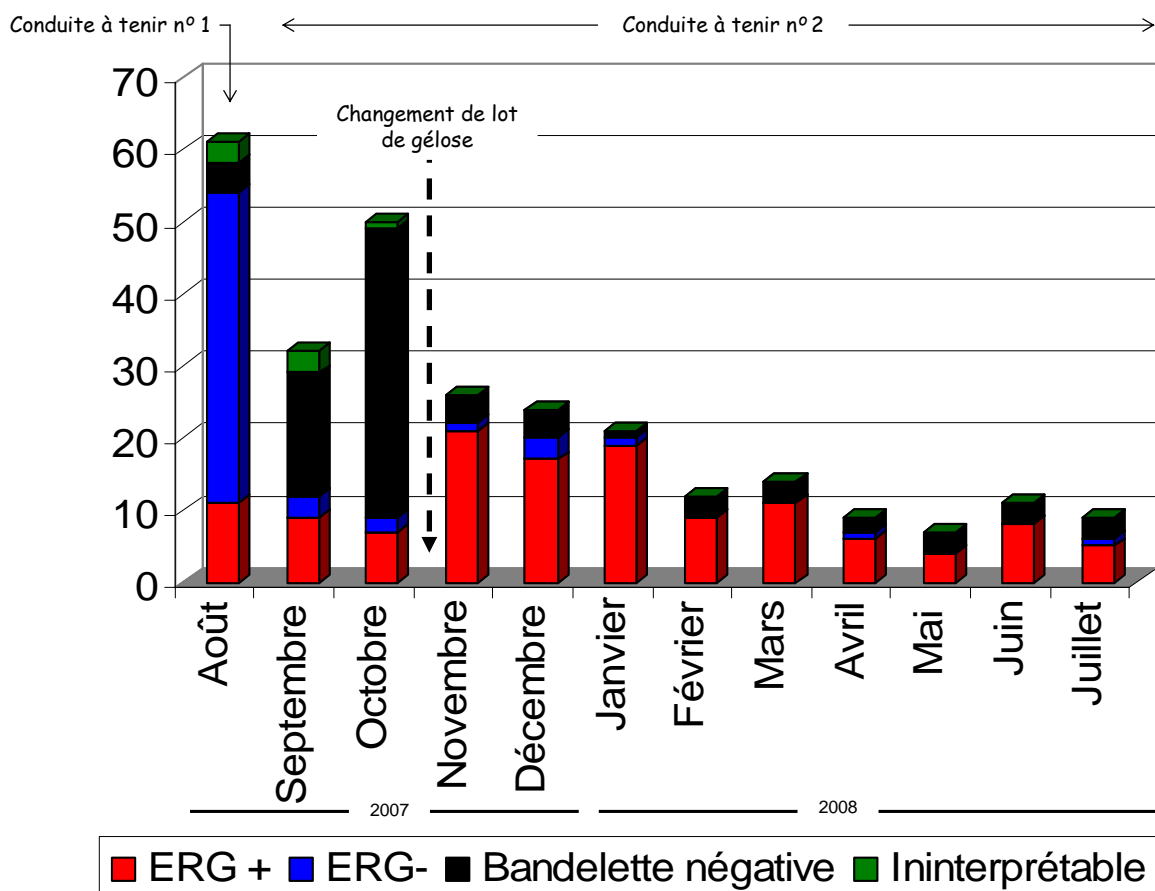


Figure 31 : Répartition chronologique des résultats obtenus par l'analyse par PCR-hybridation des 276 souches suspectes d'être des ERG

Au cours de l'étude, 127 «ERG +» ont été détectés parmi lesquels 123 *E. faecium vanA*, 2 *E. faecium vanB* et 2 *E. faecalis vanA*. Cinq souches d'ERG (*E. faecium vanA*) étaient isolées d'urines alors que toutes les autres souches ont été isolées à partir d'écouvillonnages rectaux.

On observe que le taux de détection des ERG était plus élevé de novembre 2007 à janvier 2008 (Figure 31) ce qui correspond au deuxième pic épidémique observé en 2007 au CHU de Nancy (Figure 13). Parmi les 123 *E. faecium vanA*, 92% étaient résistants à l'ampicilline. Toutes les souches étaient résistantes à la plupart des autres antibiotiques testés en dehors du linézolide et du chloramphénicol. Pour ce qui concerne les aminosides, des hauts niveaux de résistance étaient observés pour la gentamicine et la kanamycine alors que la résistance acquise à la streptomycine était variable selon les souches. Neuf souches de *E. faecium vanA* et une souche de *E. faecium vanB*, présentaient une sensibilité à l'ampicilline. L'analyse du polymorphisme de macrorestriction (après digestion par l'enzyme *SmaI* et ECP) de l'ADN chromosomique des souches de *E. faecium vanA* (n° 1 à 9) a montré que celles-ci étaient différentes de la souche épidémique de *E. faecium vanA* isolée à Nancy (Figure 32). Par ailleurs, si une certaine variabilité des profils de macrorestriction était observée pour ces souches, il est à souligner que les pulsotypes obtenus pour certaines d'entre-elles présentaient moins de 3 bandes de différence. Ces souches pouvaient être considérées, selon les critères de Tenover [184], très proches sur un plan clonal : il s'agit d'une part des souches 3, 5, 7 et 9 et d'autre part des souches 2 et 6.

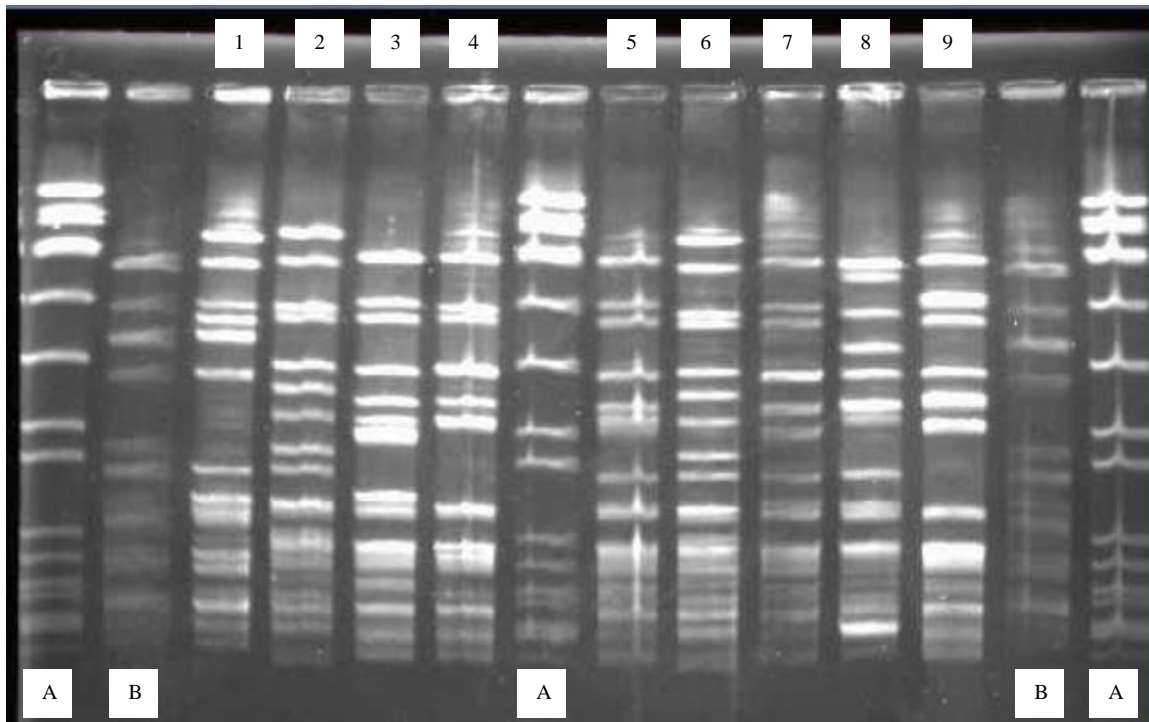


Figure 32 : ECP des souches de *E. faecium vanA* sensibles à l'ampicilline

(A = *S. aureus* NCTC 8523 (marqueur de poids moléculaire)

B = souche épidémique nancéienne de *E. faecium vanA* résistante à l'ampicilline)

La majorité des résultats « ERG -> » ont été observés avec des souches de *E. faecalis* (50 des 55 cas « ERG -> »). Ce phénomène a été essentiellement observé au mois d'août 2007 (Figure 31). Pour l'ensemble de ces souches un diamètre d'inhibition ≥ 17 mm était observé autour du disque de vancomycine. Il s'agissait de souches sensibles aux glycopeptides capables de croître sur les géloses ChromId VRE[®]. Ce phénomène a été rapporté par bioMérieux comme étant dû, au moins en partie, à un inoculum particulièrement chargé après ensemencement direct et après 48 h d'incubation. Il est souligner que ce phénomène est plus fréquemment observé avec *E. faecalis* qui correspond à l'espèce d'entérocoque prépondérante dans les selles [185]. Après avoir vérifié que ce problème n'était pas lié à un lot de géloses particulier, nous avons modifié notre procédure en incluant, dans le cas de colonies bleu-vertes, une étape de culture supplémentaire sur gélose Muller-Hinton avec disques de vancomycine et de teicoplanine (conduite à tenir n°2 Figure 26). Cette modification n'a pas eu d'influence sur le délai de détection des patients porteurs de la souche épidémique de *E. faecium vanA* et a par contre permis de réduire considérablement les cas « ERG -> » à partir de septembre 2007. Ainsi de septembre 2007 à juillet 2008, seules 7 souches suspectes d'être des *E. faecalis* résistants à la vancomycine ont fait l'objet d'une

analyse par PCR-hybridation qui a permis de détecter parmi ces souches 2 cas de *E. faecalis* *vanA*, les 5 autres souches étant des *E. faecalis* sensibles aux glycopeptides.

La majorité des souches suspectes d'être des ERG pour lesquelles un résultat « Bandelette négative » a été observé, étaient des CGP naturellement résistants aux glycopeptides incluant en particulier des souches de *Pediococcus* spp. (68 cas sur 87). Ce phénomène a été majoritairement observé au cours des mois de septembre et octobre 2007 (Figure 31). Pour l'ensemble de ces souches un diamètre contact au disque de vancomycine a été observé. Ce phénomène est rapporté par bioMérieux qui précise qu'il existe une limite à la sélectivité du milieu. En effet, d'après la fiche technique, certaines bactéries à Gram positif présentant une résistance naturelle de haut niveau à la vancomycine peuvent se développer sur le milieu ChromId VRE[®] et former des colonies ayant l'aspect de colonies suspectes. Cependant, le taux très élevé de ces faux positifs (53% à 80% des cultures « suspectes » sur ChromId VRE[®] en septembre et octobre 2007), nous a conduit à réaliser une déclaration de réactovigilance auprès de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et à en informer le fabricant. Un changement de lot de géloses chromogènes a permis de résoudre en grande partie ce problème. Et à partir de novembre 2007, la proportion des ces souches faussement suspectes ne représentait plus que 1 à 3 cas par mois parmi l'ensemble des souches suspectes sur milieu chromogène et reflétait la limite de sélectivité du milieu ChromId VRE[®] fabriqué dans de bonnes conditions.

Cette limite explique également que d'autres micro-organismes naturellement résistants aux glycopeptides, mais a priori inhibés par d'autres composants du mélange inhibiteur, peuvent croître sur ce milieu (levures et BGN). Les colonies correspondantes peuvent avoir un aspect pouvant les faire confondre avec des colonies suspectes d'être des *E. faecalis* ou des *E. faecium* (Figures 33 et 34). Dans un certain nombre de cas, la croissance de CGP (*E. faecium* ou *E. faecalis* sensibles aux glycopeptides ou autres CGP pouvant prendre l'aspect des colonies suspectes) associée à celle de ces micro-organismes a été observée sur milieu ChromId VRE[®]. Dans ces cas, l'analyse par PCR-hybridation de la suspension des colonies a donné lieu à des résultats du type « ERG -> » ou « Bandelette négative ». L'interprétation de ces résultats nécessite l'adjonction d'une GSV qui permet de montrer soit l'absence de CGP dans la zone d'inhibition soit la présence de CGP naturellement résistants en particulier de pédiocoques qui peuvent facilement être identifiés par l'absence de pyrrolidonyl arylamidase (PYR négatif).



Figure 33 : Aspect morphologique de levures sur ChromID VRE[®]



Figure 34 : Aspects morphologiques d'un BGN associé à un *E. faecium* sur ChromID VRE[®]

Des résultats de PCR-hybridation de type « Ininterprétable » n'ont été observés que pour 7 des 276 souches testées (2,5%). Dans ces cas, aucune coloration violette n'est apparue dans la zone réactionnelle du contrôle UC. Cette zone correspond à une sonde d'hybridation ciblée sur une région hautement conservée dans la plupart des espèces bactériennes (ADN ribosomal 23S). Ainsi, l'absence de signal dans la zone UC reflète théoriquement l'absence d'ADN bactérien dans l'échantillon testé. Toutefois pour chacun de ces cas, la présence de CGP différents de *E. faecium* ou *E. faecalis* résistants aux glycopeptides a été confirmée par une subculture réalisée à partir de la même suspension que celle utilisée pour l'analyse par PCR-hybridation.

II. Détection des SARM LPV

D'août 2007 à septembre 2008, 14 souches de *S. aureus* isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique ont été étudiées par PCR-hybridation. Les critères d'inclusion étaient les suivants : antibiotype caractéristique du clone ST80 (n = 9) et/ou contexte clinique pouvant faire évoquer l'existence d'une souche productrice de LPV (n = 12) (Tableaux 9 et 12). Dix souches se sont révélées être des SARM LPV. Parmi ces dernières, 7 présentaient un antibiotype caractéristique et un contexte clinique suspect, 1 était isolée d'abcès mais ne présentait pas cet antibiotype caractéristique (Tableau 10) et 2 étaient isolées d'infections nosocomiales. Aucun cas de pneumopathie nécrosante, de pneumopathie sévère communautaire du sujet jeune ou d'infection ostéo-articulaire à *S. aureus* n'a été observé durant la période de l'étude.

Tableau 9 : Caractéristiques démographiques, cliniques et épidémiologique des patients infectés par des souches de SARM LPV présentant ou non un antibiotype caractéristique du clone ST80

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Mme C	Mr M	Melle B	Melle F	Mr K	Enf. R	Mr T	Mr L	Mme Z	Mme M
Age	24 ans	26 ans	16 ans	15 ans	78 ans	20 mois	29 ans	36 ans	37 ans	29 ans
Sexe	F	M	F	F	M	F	M	M	F	F
Non caucasien	+	+	+	NR	NR	NR	+	+	+	NR
Infection :										
Nature	Abcès axillaire	Liée au cathéter	Abcès abdominal	Abcès genou	ISO	Abcès cuisse	Abcès main	Abcès main	Abcès cuisse	Abcès main
Communautaire	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Antibiotype « ST80 »	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Portage de SARM LPV	+	ND	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND

(F = féminin ; M = masculin ; NR = non renseigné ; ISO : infection du site opératoire ; ND = Non déterminé)

Tableau 10 : Sensibilité aux antibiotiques des 10 souches de SARM LPV positives

Méticilline	Kanamycine	Tobramycine	Gentamicine	Acide fusidique	Erythromycine	Lincomycine	Pristinamycine	Fluoroquinolones	Tétracycline	Rifampicine	Nombre de souches
R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	R	S	4
R	R	S	S	I/R	R	S	S	S	R	S	3
R	R	S	S	I/R	R	S	S	S	S	S	1
R	R	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	1
R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1

Pour les 4 souches de *S. aureus* non productrices de LPV les antibiotypes étaient différents de l'antibiotype caractéristique du clone ST80 (Tableau 11).

Tableau 11 : Sensibilité aux antibiotiques des 4 souches de *S. aureus* LPV négatives

Pénicilline G	Méticilline	Kanamycine	Tobramycine	Acide fusidique	Erythromycine	Tétracycline	Nombre de souches
R	S	S	S	S	S	S	2
R	S	R	S	S	R	S	1
S	S	S	S	S	R	S	1

Les caractéristiques démographiques et cliniques des patients infectés par ces souches sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 12 : Caractéristiques démographiques et cliniques des patients infectés par des souches de *S. aureus* LPV négatives

	1	2	3	4
Age (ans)	23	22	12	49
Sexe	M	M	F	F
Infection : Nature	Phlyctène et nécrose (pied)	Abcès main	Pneumopathie sévère	Pyomyosite
Communautaire	+	+	+	-

Dans le cadre d'investigations destinées à évaluer le portage nasal ou cutané des patients infectés et/ou l'éventuelle diffusion intrafamiliale ou intrahospitalière des souches, nous avons réalisé une recherche de portage chez certains patients et sujets contacts.

Parmi les 10 patients infectés par un SARM LPV, une recherche de portage nasal, cutané (plis inguinal, creux axillaire, lésion cutanée), vaginal ou rectal de SARM LPV a été réalisée chez 4 patients (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des prélèvements à visée épidémiologique réalisés chez 4 patients infectés par un SARM LPV

Zone ^a Patient	Nez	Axillaire	Inguinal	Lésion cutanée	Rectal	Vaginal
M ^{me} C	+	-	-	-	-	-
M ^{lle} B	+	-	-	-	-	-
M ^{lle} F	-	-	-	-	-	-
M ^r K	-	-	-	-	-	-

^a : Recherche de portage effectué 2 fois chez M^{me} C, une seule fois chez M^{lle} B et M^{lle} F et 4 fois chez M^r K

Ce dépistage a révélé la présence d'un SARM LPV pour 2 patients au niveau des fosses nasales :

- Chez M^{lle} B, la souche isolée au niveau des fosses nasales était identique pour ce qui concerne l'antibiotype et très proche en ce qui concerne le pulsotype de celle isolée au niveau du site infectieux (Figure 35).

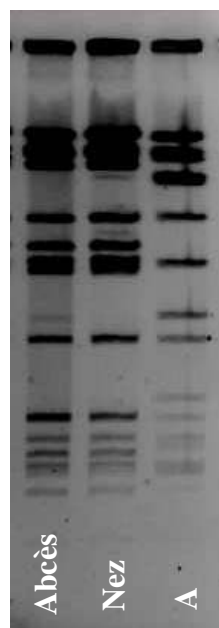


Figure 35 ; ECP des souches de SARM LPV isolées chez M^{lle} B

A= Staphylococcus de référence NCTC 8523 (marqueur de poids moléculaire)

- Chez M^{me} C, le pulsotype de chacune des 2 souches isolées au niveau des fosses nasales (souches M^{me} C2 et 3) était identique à celui de la souche isolée au niveau du site infectieux (souche M^{me} C1) (Figure 37). Cette dernière présentait le même antibiotype (kanamycine^R gentamicine^S, tobramycine^S, acide fusidique^{I/R} et érythromycine^R) que l'une des 2 souches isolées au niveau des fosses nasales lors des dépistages. La souche isolée lors du second prélèvement des fosses nasales était uniquement résistante à la kanamycine et à l'érythromycine mais sensible à l'acide fusidique (Tableau 14).

Tableau 14 : Antibiogrammes des différents SARM LPV isolés chez M^{me} C

	M ^{me} C 1 Abscess	M ^{me} C 2 Nez	M ^{me} C 3 Nez
Pénicilline G	R	R	R
Méticilline	R	R	R
Kanamycine	R	R	R
Tobramycine	S	S	S
Gentamicine	S	S	S
Minocycline	S	S	S
Erythromycine	R	R	R
Lincomycine	S	S	S
Pristinamycine	S	S	S
Quinupristine/Dalfopristine	S	S	S
Cotrimoxazole	S	S	S
Lévofoxacine	S	S	S
Nitrofurantoïne	S	S	S
Acide fusidique	R	R	S
Vancomycine	S	S	S
Teicoplanine	S	S	S
Rifampicine	S	S	S
Fosfomycine	S	S	S
Linézolide	S	S	S
Tétracycline	S	S	S

Parmi les 6 patients infectés par un SARM LPV et hospitalisés, 2 étaient encore hospitalisés au moment de la détection du SARM LPV par PCR-hybridation (J4). Un de ces patients, avait été placé en isolement probabiliste. Suite au rendu des résultats, le deuxième a lui aussi été placé en isolement. Parmi les sujets « contacts » de ce dernier, aucun cas secondaire n'a été observé dans la limite de leur hospitalisation au CHU.

Pour 2 cas, la notion d'infections cutanées répétées (a priori à *S. aureus*) des sujets et d'au moins un membre de leur famille a été notée. Conformément aux recommandations canadiennes [186], une recherche de portage a été proposée pour les sujets concernés. Alors

que cette recherche a été refusée par la famille de M^{elle} B, cette recherche a pu être réalisée au sein de la famille de M^{me} C chez toutes les personnes vivant sous le même toit ainsi que chez l'ensemble des enfants d'une crèche familiale dans laquelle était gardée l'enfant de M^{me} C. Il est noter que M^{me} C était alors enceinte (premier mois, seconde grossesse) et que son premier enfant avait présenté, 15 jours après sa naissance, une éruption furonculaire sur le tronc et la face qui avait justifié une hospitalisation et un traitement par cloxacilline. La recherche de portage s'est révélée négative pour les 15 sujets contacts au sein de la crèche. Cette recherche a été réalisée à 5 reprises au sein de la famille (Figure 36).

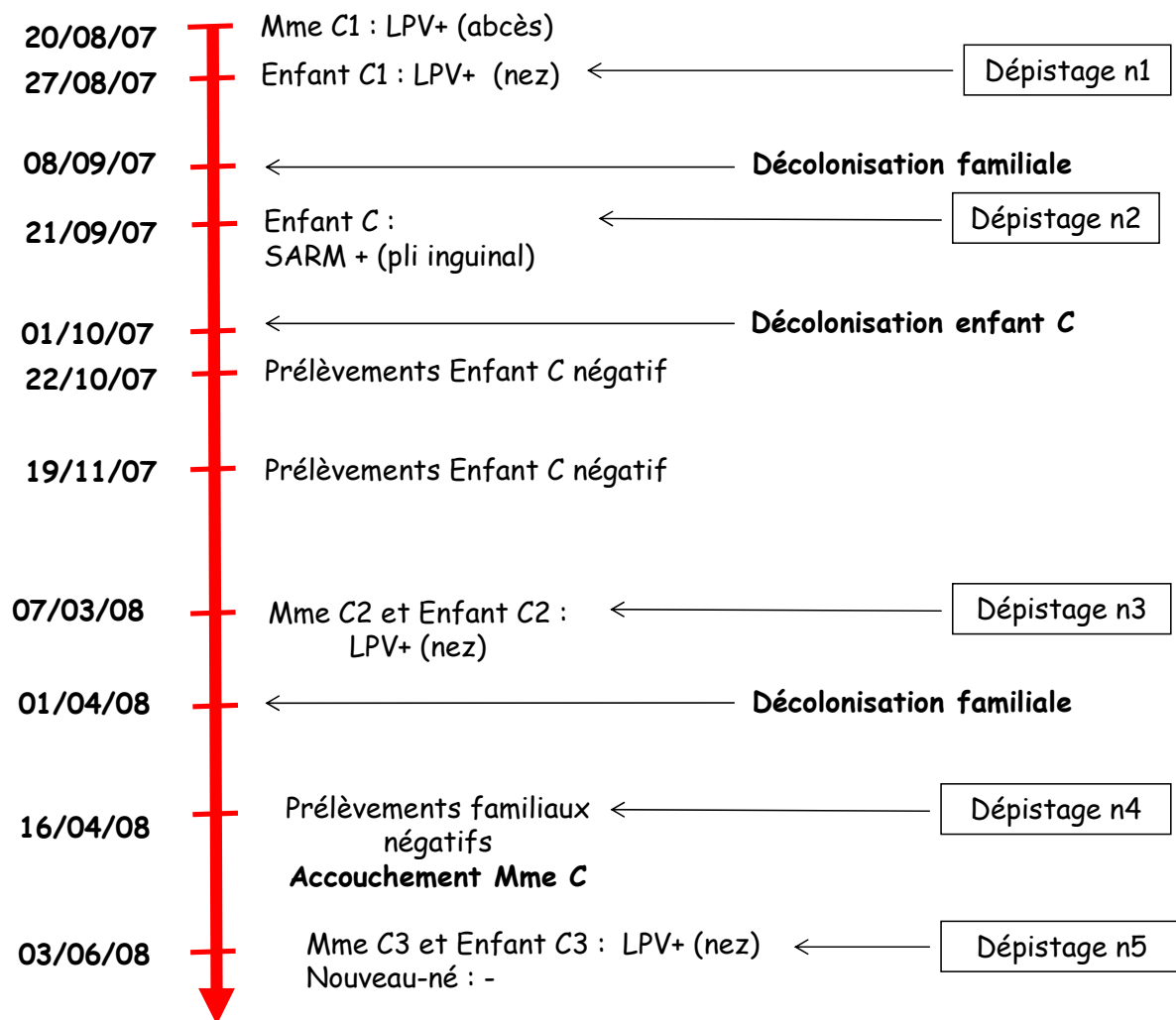


Figure 36: Etapes du suivi de M^{me} C et de sa famille avant et après l'accouchement

Un portage a été retrouvé à plusieurs reprises chez M^{me} C (souches M^{me} C2 et C3) et son fils (souches Enfant C1, C2 et C3) alors que les autres membres de la famille n'étaient pas porteurs de SARM. Un rappel des mesures d'hygiène a été réalisé et une décolonisation cutanéomuqueuse (mupirocine nasal et Hibiscrub en toilette cutanée pendant 5 jours) a été menée à 3 reprises chez l'enfant et à 2 reprises chez les parents (Figure 36). Il est à souligner que les différentes souches isolées étaient toujours sensibles à la mupirocine. Si la décolonisation a été a priori transitoirement effective peu avant l'accouchement de M^{me} C, une recolonisation a pu être mise en évidence 1 mois et demi après l'accouchement chez M^{me} C et son premier enfant. Une recherche de portage chez le nouveau-né s'est révélée quant à elle négative et aucune infection n'a été observée chez lui dans les semaines suivant sa naissance. Alors que les 6 souches isolées chez M^{me} C et son fils présentaient des antibiogrammes variables (Tableau 15), les pulsotypes obtenus avec ces souches étaient strictement identiques (Figure 37).

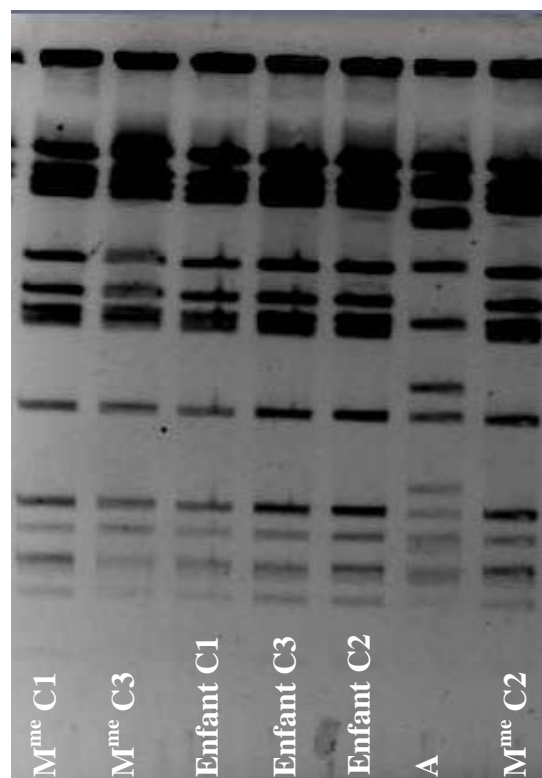


Figure 37 : ECP des souches de SARM LPV isolées chez M^{me} C et son enfant

A= *Staphylococcus* de référence NCTC 8523 (marqueur de poids moléculaire)

Il est à souligner que les souches isolées en août 2007 chez la mère et l'enfant avaient le même antibiotype. Cet antibiotype était différent de ceux observés ultérieurement pour les souches isolées chez l'enfant. D'autre part, la souche isolée chez la mère après l'accouchement présentait le même antibiotype que la souche isolée au même moment chez son premier enfant (Tableau 15).

Tableau 15 : Antibiogrammes des différents SARM LPV isolés chez M^{me} C et son enfant

	M ^{me} C 1 Absès	M ^{me} C 2 Nez	M ^{me} C 3 Nez	Enfant C 1 Nez	Enfant C 2 Nez	Enfant C 3 Nez
Pénicilline G	R	R	R	R	R	R
Méticilline	R	R	R	R	R	R
Kanamycine	R	R	R	R	R	R
Tobramycine	S	S	S	S	S	S
Gentamycine	S	S	S	S	S	S
Minocycline	S	S	S	S	S	S
Erythromycine	R	R	R	R	S	R
Lincomycine	S	S	S	S	S	S
Pristinamycine	S	S	S	S	S	S
Quinupristine/Dalfopristine	S	S	S	S	S	S
Cotrimoxazole	S	S	S	S	S	S
Lévofloxacine	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoïne	S	S	S	S	S	S
Acide fusidique	R	R	S	R	R	S
Vancomycine	S	S	S	S	S	S
Téicoplanine	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	S	S	S	S	S	S
Fosfomycine	S	S	S	S	S	S
Linézolide	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	S	S	S	S	S	S

DISCUSSION

La recherche de facteurs de virulence tels que les toxines bactériennes est possible via des modèles expérimentaux *in vitro* (cellules) ou *in vivo* (animaux). Ces méthodes sont longues, coûteuses et non applicables en routine. La seconde alternative, plus rapide, repose sur des méthodes génotypiques. Avant la commercialisation de la méthode de PCR-hybridation par Hain Lifescience en 2007, la mise en évidence de souches productrices de LPV était uniquement réalisable à l'aide de « PCR maison » ciblant de manière spécifique les gènes *luk* ou un plus grand nombre de gènes (gènes spécifiques d'espèces, gènes codant différents facteurs de virulence, et gène *mecA*). L'utilisation de « PCR maison » nécessitait une mise en place et une validation de la méthode, non réalisable par tous les laboratoires. Ainsi, la plupart d'entre eux adressaient leurs souches suspectes d'être productrices de LPV au CNR des staphylocoques (Lyon) qui utilise une PCR multiplex « maison » permettant de caractériser le profil toxinique, incluant la LPV, des souches de *S. aureus*. Ceci générait un surcoût non négligeable (189 € par souche testée) avec un délai d'obtention des résultats supérieur à une semaine.

Pour ce qui concerne la détection des ERG, des méthodes phénotypiques et/ou génotypiques peuvent être utilisées en routine que ce soit dans le cadre du diagnostic d'une infection à ERG ou dans celui d'une recherche de portage. En période épidémique, il est cependant nécessaire de privilégier l'emploi d'une technique rapide et performante d'un point de vue analytique. Sachant qu'il n'existe pas de technique idéale, il faut trouver le meilleur compromis parmi les techniques disponibles sur le marché. La plupart des laboratoires utilisent en routine des méthodes phénotypiques. La difficulté de différencier, par ces méthodes, des souches qui exposent à un risque épidémique de celles qui n'exposent pas à ce risque (souches naturellement résistantes) est réelle malgré l'utilisation de milieux chromogènes dits sélectifs. La littérature rapporte les limites de ces méthodes phénotypiques qui permettent de réaliser une identification, un antibiogramme et d'extrapoler le génotype de résistance éventuel. Différentes méthodes phénotypiques semi-automatisées - telles que les systèmes Vitek2[®] (bioMérieux), Phoenix[®] (BD diagnostics) ou MicroScan[®] (Siemens) - sont actuellement utilisées à ce titre dans un grand nombre de laboratoires. Des erreurs concernant l'identification des entérocoques et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques ont été rapportées pour l'ensemble de ces systèmes [187-193], Pour ce qui concerne le système Vitek2[®], système utilisé dans notre laboratoire, les erreurs portent essentiellement sur

l'identification de *E. faecium* dont la différenciation avec d'autres espèces d'entérocoques, en particulier celles présentant une résistance naturelle aux glycopeptides, peut être difficile. Dans ce cas, des taux d'erreurs d'identification variant de 6 à 63% ont été rapportés [187-191]. Pour ce qui concerne les résultats d'étude de la sensibilité aux glycopeptides, des taux d'erreurs variant de 2 à 13% ont également été rapportés, lorsque le système Vitek2[®] était utilisé. Ces erreurs étaient principalement observées avec la teicoplanine et étaient à l'origine d'une interprétation erronée (phénotype VanB au lieu de phénotype VanA).

L'enquête nationale de l'ONERBA réalisée 2006 pour évaluer l'importance du portage digestif d'ERG dans les hôpitaux français, illustre les difficultés rencontrées avec les méthodes phénotypiques [70]. Soixante treize laboratoires volontaires utilisant différentes méthodes de diagnostic ont participé à cette étude. Parmi les 86 souches identifiées par ces laboratoires et envoyées au CNR des entérocoques, 67 souches appartenant à des espèces naturellement résistantes aux glycopeptides (*E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*) avaient été identifiées à tort comme appartenant à l'espèce *E. faecium* et 19 souches de *E. faecium* avaient été bien identifiées. Cependant, parmi ces dernières, seules 12 souches présentaient réellement une résistance aux glycopeptides, alors que 7 avaient été à tort considérées comme résistantes aux glycopeptides.

Dans notre étude, 2 erreurs d'identification (1 souche de *E. faecalis* identifiée *E. faecium* et 1 souche de *E. faecium* identifiée *E. gallinarum*) et 4 erreurs concernant des résultats d'antibiogrammes (souches sensibles aux glycopeptides considérées à tort comme étant de sensibilité intermédiaire à la vancomycine) ont été recensées lors de l'analyse par le système Vitek2[®] des 276 souches incluses.

Les données de la littérature et nos observations illustrent la nécessité des recommandations du CASFM concernant la caractérisation des souches d'ERG : il est en effet recommandé de vérifier l'identification des ERG (en cas d'infection sévère) et, de déterminer les CMI lorsque les souches sont catégorisées, par des méthodes automatisées, comme étant de sensibilité réduite à au moins l'un des deux glycopeptides [183]. Les méthodes génotypiques, telles que la PCR-hybridation, apportent donc un avantage significatif par rapport aux méthodes phénotypiques en raison de leur rapidité de mise en œuvre et de leur spécificité. Par cette dernière, les résultats obtenus ne sont pas soumis aux variations auxquelles sont sujets les caractères phénotypiques.

L'utilisation de ces méthodes génotypiques et leur diffusion la plus large possible au sein des laboratoires d'analyses de biologie médicale, nécessitent que des méthodes

standardisées (marquage CE) soient commercialisées. Les méthodes de « PCR maison » ne répondent pas à cette exigence essentielle. C'est ainsi que le STIC a été l'occasion de remplacer, dans notre laboratoire, la méthode de « PCR maison » utilisée jusqu'alors [194]. Par ailleurs, afin d'assurer l'homogénéité de la méthode de dépistage dans les laboratoires de biologie médicale lorrains, tout en prenant en compte la nécessité de recourir à des méthodes de biologie moléculaire, un mode opératoire a été diffusé par notre laboratoire et sous couvert du CCLIN-Est, sous forme d'une fiche technique fin octobre 2007 [84] (annexe 2). Il y a été spécifié que lorsqu'une souche était mise en évidence par méthode phénotypique, l'envoi de cette souche au laboratoire de microbiologie du CHU était proposé pour en confirmer l'identification, rechercher les gènes *vanA* ou *vanB* et réaliser une éventuelle étude épidémiologique (typage moléculaire). Ceci a conduit à créer en région Lorraine un laboratoire référent de proximité, et de ce fait, a permis d'éviter l'envoi systématique des souches au CNR des entérocoques et donc de réduire le délai d'obtention des résultats.

Avant de réaliser des analyses génotypiques, un « screening » des souches peut être réalisé afin de réduire le nombre de ces analyses moléculaires dont les coûts financiers et humains ne sont pas négligeables. Cette approche a été utilisée dans notre étude pour ce qui concerne la recherche de portage d'ERG et pour la détection de SARM LPV. La méthode de « screening » se doit d'être performante en particulier en termes de sensibilité mais aussi de valeur prédictive positive. En effet, en cas de faux positifs, le délai de rendu des résultats est prolongé. Une culture initiale sur ChromId VRE[®] était la méthode de « screening » utilisée pour le dépistage de portage d'ERG. Cette gélose a été choisie au laboratoire après comparaison des différents milieux commercialisés pour le dépistage des ERG. Des limites concernant l'identification présomptive des espèces *E. faecium* et *E. faecalis* sur ChromId VRE[®] ont été néanmoins rapportées par certains auteurs ayant étudié la sensibilité et la spécificité de l'ensemencement direct d'écouvillons rectaux [195, 196]. Ainsi, la lecture des cultures après la 48^{ème} h d'incubation est plus sensible que celle réalisée à 24 h pour ce qui concerne *E. faecium*. Cependant, à 48 h, l'identification présomptive des colonies suspectes est moins spécifique (croissance de levures et de BGN). Lors de notre étude, nous avons rencontré de nombreuses reprises de faux cas suspects sur cette gélose sélective. Les données de la littérature [197] et nos observations illustrent la nécessité de confirmer la présence de CGP par examen microscopique et de vérifier, idéalement par méthode génotypique, l'existence d'une résistance aux glycopeptides.

Concernant le « screening » des souches de *S. aureus* LPV, des critères cliniques et/ou bactériologiques ont été utilisés dans notre étude. Nous avons constaté qu’une sélection uniquement basée sur un contexte clinique suspect ou une origine communautaire ne permettait pas de prédire la présence de souches productrices de LPV (Tableau 12). L’antibiotype s’est révélé plus prédictif pour ce qui concerne l’existence de ces souches (Tableaux 10 et 11).

A l’instar de l’enquête nationale menée par l’ONERBA en 2008 [2], les SARM LPV isolés dans le cadre de notre étude étaient le plus souvent résistants à la tétracycline et sensibles aux macrolides et apparentés (Tableau 16). Toutes les souches étaient également sensibles à la rifampicine.

Tableau 16 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de SARM LPV isolés dans des prélèvements à visée diagnostique à Nancy et au niveau national [2]

	Souches de SARM LPV isolées	
	à Nancy (n=10)	en France (n=58)
Fluoroquinolones ^S , gentamicine ^S et acide fusidique ^R	90%	100%
Kanamycine ^R	100%	100%
Tobramycine ^R	0%	0%
Macrolides et apparentés ^S	60%	71%
Erythromycine ^R	40%	24%
Erythromycine et lincosanides ^R	0%	2%
Pristinamycine ^R	0%	3%
Tétracyclines ^R	70%	73%
Rifampicine ^R	0%	0%
Acide fusidique ^S	10%	0%

Il est à remarquer que, parmi l’ensemble des 10 souches de SARM LPV responsables d’infections, une seule, isolée à partir d’un pus d’abcès, était sensible à l’acide fusidique (CMI = 0,023 mg/l [2-16 mg/l]). D’autre part, dans le cadre de l’étude du portage familial autour de M^{me} C, 2 souches également sensibles à cet antibiotique ont été isolées (CMI respectives = 0,032 et 0,064 mg/l) (Tableau 15). Parmi les souches isolées en Europe et appartenant au clone ST80, la résistance à l’acide fusidique a été observée dans 86 à 100% des souches [198-200]. La sensibilité à cet antibiotique est donc peu fréquente en Europe à l’inverse des Etats-Unis où les souches appartenant au clone majoritaire ST8 (USA 300), qui est responsable dans certaines régions de plus de 50% des infections causées par l’ensemble

des souches de *S. aureus* [201], sont sensibles à l'acide fusidique. Du fait de la dissémination d'un clone unique en France (clone européen ST80), l'existence d'un antibiotype caractéristique associé à ce clone permet de suspecter de manière fortement probable une souche de SARM LPV. Cependant, des souches productrices de LPV sensibles à l'acide fusidique ou à l'inverse multirésistantes ont été rapportées en Europe et notamment en France. Ainsi, en cas d'une infection faisant suspecter la présence d'un SARM LPV, l'absence d'antibiotype caractéristique (clone ST80) ne permet pas d'éliminer formellement l'existence d'une souche productrice de LPV. Ceci justifie donc la recherche systématique des gènes codant la LPV dans ces cas, d'autant plus que des souches de SARM LPV peuvent être également impliquées.

En situation épidémique, l'enjeu médico-économique pour un laboratoire de biologie médicale est double : assurer le meilleur service tout en optimisant sa propre productivité. La situation épidémique à Nancy a nécessité la mise en place de dépistages rectaux systématiques. Les patients nouvellement admis, ayant des antécédents de séjour dans des services ayant accueilli au cours des 3 derniers mois un ou plusieurs patients ERG+ « excréteurs », devaient être prélevés à leur entrée et placés en isolement probabiliste de type précautions « contact » [84]. Si ce prélèvement d'entrée s'avérait négatif, l'isolement pouvait être levé. Ainsi, le délai de réponse des cas négatifs se devait d'être rapide afin de limiter la durée de ces isolements. L'étape incompressible a été la période de culture du prélèvement sur ChromId VRE[®]. En effet, 48 h sont nécessaires pour valider l'absence de croissance d'ERG sur la gélose. On peut estimer que le délai nécessaire pour un laboratoire travaillant uniquement avec des méthodes phénotypiques (gélose chromogène sélective et identification biochimique) et adressant ses souches au CNR des entérocoques pour confirmation (ou non) du caractère ERG suspecté est d'environ 10 jours (culture : 2 jours, identification et antibiogramme : 2 jours, transport et réception des souches : 2 jours, analyses au CNR : 2 jours et marge [week-end] : 2 jours). Pour un cas négatif, c'est à dire en l'absence de croissance sur gélose chromogène, le résultat est rendu en 2 jours. Pour un laboratoire utilisant la PCR-hybridation comme méthode de confirmation (ou d'infirmer), comme ce fût le cas dans notre étude, les résultats positifs ou négatifs de recherche d'ERG sont répondus en 2 jours. Les faux positifs sur gélose sélective sont répondus négatifs en 3 à 4 jours. Le gain de temps apporté par la PCR-hybridation est indéniable en comparaison de l'envoi de la souche au CNR.

Au vu du contexte épidémique au CHU de Nancy, une méthode de PCR en temps réel aurait pu paraître idéale pour le diagnostic des ERG. Il s'agit d'une méthode réalisable soit à partir d'une culture bactérienne soit directement à partir du prélèvement. A partir du prélèvement, le résultat est obtenu environ 4 h après l'arrivée de l'écouvillon au laboratoire. Toutefois, cette méthode présente 3 inconvénients majeurs:

- l'extraction du matériel génétique directement à partir de l'écouvillon ne permet pas en première intention un isolement des souches en culture pour des analyses complémentaires (antibiogramme et étude épidémiologique) [202].
- la présence fréquente d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les prélèvements de selles. Ce problème peut être en partie résolu par l'utilisation d'une culture en milieu liquide (bouillon d'enrichissement) [203].
- l'absence d'identification simultanée de l'espèce et du gène *van*. Ainsi, du fait de la présence d'anaérobies dans les selles pouvant héberger *vanB* [204, 205], la détection isolée de ce gène manque de spécificité pour ce qui concerne la recherche d'ERG. Une culture de confirmation parallèle en aérobiose est nécessaire, reportant le résultat final à J2 [206].

Au CHU de Nancy, la souche épidémique étant un *E. faecium vanA*, une recherche par PCR en temps réel aurait cependant pu être envisagée. Disposant d'un LightCycler® pour d'autres analyses, ce choix n'a pas été retenu en raison d'un flux trop important d'écouvillons de dépistage en particulier au moment des pics épidémiques (jusqu'à 350 écouvillons par jour). En effet, l'extraction de l'ensemble des échantillons, à l'aide du seul automate d'extraction (MagnaPure®) dont nous disposons et qui ne permet de traiter que 32 écouvillons par tranche de 2h50, n'aurait pas été possible dans des délais raisonnables,.

L'avantage de la PCR en temps réel réside essentiellement dans le fait qu'elle permet d'obtenir des résultats en 1 jour, après une incubation de 24 h en bouillon d'enrichissement. Cette méthode permet donc par rapport à la méthode couplant un « screening » par gélose sélective à une PCR-hybridation, de réduire le délai d'obtention des résultats d'un jour pour les cas positifs ou négatifs, et de 2 à 3 jours pour les faux positifs en culture. Cette rapidité permet de limiter la durée de l'isolement probabiliste des patients et donc de limiter les frais d'hospitalisation. Cette économie est difficile à chiffrer du fait de la multiplicité des critères pouvant être pris en compte (gants, surblouses, chambre seule, ...). D'autre part, en l'absence d'isolement probabiliste, ce délai très court permet de limiter les risques de dissémination des ERG.

Si dans une structure hospitalière faisant face à une épidémie d'ERG, une méthode rapide de PCR en temps réel se révèle moins coûteuse, principalement au vu des économies réalisées concernant l'isolement probabiliste des patients à risque, les facteurs limitants de cette méthode sont l'étape d'extraction et l'investissement en équipement de départ. Ces limites peuvent expliquer que cette méthode ne soit pas choisie. Une estimation comparative des coûts induits, dans le cas d'une recherche de portage d'ERG, par l'utilisation de la PCR en temps réel (exemple choisi, LightCycler®) et de la PCR-hybridation après culture permet de montrer que l'investissement de départ en PCR temps réel est plus élevé (respectivement 130 000 € vs 10 000 à 26 000 €), alors que le temps technicien (40 à 50 min) et le coût réactif par analyse (23 à 25 €) sont similaires. Il faut d'autre part souligner que la recherche par PCR en temps réel à partir des bouillons d'enrichissement entraîne un surcoût dû à un nombre d'analyses par PCR plus important en raison de l'absence de « screening » préalable. Dans notre expérience, 5% du total des colonies présentant une croissance sur ChromId VRE®, n'ont pas fait l'objet d'une analyse par PCR-hybridation en raison de leur aspect non suspect, et aurait fait l'objet d'une analyse par PCR en temps réel en raison de leur croissance probable dans un bouillon contenant approximativement la même concentration de vancomycine.

Lors de notre étude, des résultats du type « Ininterprétable » ont été observés pour 2,5% des analyses concernant les ERG. Pour expliquer ce phénomène, 2 hypothèses peuvent être envisagées étant entendu que la mise en culture sur GSV de la suspension ayant servi à la réalisation de la PCR-hybridation nous a permis de vérifier la présence d'ADN bactérien et que la zone de contrôle CC positive a témoigné de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation. La première hypothèse est celle d'une mauvaise extraction, c'est-à-dire que la qualité et/ou la quantité d'ADN extrait n'a pas permis une amplification correcte. Notre seconde hypothèse est celle d'une mauvaise amplification de l'ADN. Différents facteurs peuvent expliquer ce phénomène tels que la présence, fréquemment décrite dans la littérature [207], d'inhibiteurs de l'ADN polymérase ou l'absence d'hybridation des amorces ciblant l'ADN ribosomal 23S (contrôle UC). Ces hypothèses ont également été rapportées par d'autres auteurs pour expliquer la négativité de la zone UC observée lors d'une étude évaluant le test GenoType®BC grampositive, qui permet l'identification rapide de certaines espèces de CGP à partir d'un flacon d'hémoculture positif [208].

Malgré cet inconvénient, la méthode de PCR-hybridation présente de nombreux avantages. Il s'agit d'une méthode simple car l'amplification est réalisée directement sur les cultures sans extraction préalable (simple choc thermique) et les amorces sont fournies dans la trousse commercialisée. L'équipement nécessaire est limité et exploitable pour d'autres analyses commercialisées par Hain Lifescience (identification des mycobactéries, détection des *Escherichia coli* entéro-hémorragiques...). Le marquage CE de ce dispositif médical de diagnostic in vitro garantit sa conformité aux exigences essentielles (performances en termes de sensibilité et de spécificité, d'exactitude, de répétabilité, de reproductibilité et de maîtrise des interférences potentielles) [209]. La présence de contrôles internes permet de s'assurer du bon déroulement du test (extraction, amplification et révélation chromogénique) et ainsi d'exclure les faux négatifs [202, 210]. D'autre part, les étapes d'hybridation et de révélation sont automatisées (GT-Blot 48®) ce qui permet un gain de temps précieux dans une situation épidémique. Un autre intérêt du test Gentotype® Enterococcus est de permettre de combiner l'identification d'espèce à celle de la détection des gènes *van*. Ceci nous a en particulier permis de détecter chez une patiente porteuse d'ERG, l'existence d'un portage de *E. faecalis vanA* survenant environ une semaine après la détection d'une souche de *E. faecium vanA* dans les selles (Figure 38).

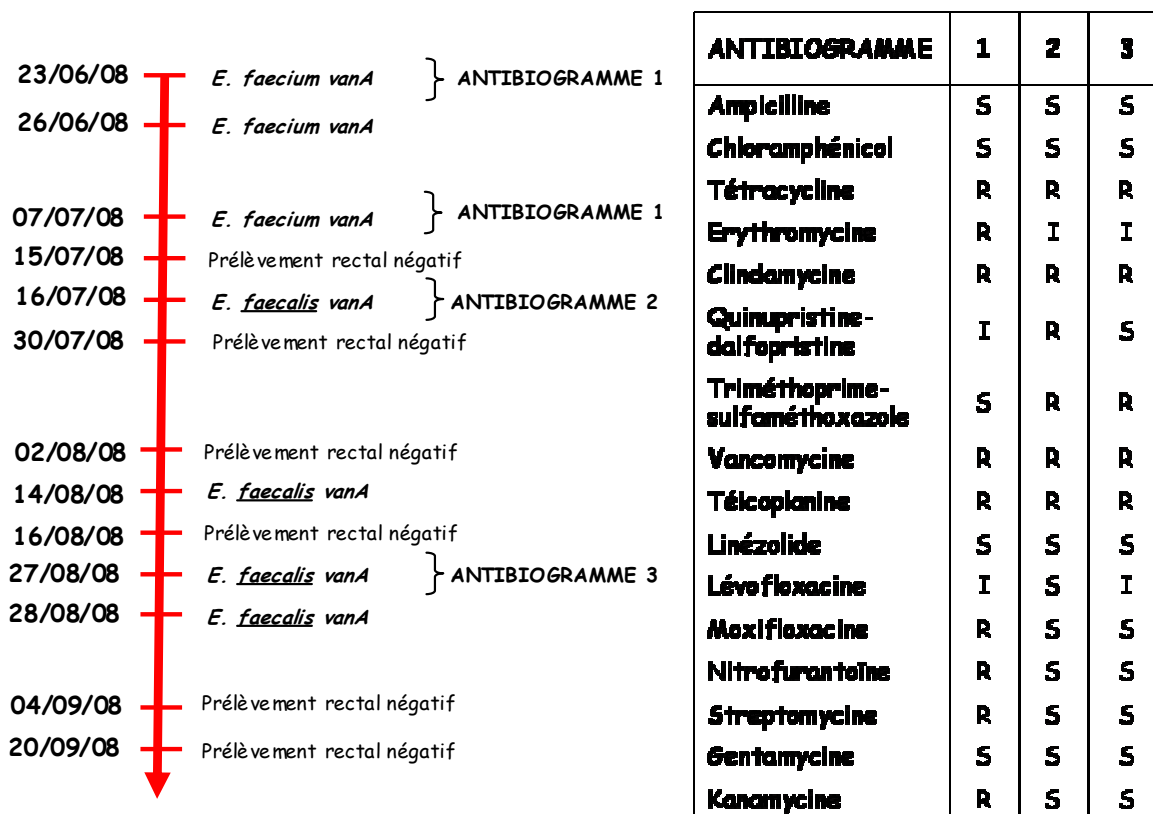


Figure 38 : Dépistages rectaux des ERG isolés chez M^{me} H et leurs antibiogrammes

L'utilisation d'une PCR temps réel ne détectant que *vanA* et *vanB*, n'aurait permis de détecter cette évolution qu'en cas d'isolement de chacune des souches. Il est cependant probable qu'une culture n'aurait pas été réalisée en parallèle de manière systématique, en particulier en période épidémique. Ainsi, la souche de *E. faecalis vanA* n'aurait probablement pas été détectée.

Le dépistage successif de 2 souches *vanA* différentes chez M^{me} H reflète une colonisation par 2 souches émergent à 2 temps différents au niveau des selles pour des raisons inexplicées. Ceci n'exclue cependant pas la possibilité d'une co-colonisation avec transfert du plasmide contenant le gène *vanA* de la première vers la seconde souche. Il est à noter que la souche de *E. faecium vanA* (sensible à l'ampicilline) n'appartenait pas au clone épidémique (cas 2 Figure 32).

Dans notre étude, 10 souches de SARM LPV ont été détectées (hors portage) d'août 2007 à septembre 2008. Ceci correspond, après dédoublement, à une fréquence d'isolement de 4,2% des SARM LPV par rapport à l'ensemble des SARM isolés pendant cette période et pour lesquels un antibiogramme a été réalisé. Cette fréquence est supérieure à celle observée au niveau national (1,6%) au cours de la dernière étude réalisée (de mai à octobre 2008) par l'ONERBA [2]. Une analyse rétrospective de la base de données de notre laboratoire, nous a permis d'observer que la fréquence annuelle d'isolement des souches suspectes d'être des SARM LPV (eu égard à leur antibiotype) par rapport à l'ensemble des SARM isolés et pour lesquels un antibiogramme a été réalisé, a augmenté de 0,3 à 2% de 2005 à 2008 (Figure 39). Toutefois, cette augmentation n'est pas significative (écart normal centré réduit, $p > 0,05$).

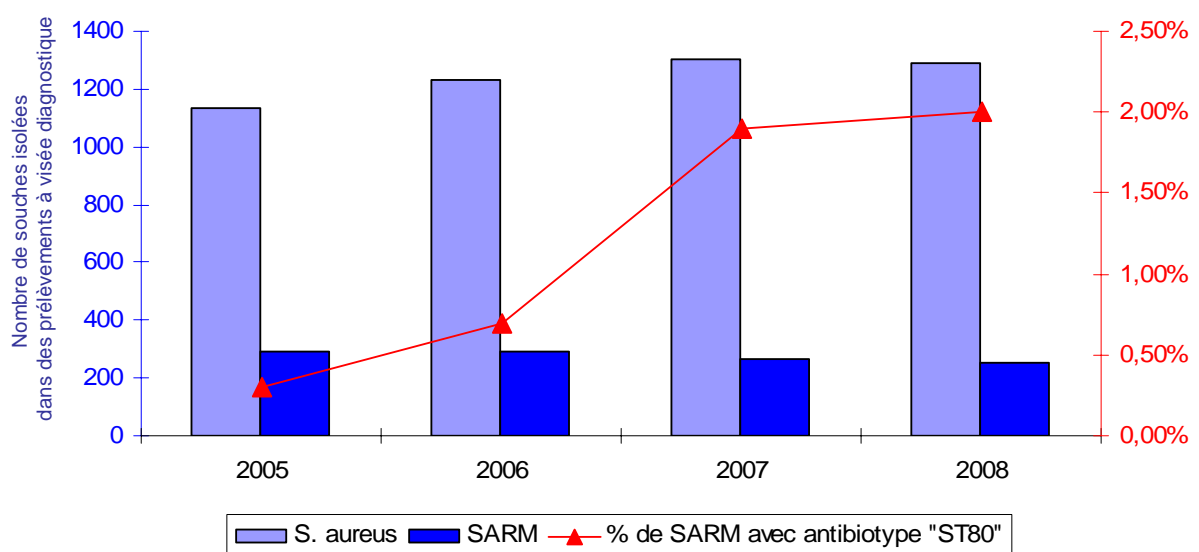


Figure 39 : Evolution de la fréquence annuelle d'isolement des SARM suspects d'être producteurs de LPV au CHU de Nancy de 2005 à 2008

En 2008, cette fréquence était inférieure à celle observée au cours de notre étude même si elle restait légèrement supérieure à celle observée au niveau national. La fréquence plus élevée observée au cours de notre étude pourrait s'expliquer par une répartition hétérogène des cas d'infections à SARM et des cas d'infections à SARM LPV. L'augmentation de la fréquence d'isolement des souches suspectes d'être des SARM LPV ne peut pas s'expliquer par des modifications de nos stratégies d'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Bien que cette augmentation ne soit pas significative, elle suggère l'émergence possible de souches de SARM LPV au sein de notre établissement et souligne l'importance de poursuivre la surveillance épidémiologique dans ce domaine.

Les caractéristiques des patients chez lesquels une souche de SARM LPV a été détectée dans notre étude correspondent à celles retrouvées dans la littérature [95, 148] (Tableau 9). Il s'agissait le plus souvent de patients jeunes (moins de 40 ans pour 9 cas sur 10) et d'origine non caucasienne (6 cas sur les 6 renseignés). La moyenne d'âge des patients et la médiane étaient respectivement de 29 ans ($29,2 \pm 19,1$) et 27 ans. Il est à souligner que d'autres facteurs rapportés comme associés à un risque plus important d'acquisition et/ou d'infection à SARM LPV ont été retrouvés chez certains de ces patients [95, 152, 160, 164] : vie en collectivité (foyer) (n=1), toxicomanie (n=1), existence d'infections cutanées chroniques tels que des abcès récidivants (n=3) et utilisation récente d'antibiotiques (n=2). La majorité des souches de SARM LPV a été isolée dans des prélèvements d'abcès (8 patients sur 10). Les infections purulentes de la peau et des tissus mous sont en effet les plus fréquemment décrites dans la littérature [121-124]. Des cas d'acquisition de SARM LPV à l'hôpital ont été décrits [177, 178]. Dans notre étude, 2 cas d'infections nosocomiales ont été observés parmi les 10 cas d'infections. Ceci souligne l'importance d'identifier ces cas, afin de mettre en place toutes les mesures visant à prévenir la dissémination intrahospitalière de ces souches voire l'acquisition de facteurs de résistance supplémentaires.

Si le diagnostic et la prise en charge de patients porteurs ou infectés par un ERG sont relativement bien définis, ceux concernant les patients porteurs ou infectés par un SARM LPV sont beaucoup moins clairs. Ainsi, durant notre étude, la prise en charge de chacun des 10 patients s'est révélée être hétérogène (Tableau 17).

Tableau 17 : Prise en charge des patients infectés par un SARM LPV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Mme C	Mr M	Melle B	Melle F	Mr K	Enf. R	Mr T	Mr L	Mme Z	Mme M
Chirurgie	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hospitalisation :	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
-isolement probabiliste		x					x	x		x
-isolement secondaire					x					
-isolement non renseigné									x	
Antibiotique :	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
- adapté(s) d'emblée		x		x						
- inadaptés								x		
- inadaptés puis adaptés	x				x					
Evolution :										
Favorable	x	x	x	NR	x	NR	NR	NR	NR	NR
à	10 mois	1 mois	2 mois		5 mois					

NR = non renseigné

Dans notre étude, la sévérité des infections de la peau et des tissus mous dues à des SARM LPV a nécessité un recours à la chirurgie pour 90% des patients. Dans 50% des cas, la prescription d'antibiotiques a été associée à l'acte chirurgical. Certains auteurs suggèrent qu'un drainage chirurgical adéquat serait suffisant pour traiter ces infections [211, 212]. D'autres recommandent d'adapter la prise en charge en fonction de la taille de l'abcès. Pour un abcès de moins de 5 cm, une incision et un drainage seraient suffisants. Pour les enfants, les sujets immunodéprimés ou présentant une altération de l'état général, ainsi qu'en cas d'abcès de plus de 5 cm, une prise en charge chirurgicale et une antibiothérapie devraient être associées [213]. Il a été montré que certains antibiotiques tels que la clindamycine, le linézolide ou l'acide fusidique pouvaient diminuer la production de LPV in vitro [214] et que

l'usage de ces antibiotiques chez des patients infectés au niveau pulmonaire par un SARM LPV et initialement en échec thérapeutique, ont permis leur guérison [215]. Le recours à ces antibiotiques est uniquement recommandé en cas d'infections sévères telles que les cellulites, les pneumopathies nécrosantes, ou les infections musculosquelettiques [186]. Dans notre étude, ces antibiotiques n'ont pas été utilisés en l'absence de ces formes cliniques.

Si l'isolement probabiliste a été réalisé pour 50% des cas, 3 cas n'ont pas été isolés. Cette observation est expliquée par la courte durée d'hospitalisation des patients, en effet 4 patients sur 6 sont sortis avant la 48^{ème} h, c'est à dire le jour d'obtention du résultat de l'antibiogramme. Pour le cas non isolé et encore hospitalisé au moment du diagnostic, les précautions d'isolement ont été mises en place.

Il est à souligner que le délai permettant la confirmation par PCR-hybridation du caractère LPV d'une souche de *S. aureus* est en moyenne de 4 jours ($4,01 \pm 0,99$), ce qui permet d'envisager de mettre en place relativement rapidement un isolement et de renforcer les mesures d'hygiène tout en permettant une réadaptation thérapeutique, lorsque celle-ci est nécessaire.

Les fosses nasales se sont révélées être, dans notre étude et à l'instar de nombreuses études concernant le portage de SARM [216], le meilleur gîte pour dépister un portage de SARM LPV en comparaison avec les autres sites prélevés (plis axillaires, dos, périnée...). La relation entre le portage nasal de *S. aureus* et le risque d'infection a été démontrée [217, 218]. Pour les SARM communautaires, la colonisation nasale serait un facteur additionnel contribuant à l'émergence de ces souches [219]. En situation non épidémique, le dépistage de la colonisation nasale ou cutanée des patients infectés par un SARM communautaire ou de leurs contacts n'est pas recommandé du moins d'après les recommandations canadiennes (recommandation de grade A) [186]. Néanmoins, le dépistage nasal et/ou cutané peut être réalisé dans un certain nombre de situations où une décolonisation est envisageable : sujets présentant des infections récurrentes (2 ou plus en 6 mois) dans un cadre familial ou non malgré le renforcement des mesures d'hygiène, situation épidémique au sein d'une collectivité. Dans notre étude, le cas de la famille C représente un cas intéressant de colonisation familiale persistante et d'infections récidivantes. De nombreux cas familiaux ont déjà été décrits dans la littérature [169, 220-222]. Au sein de la famille, une décolonisation a été réalisée chez les 2 membres qui étaient colonisés ainsi que chez le troisième membre de cette famille, qui bien que non porteur au moment du dépistage, avait présenté un furoncle au niveau de la muqueuse de la narine gauche, traité par auréomycine. Malgré plusieurs tentatives de décolonisation, M^{me} C et son enfant se sont révélés à nouveau porteurs au

niveau nasal un mois avant et deux mois après l'accouchement (Figure 36). L'ensemble des souches isolées au sein de la famille de M^{me} C a présenté un pulsotype identique. L'échec de la décolonisation peut être dû à la persistance de ces souches, en situation intra- ou extracellulaire, au niveau des niches de colonisation de chaque individu, comme cela été montré pour les SARM [223], ou à une réinfection par transmission croisée intrafamiliale [224]. Une étude danoise a décrit la capacité de dissémination du clone ST80 dans la communauté et sa contagiosité au sein de familles [225]. Des cas de transmissions de SARM LPV de la mère à son nouveau-né (en période per ou post-partum) mais aussi entre patientes hospitalisées en suite de couche ont été rapportés [169, 174, 175]. Des échecs de décolonisation de portage nasal par mupirocine de SARM sensibles à cet antibiotique ont également déjà été décrits [216], comme ce fût le cas dans notre étude. Dans le cas de la famille de M^{me} C, la décolonisation a permis d'éradiquer transitoirement ou de diminuer de façon significative (en dessous du seuil de détection) le portage de SARM LPV chez M^{me} C et son premier enfant. Ceci, ainsi que les mesures d'hygiène rigoureuses suivies pendant la grossesse et l'accouchement de M^{me} C ont pu contribuer à l'absence, du moins dans la limite du suivi, de la transmission au nouveau-né.

CONCLUSION

Les ERG et les SARM LPV sont des bactéries qui, du fait de leur résistance aux antibiotiques ou de leur virulence, peuvent poser des problèmes de santé publique et nécessitent d'être détectés dans les prélèvements à visée diagnostique ou épidémiologique. Selon les cas, leur détection peut refléter soit l'existence de cas sporadiques soit celle de cas épidémiques. Que cela soit pour une recherche de portage ou en cas d'infection, il est nécessaire que les laboratoires d'analyses de biologie médicale disposent d'une méthode ciblant des marqueurs permettant la détection de ces bactéries. Cette méthode se doit d'être rapide, sensible et spécifique pour un coût d'analyse le plus raisonnable possible. Il est nécessaire d'autre part, que la méthode choisie puisse s'adapter à l'évolutivité bactérienne c'est à dire répondre aux exigences de délai en cas d'épidémie et permettre la recherche de nouveaux marqueurs caractéristiques de clones émergents (SARM producteur de TSST-1...).

Dans notre travail, la PCR-hybridation a été évaluée à la fois dans un contexte épidémique (ERG) et dans le cadre d'une stratégie destinée à détecter un pathogène émergent (SARM LPV). Pour la recherche de SARM LPV, seules les méthodes d'hybridation moléculaire, dont la PCR-hybridation, sont actuellement commercialisées et peuvent de ce fait être utilisées en routine. Pour ce qui concerne les ERG, les limites des méthodes phénotypiques utilisables pour caractériser ces souches rendent le recours nécessaire à des techniques génotypiques. Dans le cas d'isolement de souches à partir de prélèvements à visée diagnostique, il est envisageable que ces analyses soient réalisées par des laboratoires référents de proximité à l'aide de méthodes de PCR en temps réel ou de PCR-hybridation. Dans ce cas, si les délais d'obtention des résultats par PCR en temps réel et PCR-hybridation sont similaires, seule cette dernière méthode permet l'identification des principales espèces concernées et la détection des principaux gènes *van*. En situation épidémique, la recherche de portage peut être réalisée soit directement par PCR en temps réel après culture en milieu liquide de l'échantillon, ou à partir de colonies après culture sur gélose sélective par PCR-hybridation ou PCR en temps réel. Dans ce cas, le choix des méthodes de PCR dépend de la nature de la souche épidémique, de la capacité à analyser le nombre de prélèvements adressés au laboratoire et l'équipement dont dispose le laboratoire. Quelle que soit la situation, des cultures devront être réalisées afin de pouvoir caractériser les souches d'un point de vue épidémiologique.

L'évolution actuelle des méthodes de biologie moléculaire commercialisées tend vers une « démocratisation » de cet outil. Les méthodes sont en effet de plus en plus standardisées, simples et rapides. Le marquage CE garantit la conformité à des exigences essentielles en terme de qualité et permet la commercialisation de la méthode dans tout l'Espace Economique Européen. Dans la perspective de regroupement des laboratoires de biologie médicale en pôles à l'hôpital ou en réseau en ville, un laboratoire maîtrisant ces méthodes diagnostiques pourra remplir le rôle de structure référente de proximité permettant de confirmer ou d'infirmer les cas suspects dans un délai compatible avec une bonne prise en charge des patients à l'échelle individuelle ou de l'institution.

BIBLIOGRAPHIE

1. Robert, J., J. Etienne, et X. Bertrand, 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**(7): p. 585-7.
2. ONERBA. *Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance bactérienne aux Antibiotiques*. [29 /05/09]; <http://www.onerba.org/fr/centre-doc/>
3. Boyce, J.M., Vancomycin-resistant enterococcus. Detection, epidemiology, and control measures. *Infect Dis Clin North Am*, 1997. **11**(2): p. 367-84.
4. Malhotra-Kumar, S., et al., Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococcus species. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(5): p. 1577-87.
5. Freney J, R.F., R. Leclercq et P. Riegel, *Précis de bactériologie clinique* 2ème édition, Paris, Editions ESKA, 2007.
6. Chavers, L.S., et al., Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect*, 2003. **53**(3): p. 159-71.
7. Bonilla, H.F., et al., Colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: comparison of a long-term-care unit with an acute-care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997. **18**(5): p. 333-9.
8. Wendt, C., et al., Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(12): p. 3734-6.
9. Livornese, L.L., et al., Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med*, 1992. **117**(2): p. 112-6.
10. Zirakzadeh, A. et R. Patel, Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc*, 2006. **81**(4): p. 529-36.
11. Boyce, J.M., et al., Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol*, 1994. **32**(5): p. 1148-53.
12. Cetinkaya, Y., P. Falk, et C.G. Mayhall, Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(4): p. 686-707.
13. Montecalvo, M.A., et al., Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995. **16**(12): p. 680-5.
14. Armstrong-Evans, M., et al., Control of transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a long-term-care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1999. **20**(5): p. 312-7.
15. Lai, K.K., et al., The epidemiology of fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997. **18**(11): p. 762-5.
16. Bonten, M.J., et al., Stability of vancomycin-resistant enterococcal genotypes isolated from long-term-colonized patients. *J Infect Dis*, 1998. **177**(2): p. 378-82.
17. Kim, W.J., R.A. Weinstein, et M.K. Hayden, The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 6-year period. *J Infect Dis*, 1999. **179**(1): p. 163-71.
18. Schmit, J.L., et al., Approche épidémiologique et clinique des entérocoques : résultat d'une enquête. *Med Mal infect*, 1994. **24** special 141-148.
19. Jett, B.D., M.M. Huycke, et M.S. Gilmore, Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 1994. **7**(4): p. 462-78.

20. Johnson, A.P., et al., Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin Microbiol Rev*, 1990. **3**(3): p. 280-91.
21. Leclercq, R., Résistance bactérienne aux glycopeptides, *Médecine thérapeutique* vol **3**, hors série, janvier 1997.
22. Reynolds, P.E., Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1989. **8**(11): p. 943-50.
23. Arthur, M. et P. Courvalin, Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(8): p. 1563-71.
24. Courvalin, P., Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2005. **294**(8): p. 479-86.
25. Gholizadeh, Y. et P. Courvalin, Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents*, 2000. **16 Suppl 1**: p. S11-7.
26. Arthur, M., et al., Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. **36**(4): p. 867-9.
27. Reynolds, P.E. et P. Courvalin, Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(1): p. 21-5.
28. Arthur, M., F. Depardieu, et P. Courvalin, Regulated interactions between partner and non-partner sensors and response regulators that control glycopeptide resistance gene expression in enterococci. *Microbiology*, 1999. **145 (Pt 8)**: p. 1849-58.
29. Arthur, M., et al., Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol Microbiol*, 1998. **30**(4): p. 819-30.
30. Courvalin, P., Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, 2006. **42 Suppl 1**: p. S25-34.
31. Depardieu F. et P. Courvalin, Glycopeptide Resistance in Enterococci, *Frontiers in Antimicrobial Resistance : a tribute to Stuart B. Levy*, Washington, ASM Press, 2005.
32. Handwerger, S., et al., Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J Bacteriol*, 1994. **176**(1): p. 260-4.
33. Mory, F., et al., Low-level vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(6): p. 1767-8.
34. Tenover, F.C., et al., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 275-80.
35. Whitener, C.J., et al., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. *Clin Infect Dis*, 2004. **38**(8): p. 1049-55.
36. Chang, S., et al., Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med*, 2003. **348**(14): p. 1342-7.
37. Sievert, D.M., et al., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**(5): p. 668-74.
38. Ozawa, Y., Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nippon Rinsho*, 2007. **65 Suppl 3**: p. 274-7.
39. Ligozzi, M., G. Lo Cascio, and R. Fontana, vanA gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(8): p. 2055-9.
40. Patel, R., et al., The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(3): p. 705-9.

41. Power, E.G., et al., vanA genes in vancomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium* (*Corynebacterium*) *haemolyticum*. *J Antimicrob Chemother*, 1995. **36**(4): p. 595-606.
42. Dahl, K.H. et A. Sundsfjord, Transferable vanB2 Tn5382-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(8): p. 2579-83.
43. Mevius, D., et al., Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with vanA, vanB, and both vanA and vanB genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother*, 1998. **42**(2): p. 275-6.
44. Poyart, C., et al., Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a vanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. **41**(1): p. 24-9.
45. Ballard, S.A., et al., Comparison of three PCR primer sets for identification of vanB gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by vanB-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(1): p. 77-81.
46. Domingo, M.C., et al., Characterization of a Tn5382-like transposon containing the vanB2 gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **55**(4): p. 466-74.
47. Woodford, N., Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb Drug Resist*, 2001. **7**(3): p. 229-36.
48. Stinear, T.P., et al., Enterococcal vanB resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet*, 2001. **357**(9259): p. 855-6.
49. French, G.L., Enterococci and vancomycin resistance. *Clin Infect Dis*, 1998. **27 Suppl 1**: p. S75-83.
50. Rice, L.B., Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(2): p. 183-7.
51. Donskey, C.J., et al., Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med*, 2000. **343**(26): p. 1925-32.
52. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. [29/05/09]; <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021331.htm>.
53. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report: data summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. *Am J Infect Control* 2001; **29**: p. 404-421.
54. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004 *Am J Infect Control* 2004; **32**: p. 470-85.
55. Leclercq R. et B. Coignard, Les entérocoques résistants aux glycopeptides : situation en France en 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2006. **13**: p. 85-9.
56. Kirst, H.A., D.G. Thompson, et T.I. Nicas, Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(5): p. 1303-4.
57. Lucet J. C., A. Andremont et B. Coignard, Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) : situation épidémiologique, mesures de contrôle actuelles et enjeux à venir, *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 386-90.
58. McGowan, J.E., Debate-guidelines for control of glycopeptide-resistant enterococci (GRE) have not yet worked. *J Hosp Infect*, 2004. **57**(4): p. 281-4.
59. EARSS. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2006* [29/05/09]; <http://www.rivm.nl/earss/>.

60. EARSS. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2007* [29/05/09]; <http://www.rivm.nl/earss/>.
61. Petsaris, O., et al., Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(5): p. 2796-9.
62. Stobberingh, E., et al., Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(9): p. 2215-21.
63. Bager, F., et al., Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med*, 1997. **31**(1-2): p. 95-112.
64. Aarestrup, F.M., et al., Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(7): p. 2054-9.
65. Johnsen, P.J., et al., Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *enterococcus faecium* population. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(1): p. 159-68.
66. Ike, Y., et al., Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet*, 1999. **353**(9167): p. 1854.
67. Leclercq, R., et al., Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(3): p. 157-61.
68. Guerin, F., et al., Vancomycin resistant enterococcus in France. High prevalence in a young ambulatory care patient population. *Presse Med*, 1998. **27**(28): p. 1427-9.
69. Boisivon, A., M. Thibault, and R. Leclercq, Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect*, 1997. **3**(2): p. 175-179.
70. Fortineau N., et al., Portage digestif des entérocoques résistants aux glycopeptides dans les établissements de santé français en 2006 : enquête nationale collaborative réseaux de l'Onerba-InVS-CNR *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 390-1
71. Houssin D., Editorial Numéro thématique - Contrôle des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) : état des lieux en France, *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 385
72. INVS. *Institut de Veille Sanitaire*. [29/05/09]; http://www.invs.sante.fr/surveillance/erg/bilan_erg_062008.pdf
73. Bourdon N., M. Fines et R. Leclercq, Caractéristiques des souches d'entérocoques résistants aux glycopeptides isolées en France, 2006-2008 *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 391-4.
74. Viller F. et H. Tronel, Prévalence du portage digestif des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) dans les établissements de santé de la région Lorraine, juin 2007, Institut de veille sanitaire, 2008.
75. Hénard S., et al., Mise en place d'une mission régionale pour coordonner la prise en charge d'une épidémie de colonisation digestive à entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) en région Lorraine, France *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 397-400.
76. Rabaud C., et al., Gestion d'une épidémie de colonisation digestive à entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) au Centre hospitalier universitaire de Nancy, France, *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008. **41-42**: p 394-397.

77. Mascini, E.M., et al., Acquisition and duration of vancomycin-resistant enterococcal carriage in relation to strain type. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(12): p. 5377-83.
78. Song, X., et al., Effect of nosocomial vancomycin-resistant enterococcal bacteremia on mortality, length of stay, and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(4): p. 251-6.
79. Vergis, E.N., et al., Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. a prospective multicenter study. *Ann Intern Med*, 2001. **135**(7): p. 484-92.
80. Salgado, C.D. et B.M. Farr, Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003. **24**(9): p. 690-8.
81. Edmond, M.B., et al., Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis*, 1996. **23**(6): p. 1234-9.
82. Linden, P.K., et al., Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis*, 1996. **22**(4): p. 663-70.
83. Landry, S.L., D.L. Kaiser, et R.P. Wenzel, Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study. *Am J Infect Control*, 1989. **17**(6): p. 323-9.
84. C-CLIN Est *Guide pratique "Prise en charge d'une épidémie à ERG"*. [29/05/09]; http://www.fc-sante.fr/cclin-est/alerte_enterocoques.shtml
85. DeLisle, S. et T.M. Perl, Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, 2003. **123**(5 Suppl): p. 504S-18S.
86. Perichon, B. et P. Courvalin, Heterologous expression of the enterococcal *vanA* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(11): p. 4281-5.
87. Weigel, L.M., et al., High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(1): p. 231-8.
88. D'Agata, E.M., et al., High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*, 2002. **34**(2): p. 167-72.
89. LPSN. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. [29/05/09]; <http://www.bacterio.cict.fr>.
90. *Centre National de Référence des Staphylocoques*. [29/05/09]; http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_staphylocoques.
91. Montgomery, C.P., et al., Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. *J Infect Dis*, 2008. **198**(4): p. 561-70.
92. Eady, E.A. et J.H. Cove, Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2003. **16**(2): p. 103-24.
93. Ferry T., *Exotoxines superantigéniques et état de choc (toxique et septique)*. [29/05/09]; http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M1681/Files/461843_1746-pdf.
94. Ayliffe, G.A., The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 1997. **24 Suppl 1**: p. S74-9.
95. Naimi, T.S., et al., Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA*, 2003. **290**(22): p. 2976-84.

96. Matsuhashi, M., 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**(3): p. 975-80.
97. Baba, T., et al., Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002. **359**(9320): p. 1819-27.
98. Ito, T., Y. Katayama, et K. Hiramatsu, Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(6): p. 1449-58.
99. Okuma, K., et al., Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(11): p. 4289-94.
100. Deurenberg, R.H., et al., The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. **13**(3): p. 222-35.
101. 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.
102. Cribier, B., et al., *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology*, 1992. **185**(3): p. 175-80.
103. Mongkolrattanothai, K., et al., Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(8): p. 1050-8.
104. Boyle-Vavra, S. et R.S. Daum, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*, 2007. **87**(1): p. 3-9.
105. Ma, X.X., et al., Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(12): p. 4515-27.
106. Monecke, S., et al., High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. **13**(12): p. 1157-64.
107. Robinson, D.A. et M.C. Enright, Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(12): p. 3926-34.
108. Aires-de-Sousa, M., T. Conceicao, et H. de Lencastre, Unusually high prevalence of nosocomial Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* isolates in Cape Verde Islands. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(10): p. 3790-3.
109. Prevost, G., et al., Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*, 1995. **63**(10): p. 4121-9.
110. Supersac, G., G. Prevost, et Y. Piemont, Sequencing of leukocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leukocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun*, 1993. **61**(2): p. 580-7.
111. Kaneko, J. et Y. Kamio, Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004. **68**(5): p. 981-1003.
112. 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.

113. Staali, L., H. Monteil, et D.A. Colin, The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membr Biol*, 1998. **162**(3): p. 209-16.
114. Hensler, T., et al., GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Panton-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 1994. **62**(12): p. 5281-9.
115. Gauduchon, V., et al., Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. *Infect Immun*, 2001. **69**(4): p. 2390-5.
116. Meyer, F., et al., Analysis of the specificity of Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect Immun*, 2009. **77**(1): p. 266-73.
117. Finck-Barbancon, V., et al., Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1182**(3): p. 275-82.
118. Konig, B., et al., Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis*, 1995. **171**(3): p. 607-13.
119. Genestier, A.L., et al., *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3117-27.
120. Said-Salim, B., et al., Differential distribution and expression of Panton-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3373-9.
121. Lina, G., et al., Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*, 1999. **29**(5): p. 1128-32.
122. 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.
123. Fergie, J.E. et K. Purcell, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in south Texas children. *Pediatr Infect Dis J*, 2001. **20**(9): p. 860-3.
124. Holmes, A., et al., *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(5): p. 2384-90.
125. Yamasaki, O., et al., The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**(3): p. 381-5.
126. de Bentzmann, S., et al., *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis*, 2004. **190**(8): p. 1506-15.
127. Hageman, J.C., et al., Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(6): p. 894-9.
128. Roberts, J.C., et al., Fatal necrotizing pneumonia due to a Panton-Valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2008. **7**: p. 5.
129. Boussaud, V., et al., Life-threatening hemoptysis in adults with community-acquired pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-secreting *Staphylococcus aureus*. *Intensive Care Med*, 2003. **29**(10): p. 1840-3.
130. Gillet, Y., et al., Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis*, 2007. **45**(3): p. 315-21.

131. Bocchini, C.E., et al., Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics*, 2006. **117**(2): p. 433-40.
132. Martinez-Aguilar, G., et al., Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2004. **23**(8): p. 701-6.
133. Voyich, J.M., et al., Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis*, 2006. **194**(12): p. 1761-70.
134. Labandeira-Rey, M., et al., *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 2007. **315**(5815): p. 1130-3.
135. Udo, E.E., J.W. Pearman, et W.B. Grubb, Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect*, 1993. **25**(2): p. 97-108.
136. Riley, T.V., J.W. Pearman, et I.L. Rouse, Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Med J Aust*, 1995. **163**(8): p. 412-4.
137. Gosbell, I.B., et al., Community-acquired, non-multiresistant oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA) in South Western Sydney. *Pathology*, 2001. **33**(2): p. 206-10.
138. Moreno, F., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin Infect Dis*, 1995. **21**(5): p. 1308-12.
139. Witte, W., et al., Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. *Euro Surveill*, 2004. **9**(1): p. 16-8.
140. Fridkin, S.K., et al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med*, 2005. **352**(14): p. 1436-44.
141. Salgado, C.D., B.M. Farr, et D.P. Calfee, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(2): p. 131-9.
142. Karden-Lilja, M., et al., Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal chromosomal cassette mec types amongst Finnish community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, 1997-1999. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007. **26**(10): p. 729-33.
143. Oliveira, D.C., A. Tomasz, and H. de Lencastre, Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(3): p. 180-9.
144. Robinson, D.A. et M.C. Enright, Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, 2004. **10**(2): p. 92-7.
145. Harmsen, D., et al., 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): p. 5442-8.
146. 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.
147. 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.

148. Bhattacharya, D., et al., Differences in clinical and molecular characteristics of skin and soft tissue methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates between two hospitals in Northern California. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(6): p. 1798-803.
149. Groom, A.V., et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA*, 2001. **286**(10): p. 1201-5.
150. Maguire, G.P., et al., Clinical experience and outcomes of community-acquired and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a northern Australian hospital. *J Hosp Infect*, 1998. **38**(4): p. 273-81.
151. Stemper, M.E., S.K. Shukla, et K.D. Reed, Emergence and spread of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Wisconsin, 1989 to 1999. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(12): p. 5673-80.
152. Ellis, M.W., et al., Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(7): p. 971-9.
153. Pan, E.S., et al., Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California jails. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(10): p. 1384-8.
154. 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.
155. Kazakova, S.V., et al., A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N Engl J Med*, 2005. **352**(5): p. 468-75.
156. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a high school football team--New York City, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2009. **58**(3): p. 52-5.
157. Stacey, A.R., et al., An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in a rugby football team. *Br J Sports Med*, 1998. **32**(2): p. 153-4.
158. Muller-Premru, M., et al., New strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leukocidin causing an outbreak of severe soft tissue infection in a football team. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005. **24**(12): p. 848-50.
159. Nguyen, D.M., L. Mascola, et E. Brancoff, Recurring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a football team. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(4): p. 526-32.
160. Charlebois, E.D., et al., Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis*, 2002. **34**(4): p. 425-33.
161. Lee, N.E., et al., Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections among HIV-positive men who have sex with men. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**(10): p. 1529-34.
162. Pan, E.S., et al., Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--and their relation to community-associated disease activity. *J Infect Dis*, 2005. **192**(5): p. 811-8.
163. Bratu, S., et al., A population-based study examining the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in New York City. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006. **5**: p. 29.
164. Baggett, H.C., et al., Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Pantone-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*, 2004. **189**(9): p. 1565-73.
165. Helgason, K.O., M.E. Jones, et G. Edwards, Pantone-valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* and foreign travel. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(2): p. 832-3.

166. Denis, O., et al., Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leukocidin genes in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56**(6): p. 1103-6.
167. Purcell, K. et J.E. Fergie, Exponential increase in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J*, 2002. **21**(10): p. 988-9.
168. 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.
169. L'Heriteau, F., et al., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. *JAMA*, 1999. **282**(11): p. 1038-9.
170. 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.
171. Seybold, U., et al., Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(5): p. 647-56.
172. Denis F., et al., *Bactériologie médicale Techniques usuelles*, Issy-les -Moulineaux: Elsevier Masson 2007.
173. Delamare C., et al., Glycopeptide-resistant *Enterococcus* outbreak in an ICU with simultaneous circulation of two different clones. *Pathol Biol (Paris)*, 2008. **56**(7-8): p. 454-60.
174. Saiman, L., et al., Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(10): p. 1313-9.
175. Bratu, S., et al., Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(6): p. 808-13.
176. Prevost, G., et al., Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol*, 1995. **42**(4): p. 237-45.
177. Daube D., et al., Infections cutanées à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et producteur de leucocidine de Panton Valentine, Côtes-d'Armor, octobre 1999 à août 2002 *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 2003. **47**.
178. Naas, T., et al., Three-year survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. *J Hosp Infect*, 2005. **61**(4): p. 321-9.
179. Takizawa, Y., et al., A Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3356-63.
180. Ramdani-Bougoussa, 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.
181. Boyle-Vavra, S., et al., Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel *Staphylococcal* chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(9): p. 4719-30.
182. Diep, B.A., et al., Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(5): p. 2080-4.

183. *Société Française de Microbiologie, Recommandation du CASFM 2009* [10/06/09]; <http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1>
184. Tenover, F.C., et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
185. Chenoweth, C. et D. Schaberg, The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1990. **9**(2): p. 80-9.
186. Barton-Forbes, M., et al. Guidelines for the prevention and management of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA): a perspective for Canadian health care practitioners. *Can J Infect Dis and Med Microbiol*, 2006. **17**(Suppl C): 4C-24C.
187. Abele-Horn, M., et al., Validation of VITEK 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(1): p. 71-6.
188. Garcia-Garrote, F., E. Cercenado, and E. Bouza, Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(6): p. 2108-11.
189. Eisner, A., et al., Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005. **53**(1): p. 17-21.
190. Ligozzi, M., et al., Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(5): p. 1681-6.
191. Eigner, U., et al., Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four *Enterococcus* species and their glycopeptide resistance genotypes. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(6): p. 2920-2.
192. Brigante, G., et al., Use of the Phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(9): p. 3263-7.
193. Fahr, A.M., et al., Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(3): p. 1135-42.
194. Dutka-Malen, S., S. Evers, et P. Courvalin, Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(1): p. 24-7.
195. Ledebøer, N.A., et al., Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(5): p. 1556-60.
196. Ledebøer, N.A., R.J. Tibbetts, et W.M. Dunne, A new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007. **59**(4): p. 477-9.
197. Delmas, J., et al., Evaluation of a new chromogenic medium, ChromID VRE, for detection of vancomycin-resistant *Enterococci* in stool samples and rectal swabs. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(8): p. 2731-3.
198. Faria, N.A., et al., Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(4): p. 1836-42.
199. Denis, O., et al., Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Pantone-Valentine leucocidin genes in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56**(6): p. 1103-6.

200. 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.
201. 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.
202. Jayaratne, P. et C. Rutherford, Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(6): p. 2090-2.
203. Palladino, S., et al., Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(6): p. 2483-6.
204. Ballard, S.A., et al., Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(5): p. 1688-94.
205. Sloan, L. M., Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB Detection Assay and Culture for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci from Perianal Swabs *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(6): p. 2636-43.
206. Koh, T.H., et al., Experience with the Roche LightCycler VRE detection kit during a large outbreak of vanB2/B3 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **60**(1): p. 182-3.
207. Petrich, A.K., et al., Direct detection of vanA and vanB genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Mol Cell Probes*, 1999. **13**(4): p. 275-81.
208. Eigner, U., et al., Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the mec A and van genes from positive-testing blood cultures. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(10): p. 5256-62.
209. Directive 98/79/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 octobre 1998 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro Journal officiel n° L 331 du 07/12/1998 p. 0001 – 0037.
210. Rosenstraus, M., et al., An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(1): p. 191-7.
211. Young, D.M., et al., An epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* soft tissue infections among medically underserved patients. *Arch Surg*, 2004. **139**(9): p. 947-51; discussion 951-3.
212. Rajendran, P.M., et al., Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of cephalexin for treatment of uncomplicated skin abscesses in a population at risk for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(11): p. 4044-8.
213. Lee, M.C., et al., Management and outcome of children with skin and soft tissue abscesses caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*, 2004. **23**(2): p. 123-7.
214. Dumitrescu, O., Effect of Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Producing Panton-Valentine Leukocidin *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(4): p. 1515-19.
215. Micek, S.T., M. Dunne, et M.H. Kollef, Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *Chest*, 2005. **128**(4): p. 2732-8.

216. Laupland, K.B. and J.M. Conly, Treatment of Staphylococcus aureus colonization and prophylaxis for infection with topical intranasal mupirocin: an evidence-based review. *Clin Infect Dis*, 2003. **37**(7): p. 933-8.
217. Wertheim, H.F., et al., The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(12): p. 751-62.
218. Von Eiff, C., et al., Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. *N Engl J Med*, 2001. **344**: p.11-6.
219. Sdougkos, G., et al., Community-associated Staphylococcus aureus infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect*, 2008. **14**(11): p. 995-1001.
220. Jones, T.F., et al., Family outbreaks of invasive community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(9): p. e76-8.
221. Faden, H. and S. Ferguson, Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus and intrafamily spread of pustular disease. *Pediatr Infect Dis J*, 2001. **20**(5): p. 554-5.
222. Osterlund, A., et al., Intrafamilial spread of highly virulent staphylococcus aureus strains carrying the gene for Panton-Valentine leukocidin. *Scand J Infect Dis*, 2002. **34**(10): p. 763-4.
223. Clement, S., et al., Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent Staphylococcus aureus rhinosinusitis. *J Infect Dis*, 2005. **192**(6): p. 1023-8.
224. Huijsdens, X.W., et al., Multiple cases of familial transmission of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*, 2006. **44**(8): p. 2994-6.
225. Urth, T., et al., Spread of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST80-IV clone in a Danish community. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2005. **26**(2): p. 144-9.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Evaluation en réseau de l'identification rapide de *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (ERV) et de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline et productrices de la leucocidine de Panton-Valentine (SARMPVL) par PCR et hybridation sur bandelettes

Soutien aux techniques innovantes et coûteuses 2007

Fiche d'enquête

Bactérie suspectée : ERV /___/ SARM-PVL /___/

Motif suspicion ERV :

- découverte fortuite d'une souche d'entérocoque de caractéristique suspecte :

- (*) diamètre vanco ou teico < 17 mm /___/
- (*) diamètre vanco-diamètre teico ≥ 3 mm /___/
- (*) colonies dans zone inhibition vanco ou teico /___/

- échec thérapeutique d'un traitement par vanco ou teico d'une infection à entérocoque.

- dépistage «actif» de ERV sur milieu spécifique contenant un glycopeptide :

- (*) chez un sujet contact dans le cadre d'une enquête autour d'un cas documenté (« enquête transversale ») /___/
- (*) chez un patient connu porteur, sorti et réadmis /___/
- (*) chez un patient transféré signalé comme porteur connu ou suspect (ex. : contact d'un cas documenté) par l'hôpital d'origine /___/
- (*) chez un patient suspect en raison de ses antécédents d'hospitalisation dans un hôpital réputé en épidémie ou dans un pays à forte prévalence d'ERV (Portugal, Grèce, Italie...) /___/

N.B. dans les 4 cas (*), préciser le milieu de culture spécifique utilisé :

- fait maison /___/
- CHROMagar VRE (CHROMagar) /___/
- VRE (AES) /___/
- Gélose ChromID VRE (bioMérieux) /___/

Autre motif /___/ en clair :

Motif suspicion SARM-PVL :

- découverte fortuite d'une souche de SARM de caractéristique suspecte :

- (*) Type de pathologie :
 - . infection cutanée «communautaire»* incisée chirurgicalement /___/
 - . infection cutanée «communautaire»* non incisée /___/
 - . pneumopathie nécrosante « communautaire » /___/

*: prélèvement fait en consultation externe, aux urgences, le jour (ou le lendemain) de l'admission à l'hôpital ou précisé « communautaire » par le médecin demandeur.

- (*) Phénotype de SARM suspect :
 - . genta S-tobraS-fus I/R (q.q. soit réponse fluoroquinolones) /___/
 - . genta S-tobraS-F. quinolone S (q.q. soit réponse a.fusidique) /___/

ANNEXE 2 :



CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DE L'EST

Hôpitaux de Brabois, Rue du Morvan,
54511 VANDOEUVRE Les NANCY CEDEX
Tél. : 03.83.15.34.73 - Fax : 03.83.15.39.73 – E-mail : cclin.est@chu-nancy.fr

Détection des Entérocoques Résistants aux Glycopeptides (ERG) à partir d'écouvillonnages rectaux

Contexte : la Lorraine est confrontée à une épidémie importante de colonisation digestive à ERG. En l'absence de mesures spécifiques mises en place précocement et énergiquement, l'admission dans un établissement de santé (ES) ou dans un établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) d'un patient porteur d'ERG risque d'être très rapidement suivie d'une épidémie de portage par transmission croisée.

Le transfert de patients positifs dans certaines régions limitrophes de la Lorraine a été à l'origine d'épidémies rapidement jugulées grâce au dispositif de veille et d'alerte basé sur le dépistage. Il est donc essentiel que tous les ES et EHPAD de l'inter-région maintiennent une extrême vigilance afin de prévenir la diffusion de cette Bactérie Multi-Résistante (BMR).

Champ d'application : le dépistage doit être réalisé systématiquement et dès l'admission chez tout patient admis en ES ou EHPAD et provenant d'un service ou d'un EHPAD concerné par l'ERG et mentionné sur les listes lorraines ou champenoises. Le dépistage doit également être réalisé et poursuivi chez tout patient contact (= patient présent dans la même unité de soins et/ou pris en charge par la même équipe soignante qu'un patient ERG+) connu jusqu'à avoir 3 prélèvements hebdomadaires consécutifs négatifs [J0, J8, J15] après l'arrêt du contage.

Il est donc tout à fait possible qu'au sein de votre laboratoire vous soyez amenés à réaliser une recherche de portage digestif d'ERG. Les patients se présenteront alors avec une ordonnance mentionnant : Réalisation d'un écouvillonnage rectal à la recherche d'une bactérie nommément désignée (ERG).

Fiche technique bactériologique : afin d'assurer l'homogénéité de la méthode de dépistage, un mode opératoire inter-régional a été diffusé fin octobre 2007 aux laboratoires d'analyses de biologie médicale sous forme d'une fiche technique bactériologique « Détection des ERG à partir d'écouvillonnages rectaux » (Cf. fiche technique jointe).

- En cas de détection d'une souche d'ERG, cette fiche technique propose l'**envoi** des souches au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy pour confirmation de l'identification de la souche et recherche de gènes *van*.

- Il est aussi possible, en concertation avec le CCLIN-Est, de faire procéder à une étude épidémiologique (typage moléculaire) de la (des) souche(s) isolée(s), en l'adressant au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy.

Fiche d'envoi d'une souche d'ERG : afin d'optimiser le traitement des demandes reçues, vous trouverez jointe à cette lettre une « Fiche d'envoi d'une souche d'entérocoque résistant aux glycopeptides » qui devra obligatoirement accompagner chaque souche transmise (une fiche par souche).

Nous restons à votre disposition pour vous délivrer, si nécessaire, de plus amples renseignements et vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées.

Pr. Christian RABAUD
Responsable du CCLIN-Est

Pr. Alain LOZNIOWSKI
Chef de service du Laboratoire
de Bactériologie du CHU de
Nancy

Fiche technique

Détection des ERG à partir d'écouvillonnages rectaux

Objectif

Détection du portage fécal de souches d'entérocoques ayant acquis une résistance aux glycopeptides.

Echantillon

Le dépistage est réalisé à partir d'un écouvillonnage rectal correctement réalisé (ne pas se limiter à la marge anale).

Délai d'analyse

Si le prélèvement ne peut être ensemencé immédiatement, il peut être conservé pendant 24h à 4°C.

Milieu à ensemencer

Milieux chromogènes sélectifs : gélose chromID[®] (bioMérieux) contenant 8 mg/L de vancomycine ou gélose CHROMagar[®] (Chromagar) contenant 6 mg/L de vancomycine.

Mode opératoire

- _ Décharger l'écouvillon sur un bord de la gélose chromogène puis effectuer un isolement à l'öse
- _ Incuber à 37°C en aérobiose
- _ Examiner les cultures à 24 et 48 H

En présence de colonies suspectes [de couleur violette (*E. faecium*) ou bleu-vert (*E. faecalis*) sur milieu chromID[®], ou rose à mauve sur milieu CHROMagar[®]]:

- Confirmer par un examen microscopique la présence de cocci à Gram positif (à noter que la recherche de la production de pyrrolidonyl arylamidase peut être faussement négative quand elle est réalisée à partir de colonies prélevées sur milieu chromogène)
- Identifier l'espèce d'entérocoque* isolée et tester sa sensibilité aux antibiotiques selon les techniques usuelles utilisées au laboratoire et ce conformément aux recommandations du CA-SFM (en cas de doute sur la sensibilité aux glycopeptides, confirmer les CMI par E-test).

*NB : la croissance de *E. gallinarum* et de *E. casseliflavus* (naturellement résistants à la vancomycine) est possible sur milieu chromogène sélectif. la différenciation entre ces espèces et *E. faecium* est parfois difficile. Certains marqueurs peuvent être utiles, ainsi que la co-résistance fréquente à l'ampicilline chez *E. faecium* contrairement à *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* et l'absence de mobilité de *E. faecium* contrairement à *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*.

Envoi des souches au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy

En cas de détection d'une souche d'ERG, pour confirmer l'identification et la présence de gènes *van*, adresser la souche au :

Laboratoire de Bactériologie
Hôpital Central - CHU de Nancy
29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny
54000 Nancy

N° d'identification :

TITRE

**Place de la PCR-hybridation dans le diagnostic de deux bactéries multirésistantes :
les ERG et les SARM LPV**

Thèse soutenue le 26 juin 2009 par Alice DUROCH

RESUME :

Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) et les *staphylococcus aureus* résistants à la méticilline producteurs de la leucocidine de Panton-Valentine (SARM LPV) sont des bactéries qui, du fait de leur résistance aux antibiotiques ou de leur virulence, peuvent poser des problèmes de santé publique et de prise en charge thérapeutique. Dans notre étude, la place de la PCR-hybridation a été évaluée en routine pour la caractérisation des souches d'ERG et de SARM LPV isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique ou épidémiologique.

Deux cent soixante-seize souches suspectes d'être des ERG ont été analysées par PCR-hybridation (Genotype[®], Hain Lifescience). Cette méthode a permis de confirmer la présence d'ERG pour 5 des 9 souches isolées d'urine et pour 127 des 267 souches isolées d'écouvillonnages rectaux après 48 h de culture sur gélose ChromId VRE[®] (bioMérieux). Sur la base de critères cliniques faisant suspecter une infection à SARM LPV et/ou de critères bactériologiques (antibiotype), 14 souches de *S. aureus* isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique ont été étudiées. L'utilisation de la PCR-hybridation a permis de confirmer la présence de SARM LPV pour 10 cas, dans un délai de 96 h.

Ainsi, un laboratoire disposant de cette méthode sera capable de confirmer ou d'infirmer les cas suspects d'ERG ou de SARM LPV, dans un délai compatible avec une bonne prise en charge des patients à l'échelle individuelle ou de l'institution.

MOTS CLES : PCR-hybridation, entérocoques résistants aux glycopeptides, *Staphylococcus aureus*, résistance à la méticilline, toxine de Panton-Valentine

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Dr Corentine ALAUZET, PHU	Laboratoire de Bactériologie Hôpital Central CHU de Nancy	Expérimentale	OUI
		Bibliographique	OUI
		Thème	5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales	2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament	4 – Alimentation – Nutrition
5 - Biologie	6 – Pratique professionnelle