

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Bactériologie

12BAC1

juin 2012

Antibiogramme *Escherichia coli*

Identification et antibiogramme :

Staphylococcus saprophyticus mecA+

Staphylococcus aureus mecC+

Décembre 2013

Christophe de CHAMPS (Reims)
Gérard LINA (Lyon)
Muriel FROMAGE (Ansm)

Expédition : 6 juin 2012

Clôture : 2 juillet 2012

Edition des compte-rendus individuels : 1er août 2012

Paramètres contrôlés :

Antibiogramme : *Escherichia coli*

Identification bactérienne et antibiogramme : *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*

Nombre de laboratoires concernés* : 1800

Nombre de laboratoires participants** : 1680

* Laboratoires ayant déclaré à l'Ansm pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Cette opération comportait une souche lyophilisée d'*Escherichia coli* qui présentait à la fois une mutation dans le promoteur du gène *bla*_{AmpC} pouvant expliquer la perte de sensibilité aux céphalosporines de 3^{ème} génération et une mutation dans le gène de structure de la céphalosporinase chromosomique expliquant l'extension de la résistance aux céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime et ceftiprome).

Le choix de cette souche a été motivé par l'apparition depuis quelques années de souches d'*E. coli* de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 4^{ème} génération.

Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche qu'ils avaient isolée vis-à-vis de 20 antibiotiques définis et de préciser le phénotype de résistance acquise aux β -lactamines détecté.

Un peu plus de la moitié des participants a indiqué la réponse attendue « céphalosporinase de haut niveau ». Le défaut de croissance inattendu de la souche sur un milieu contenant de la cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) a compliqué la tâche des laboratoires en rendant impossible la vérification de l'absence d'une éventuelle bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Ceci a conduit près de 12% d'entre eux à conclure « céphalosporinase de haut niveau et/ou BLSE ».

Cette opération comportait également pour identification et antibiogramme, deux souches de staphylocoques lyophilisées : *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus*.

En ce qui concerne *S. saprophyticus*, le pourcentage d'identification exacte (91,9%) est le meilleur obtenu à ce jour. Il s'agissait d'une souche *mecA*⁺, résistante à la méticilline. Cette résistance a été détectée par 92,4% des participants.

L'identification de *S. aureus* n'a pas posé de problème aux laboratoires (99,1% de diagnostics exacts). En revanche, c'était la première fois que le CNQ proposait un SARM *mecC*⁺ et non pas un SARM *mecA*⁺ habituellement responsable de la résistance à la méticilline.

La prévalence des souches de *S. aureus* humaines possédant le gène *mecC* découvert en 2011 est actuellement inférieure à 1%. Néanmoins, il nous a semblé important de sensibiliser les biologistes à la détection de la résistance à la méticilline de ce type de SARM, résistance détectée par les deux tiers des laboratoires participants avec la souche proposée.

Antibiogramme *Escherichia coli*

Définition de l'échantillon

Une souche lyophilisée d'*E. coli* (phénotype de résistance aux β -lactamines : « céphalosporinase à haut niveau ») a été proposée. Les renseignements cliniques et les différents numéros associés à cet échantillon sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

N° des échantillons	Renseignements cliniques
113, 159, 211, 239, 272, 350, 432, 524, 545, 589, 606, 740, 775, 893, 976, 987.	La souche a été isolée d'une hémoculture chez une patiente de 69 ans présentant un tableau d'angiocholite lithiasique. Cette patiente a eu de nombreux antécédents d'infections urinaires traitées par céfotaxime.

Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis de 20 antibiotiques (liste définie). Pour chaque antibiotique testé, le résultat « lu » ou « observé » permet de contrôler la qualité technique de l'antibiogramme tandis que le résultat « transmis » correspond à l'interprétation de l'antibiogramme par le biologiste en présence d'un éventuel mécanisme de résistance. En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté, à choisir parmi les phénotypes suivants : pénicillinase haut niveau, TRI (TEM résistante aux inhibiteurs), oxacillinase, céphalosporinase haut niveau, BLSE, carbapénèmase, imperméabilité.

Les résultats des experts - Pr G.LINA, Lyon, Pr C. de CHAMPS, Reims - obtenus pour cette souche par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau I. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-test et par la méthode de dilution en gélose.

tableau I - antibiogramme *E. coli* : résultats des experts

Antibiotiques	Résultat lu	Résultat transmis
Amoxicilline + ac. clavulanique	R	R
Ticarcilline	R	R *
Ticarcilline + ac. clavulanique	I/R	I/R *
Pipéracilline	R	R *
Pipéracilline + tazobactam	S	S
Céfalotine	R	R
Céfoxitine	R	R
Céfotaxime	I/R	I/R
Ceftazidime	R	R
Céfépime	I	I
Aztréonam	I	I
Imipénème	S	S
Ertapénème	S	S
Gentamicine	S	S
Tobramycine	S	S
Amikacine	S	S
Acide nalidixique	R	R
Ciprofloxacine	R	R
Fosfomycine	S	S
Cotrimoxazole	R	R

* : souche I ou R aux carboxy- et aux uréido-pénicillines mal détectée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (disques).

Résultats des participants

Les réactifs utilisés dans les laboratoires pour la réalisation de l'antibiogramme d'*E. coli* sont détaillés dans le tableau II complété, pour information, par les réactifs utilisés lors des deux opérations précédentes « antibiogramme *E. coli* » en 2011 et 2007. On remarque que la part des automates augmente avec près de 47% d'utilisateurs alors qu'ils n'étaient qu'un quart en 2007. Cette évolution se fait au détriment des galeries de type ATB G- ou ATB UR qui passent dans le même temps de 56% à 31% d'utilisateurs. La part de la diffusion sur gélose par la méthode des disques reste constante à environ 20%.

Les résultats obtenus par les participants, tous réactifs confondus, sont rapportés dans le tableau III (la réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras). Le détail des résultats obtenus en fonction du réactif utilisé est précisé pour trois antibiotiques : ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique et pipéracilline respectivement dans les figures 1, 2 et 3.

En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser le phénotype de résistance aux β -lactamines détecté. Les réponses obtenues sont rapportées dans le tableau IV.

tableau II - antibiogramme *E. coli* : réactifs utilisés en 2012 (12BAC1), 2011 (11BAC1) et 2007 (07BAC2)

Techniques / Réactifs	12BAC1	11BAC1	07BAC2
Galleries	30,8%	39,8%	55,7%
ATB G - bioMérieux	-	430	964
ATB G - EU bioMérieux	347	282	-
ATB UR bioMérieux	-	93	618
ATB UR EU bioMérieux	117	22	-
Rapid ATB UR bioMérieux	-	31	150
Rapid ATB UR EU bioMérieux	14	-	-
Rapid ATB E bioMérieux	-	28	126
Autres divers	2	4	25
Automates	46,9%	39,2%	25,5%
Vitek 2 ou 2C bioMérieux	654	800	795
Microscan Siemens	35	39	36
Phoenix Becton Dickinson	40	37	32
Disques	20,8%	18,9%	18,8%
Biorad	249	315	447
I2a	48	46	44
Oxoïd	15	22	27
BioMérieux	7	21	46
Autres divers	5	19	35
Réactif non précisé	23 (1,5%)	47 (2,1%)	37 (1,1%)
Total	1556	2236	3382

tableau III - antibiogramme de la souche *E. coli* : résultats des participants

Antibiotiques	lus				transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
amoxicilline + ac clavulanique	1548	0,5	0,7	98,8	1524	0,4	0,4	99,2
Ticarcilline	1526	12,5	7,6	79,9	1506	5,8	5,4	88,8
Ticarcilline + ac clavulanique	770	26,9	48,8	24,3	774	17,2	48,2	34,6
Pipéracilline	1102	16,3	6,9	76,8	1100	6,5	8,6	84,9
Pipéracilline + tazobactam	932	91,3	4,3	4,4	920	66,3	23,0	10,7
Céfalotine	1537	0,5	0,3	99,2	1514	0,3	0,1	99,6
Céfoxitine	1500	3,2	6,5	90,3	1473	1,9	3,3	94,8
Céfotaxime	1443	2,1	5,9	92,0	1425	1,0	5,3	93,7

Ceftazidime	1529	0,2	0,7	99,1	1504	0,3	0,6	99,1
Céfépime	1180	30,3	62,9	6,8	1169	29,1	38,1	32,8
Aztréonam	680	20,7	66,2	13,1	679	15,6	66,1	18,3
Imipénème	1509	99,6	0,1	0,3	1483	99,7	0	0,3
Ertapénème	866	99,8	0	0,2	858	99,8	0	0,2
Gentamicine	1540	99,5	0,3	0,2	1514	99,5	0,3	0,2
Tobramycine	1485	98,7	0,9	0,4	1458	98,8	0,7	0,5
Amikacine	1508	98,4	1,3	0,3	1485	98,2	1,2	0,6
Acide nalidixique	1497	0,5	0,2	99,3	1472	0,6	0,1	99,3
Ciprofloxacine	1507	0,6	0,2	99,2	1483	0,5	0,1	99,4
Fosfomycine	1025	97,9	0,1	2	1005	97,3	0	2,7
Cotrimoxazole	1503	7,4	0,1	92,5	1483	7,1	0,1	92,8

figure 1 - ticarcilline : % réponse attendue (%R) en fonction de la méthode utilisée (effectif > 20)

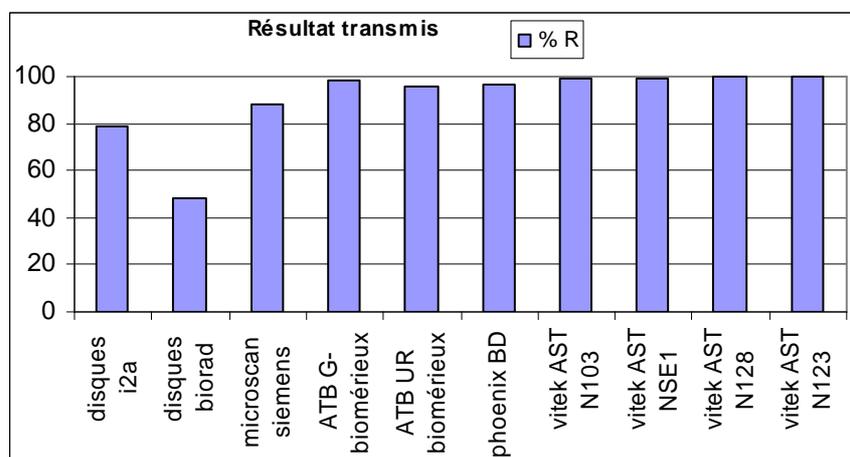
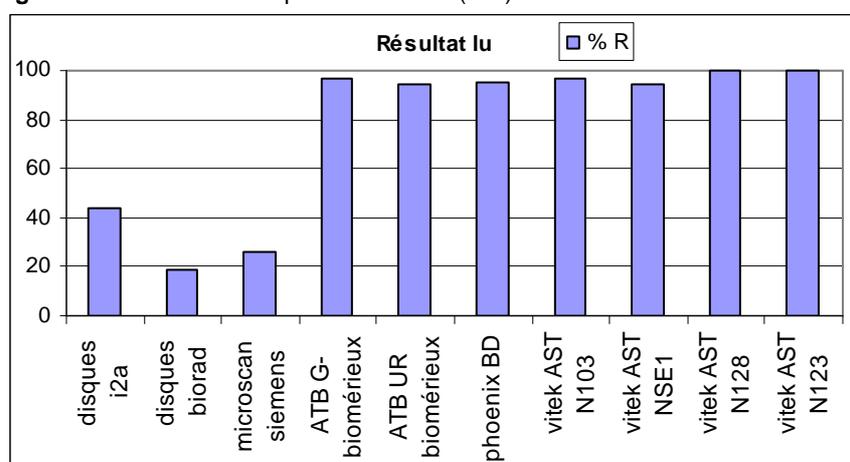


figure 2 - ticarcilline/acide clavulanique : % réponse attendue (% I + R) en fonction de la méthode utilisée (effectif > 20)

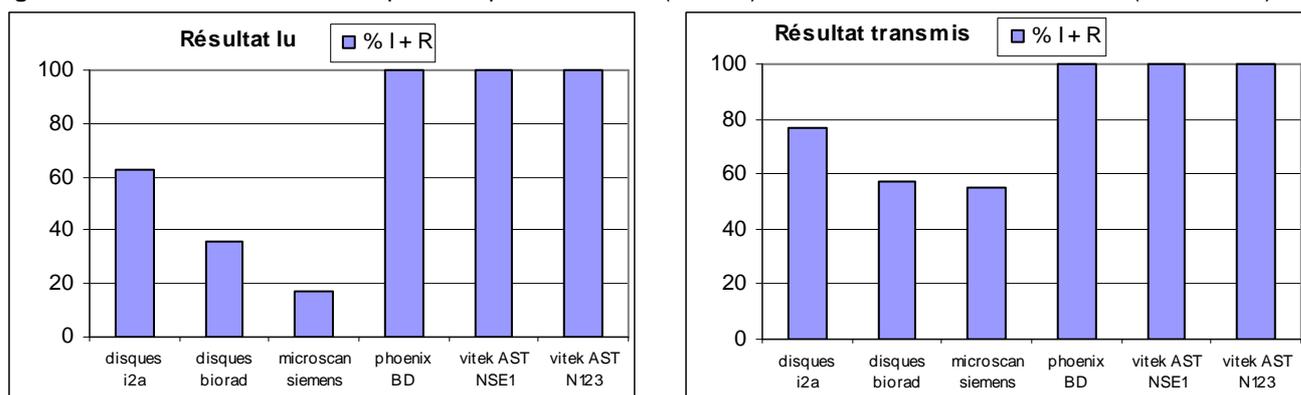


figure 3 - pipéracilline: % réponse attendue (% R) en fonction de la méthode utilisée (effectif > 20)

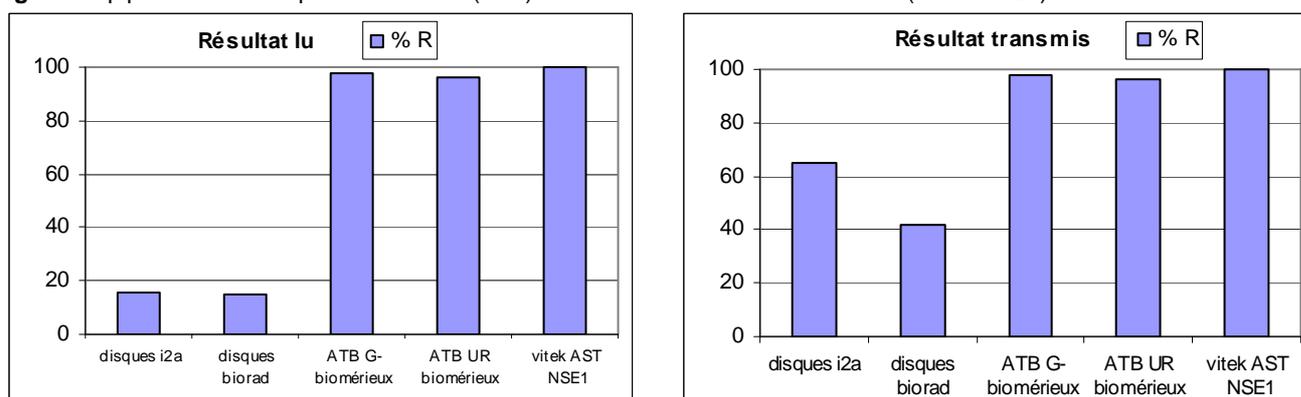


tableau IV – « phénotype de résistance aux β -lactamines ? » : réponses des participants

	Effectif (%)
Absence de réponse	45 (2,9)
Céphalosporinase haut niveau	786 (50,5)
BLSE	342 (22,0)
Céphalosporinase haut niveau et/ou BLSE	184 (11,8)
Céphalosporinase haut niveau + autre(s) que BLSE	86 (5,5)
BLSE + autre(s) que Case	27 (1,7)
Céphalosporinase haut niveau + BLSE + autre(s)	72 (4,6)
Autres (divers)	14 (0,9)
Total	1556

Commentaires

Bêta-lactamines :

Le choix de cette souche d'*Escherichia coli* a été motivé par l'apparition depuis quelques années de souches d'*E.coli* de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime et cefpirome) liée à des mutations dans le gène de structure de la céphalosporinase chromosomique *bla*_{AmpC}.

Ces céphalosporinases sont appelées « extended spectrum AmpC » (ESAC).

Pour mémoire, dans les souches d'*E.coli*, la céphalosporinase est très faiblement exprimée en raison d'un promoteur faible pour le gène *bla*_{AmpC}. Des mutations associées à des insertions de nucléotides dans la région du promoteur augmentent l'expression du gène. Ceci se traduit par une diminution de la sensibilité à la céfalotine (céphalosporines de 1^{ère} génération), puis aux céphalosporines de 2^{ème} génération et à la céfoxitine ainsi qu'à au moins une céphalosporine de 3^{ème} génération. La ceftazidime est souvent touchée avant le céfotaxime. Classiquement, les céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime et cefpirome) ne sont pas hydrolysées.

Chez *Escherichia coli*, la production de l'enzyme n'est jamais inductible. L'extension de la résistance aux céphalosporines de 4^{ème} génération résulte des mutations des gènes de structure.

D'autres mécanismes peuvent expliquer la survenue de résistance aux céphalosporines chez *E.coli* : l'acquisition de gènes plasmidiques de céphalosporinase ou de bêta-lactamases à spectre étendu surtout si elles sont associées à une imperméabilité ou un efflux qui rend la souche résistante à la céfoxitine, au céfuroxime et à la céfalotine.

La souche du CNQ présentait une mutation dans le promoteur pouvant expliquer la perte de sensibilité aux céphalosporines de 3^{ème} génération et une mutation d'un gène de structure expliquant l'extension de la résistance au céfépime et céfpirome (mutation C42T dans le promoteur et mutation S287N dans le gène de structure). Ces mutations entraînaient des niveaux de CMI (mg/l) aux bêta-lactamines présentées dans le tableau ci-dessous (Mammeri H, 2008) :

β-lactamines	TIC	TCC	PIP	TZP	FOX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IMP
Concentrations critiques	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 2
	16	> 16	> 16	>16	> 32	> 4	> 2	> 4	> 8	> 8
CMI	16	16	32	4	256	512	32	4	8	<0,06

TIC : ticarcilline, TCC : TIC + clavulanate, PIP : pipéracilline, TZP : PIP + tazobactam, FOX : céfoxitine, CAZ : ceftazidime, CTX : céfotaxime, FEP : céfépime, CPO : céfpirome, ATM : aztreonam, IMP : imipenem

Globalement, la résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique, à la céfalotine, à la céfoxitine, au céfotaxime et à la ceftazidime a bien été détectée (tableau III). En ce qui concerne le céfotaxime, les réponses « S » (2,1%) et « I » (5,9%) sont dues en majorité aux disques Biorad, tandis que pour la céfoxitine, les réponses « S » (3,2%) sont observées avec les galeries ATBG -, ATB UR et le Microscan et les réponses « I » (6,5%) avec les disques Biorad et le Microscan.

La sensibilité de la souche à l'imipénème, à l'ertapénème et à l'association pipéracilline-tazobactam a également été bien détectée. On notera toutefois, qu'environ 30% des laboratoires qui ont lu un résultat « S » à l'association pipéracilline-tazobactam ont interprété « I » pour les trois quarts ou « R » pour un quart d'entre eux, alors qu'il n'y a aucune raison de modifier le résultat lu (absence de règle d'interprétation dans le communiqué du CA SFM). Par conséquent, le résultat lu « S » aurait dû être transmis « S ».

Les résultats sont plus contrastés pour les cinq bêta-lactamines suivantes : ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline, céfépime et aztréonam.

En effet, la diminution de sensibilité de cette souche qui était « I » ou « R » aux carboxy- et aux uréidopénicillines a été mal détectée par la méthode de diffusion en gélose (disques) :

- pour la ticarcilline, la CMI rapportée dans la publication (16 mg/l) et par les experts (32 mg/l) catégorisait la souche « R ». Près de 80% des participants ont lu un résultat « R ». Néanmoins, l'analyse des résultats obtenus en fonction de la méthode utilisée montre que l'ensemble des systèmes automatisés et des galeries (ATB G- et ATB UR) donnent un pourcentage de réponses correctes compris entre 94 et 100%, tandis qu'avec les disques et le Microscan, le résultat n'est lu « R » que par 19 à 44% des laboratoires (figure 1).
- pour l'association ticarcilline-acide clavulanique, la CMI rapportée dans la publication (16 mg/l) et par les experts (16 ou 32 mg/l) catégorisait la souche « I ou R ». Là encore, on note 100% de bonnes réponses avec les automates et de 17 à 63% de bonnes réponses pour le Microscan et les disques (figure 2).
- pour la pipéracilline, la CMI rapportée dans la publication (32 mg/l) et par les experts (32 ou 64 mg/l) catégorisait la souche « R ». Cependant, 23% des utilisateurs des disques Biorad et 16% des utilisateurs des disques i2a ont transmis « S » (figure 3).

Le problème pour le céfépime (céphalosporine de 4^{ème} génération) est le même. Avec une CMI égale à 4 mg/l, la réponse attendue était « I ». On note un pourcentage très important de réponses « S », de 49% pour le Microscan à environ 80% pour l'automate Phoenix et les disques. Seuls le Vitek et les galeries (ATB G- et ATB UR) conduisent à un pourcentage correct de bonnes réponses lues : respectivement 92%, 89% et 81% avec peu de faux « S » (7%, 4% et 5%). Un seul bémol toutefois, le résultat lu « I » sur les galeries est interprété « R » par le système expert.

En ce qui concerne le phénotype de résistance aux bêta-lactamines détecté, la réponse attendue était « céphalosporinase de haut niveau ».

La recherche d'une BLSE par :

- un test de synergie entre un disque de céfotaxime, de ceftazidime, de céfépime et un disque contenant de l'acide clavulanique (amoxicilline/acide clavulanique) distant de 30, 20 ou 10 mm était négative.

- la mesure du diamètre de la zone d'inhibition d'un disque de céfotaxime, de ceftazidime et de céfépime combinés à l'acide clavulanique comparativement à la zone d'inhibition de ces mêmes disques utilisés sans acide clavulanique ne montrait pas de différence à l'exception de la ceftazidime.

Afin de vérifier l'absence de BLSE, les laboratoires pouvaient utiliser une gélose MH contenant de la cloxacilline (250 mg/l) pour inhiber la céphalosporinase susceptible de masquer une éventuelle BLSE. L'absence de croissance de la souche du CNQ sur un milieu à la cloxacilline a rendu cette vérification impossible.

En conclusion, deux types de difficultés ont pu se présenter avec cette souche : résultats faussement sensibles avec certaines molécules par la méthode des disques et absence de croissance sur un milieu contenant de la cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase). De plus, l'inhibition enzymatique observée avec un disque combiné ceftazidime-clavulanate pouvait évoquer la présence d'une BLSE en plus de la céphalosporinase. Cependant, la présence d'une BLSE pouvait être écartée devant le résultat obtenu pour la ticarcilline : CMI basse (16-32 mg/l), diamètre d'inhibition relativement grand pour une BLSE.

Autres antibiotiques :

A l'exception du cotrimoxazole, les antibiotiques autres que les β -lactamines n'ont pas posé de problème :

- la souche était sensible aux aminoglycosides et on note respectivement 99,5%, 98,8% et 98,2% de bonnes réponses pour la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine.
- la résistance aux quinolones a été mise en évidence par 99,4% des participants.
- la sensibilité à la fosfomycine a été mise en évidence par 97,9% des participants.
- le cotrimoxazole (« R » contact en diffusion) a été rendu « S » par 7,1% des participants. Ces réponses faussement « S » ne concernent pas un réactif particulier et restent inexplicables.

Bibliographie

Doi Y, Wachino J, Ishiguro M, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Shibayama K, Yokoyama K, Kato H, Yagi T, Arakawa Y. Inhibitor-sensitive AmpC beta-lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48 : 2652-8.

Mammeri H, Eb F, Berkani A, Nordmann P. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2008, 61 : 498-503.

Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, *et al.* ampC gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 270 : 265-71.

Tracz DM, Boyd DA, Bryden L, Hizon R, Giercke S, Van Caesele P, Mulvey MR. Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2005, 55 : 768-72.

Identification et antibiogramme

Définition des échantillons

Deux échantillons contenant chacun une souche de staphylocoque lyophilisée (*Staphylococcus saprophyticus* ou *S. aureus*) ont été proposés. Il était demandé aux laboratoires participants d'identifier la souche isolée et de tester sa sensibilité vis-à-vis de 12 antibiotiques définis.

En complément de l'antibiogramme standard, les laboratoires devaient répondre par « oui » ou par « non » à la question suivante : « Est-ce que la souche testée est résistante à la méticilline ? ». Ils devaient également préciser la (les) méthode(s) utilisée(s) pour détecter ce type de résistance.

Les numéros d'échantillons attribués à chaque souche ainsi que les renseignements cliniques qui les accompagnaient sont rapportés dans le tableau V. En ce qui concerne l'antibiogramme, les résultats des experts - Pr G. LINA, Lyon, Pr C. de CHAMPS, Reims - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau VI. La détermination des CMI lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-Test et/ou par la méthode de dilution en gélose.

tableau V - définition des deux échantillons

Bactérie	N° des échantillons	Renseignements cliniques
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	126, 268, 336, 405, 531, 697, 780, 944.	Lors d'un nouvel épisode dysurique chez une jeune femme, une leucocyturie (bandelette urinaire positive) est mise en évidence au cabinet du médecin. L'ECBU confirme la leucocyturie et montre 10 ⁴ UFC/ml en culture.
<i>Staphylococcus aureus</i>	184, 321, 458, 562, 669, 756, 825, 837.	Cette bactérie a été isolée d'un prélèvement local pour suspicion d'ostéite en regard d'une ulcération du pied dans le contexte d'une neuropathie diabétique avec mal perforant plantaire.

tableau VI - antibiogramme des staphylocoques : résultats des experts

Antibiotiques	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁽¹⁾		<i>Staphylococcus aureus</i> ⁽²⁾	
	Résultat lu	Résultat transmis	Résultat lu	Résultat transmis
Pénicilline G	R	R	R	R
Erythromycine	R	R	S	S
Lincomycine	S	S	S	S
Pristinamycine	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S
Fluoroquinolones	S	S	S	S
Vancomycine	S	S	S	S
Teicoplanine	S	S	S	S
Rifampicine	S	S	S	S
Acide fusidique	S	S/R *	S	S
Fosfomycine	R	R **	S	S
Cotrimoxazole	S	S	S	S

(1) : *S. saprophyticus* résistant à la méticilline (*mecA* +)

* : réponses S ou R selon le réactif utilisé. CMI proche de la concentration critique unique = 1 mg/l

** : résistance naturelle. CMI = 64 mg/l proche de la concentration critique unique (32 mg/l)

(2) : *S. aureus* résistant à la méticilline (*mecC* +)

Résultats des participants

En ce qui concerne l'identification, les résultats obtenus pour chacune des deux souches sont rassemblés dans le tableau VII. Les résultats obtenus lors de l'envoi précédent d'une souche de *S. aureus* et des cinq envois précédents d'une souche de *S. saprophyticus* sont rapportés dans le tableau VIII et IX.

Les réactifs utilisés par les participants pour réaliser l'antibiogramme des staphylocoques, lors de cette opération de contrôle et lors de l'opération précédente en 2010 sont détaillés dans le tableau X, tandis que les résultats obtenus pour chaque antibiotique, tous réactifs confondus, sont rapportés dans les tableaux XI et XII respectivement pour *S. saprophyticus* et *S. aureus* (la réponse attendue pour chaque antibiotique apparaît en gras).

En complément de l'antibiogramme, les participants devaient préciser :

- le phénotype de résistance à la méticilline de la souche testée (Méti-S ou Méti-R). Les réponses obtenues pour chaque souche sont rapportées dans le tableau XIII.

- la (les) technique(s) utilisé(s) au laboratoire pour détecter la résistance à la méticilline, à choisir parmi la liste suivante : Phoenix BD, Vitek 2 ou 2C Biomérieux, Microscan Siemens, Sensititre Biocentric, ATB STAPH EU Biomérieux, disque d'oxacilline (5µg), de céfoxitine (30µg), de moxalactam (30µg), CMI de l'oxacilline (E-test ou M.I.C.E), test d'agglutination au latex, test immunochromatographique, gélose de screening MRSA chromogénique, détection du gène *mecA* par PCR.

Les réponses des laboratoires concernant les techniques utilisées sont détaillées dans le tableau XIV tandis que les résultats obtenus en fonction des techniques utilisées sont rapportés dans les tableaux XV et XVI respectivement pour *S. saprophyticus* et *S. aureus*.

tableau VII - identification d'un staphylocoque : résultats des participants

Réponse attendue	Genre exact				Genre faux	Total identifications
	espèce exacte	espèce fausse	espèce non précisée	Total		
<i>S. saprophyticus</i>	730 (91,9%)	33 (4,2%) ^(a)	29 (3,6%) ^(b)	792 (99,7%)	2 (0,3%)	794
<i>S. aureus</i>	761 (99,1%)	4 (0,5%)	1 (0,1%)	766 (99,7%)	2 (0,3%)	768

(a) : dont 19 « *S. aureus* »

(b) : dont 21 « staphylocoque coagulase négative »

tableau VIII - bilan des deux opérations de contrôle « *S. aureus* ».

Année	Effectif	Espèce exacte (%)	Espèce fausse (%)	Espèce non précisée (%)	Genre exact (%)
2012	768	99,1	0,5	0,1	99,7
2010	1389	98,9	0,9	0,2	100

tableau IX - bilan des cinq opérations de contrôle « *S. saprophyticus* ».

Année	Effectif	Espèce exacte (%)	Espèce fausse (%)	Espèce non précisée (%)	Genre exact (%)
2012	794	91,9	4,2	3,6	99,7
2003	972	82,5	8,5	7,5	98,5
1999	1014	61	30	8	99
1993	486	61,3	29,4	6,6	97,3
1986	544	42,1	43,4	9,0	94,5

tableau X - réactifs utilisés pour l'antibiogramme des staphylocoques en 2012 (12BAC1) et en 2010 (10BAC1)

Réactifs	Fournisseur	Effectif 2012 (%)	Effectif 2010 (%)
Automates		48,8%	36,9%
Phoenix	Becton Dickinson	42 (2,7)	52 (1,9)
Vitek 2 ou 2 Compact	BioMérieux	679 (43,7)	914 (33,5)
Microscan	Siemens	37 (2,4)	41 (1,5)
Galeries		31,3%	43,4%
ATB Staph EU	BioMérieux	485 (31,2)	1159 (42,4)
Rapid ATB Staph	BioMérieux	-	28 (1,0)
ATB UR EU	BioMérieux	2 (0,1)	-
Disques		19,2%	16,8%
Disques	BioMérieux	6 (0,4)	29 (1,1)
Disques	Biorad	230 (14,8)	339 (12,4)
NeoSensitabs	Eurobio	2 (0,1)	5 (0,2)
Disques	i2a	43 (2,8)	42 (1,5)
Disques	Mast Diagnostics	-	3 (0,1)
Disques	Oxoid	17 (1,1)	28 (1,0)
Multidisk	Sobioda	1 (<0,1)	12 (0,5)
Réactif non précisé		10 (0,6)	80 (2,9)
	Total	1554	2732

tableau XI - antibiogramme *Staphylococcus saprophyticus* : résultats des participants

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Pénicilline G	742	9,3	2,4	88,3	750	2,9	0,1	97,0
Erythromycine	784	0,9	-	99,1	770	0,6	-	99,4
Lincomycine	759	98,4	0,3	1,3	747	96,8	0,5	2,7
Pristinamycine	780	99,4	0,1	0,5	769	99,0	0,1	0,9
Gentamicine	778	99,8	0,1	0,1	765	99,3	0,3	0,4
fluoroquinolones	716	86,6	11,7	1,7	712	81,5	15	3,5
Vancomycine	783	99,2	0,1	0,6	771	99,5	-	0,5
Teicoplanine	756	99,6	-	0,4	747	99,6	-	0,4
Rifampicine	740	97,2	0,8	2	731	97,0	0,4	2,6
Acide fusidique	773	53,5	0,8	45,7	761	53	0,5	46,5
Fosfomycine	773	27,2	1,1	71,7	767	10,3	0,3	89,4
Cotrimoxazole	764	99,6	0,3	0,1	752	99,8	0,1	0,1

tableau XII - antibiogramme *Staphylococcus aureus* : résultats des participants

antibiotiques	résultats lus				résultats transmis			
	effectif	S (%)	I (%)	R (%)	effectif	S (%)	I (%)	R (%)
Pénicilline G	738	1,5	1,5	97,0	731	1,1	0,3	98,6
Erythromycine	755	99,0	0,3	0,7	734	98,9	0,1	1,0
Lincomycine	741	99,0	0,3	0,7	721	99,0	0,2	0,8
Pristinamycine	756	99,6	0,3	0,1	736	99,6	0,1	0,3
Gentamicine	756	97,9	0,4	1,7	736	98,2	0,3	1,5
fluoroquinolones	681	96,0	1,5	2,5	670	96,0	1,0	3,0
Vancomycine	754	99,3	0,3	0,4	735	99,2	0,3	0,5
Teicoplanine	736	99,3	0,3	0,4	716	99,3	0,3	0,4
Rifampicine	721	90,9	9,0	0,1	691	82,6	16,9	0,5
Acide fusidique	756	99,7	-	0,3	736	99,6	-	0,4
Fosfomycine	755	99,9	0,1	0,0	735	99,7	0,3	0,0
Cotrimoxazole	743	99,9	0,1	0,0	722	100,0	-	-

tableau XIII - « souche résistante à la méticilline ? » : réponses des participants

	<i>S. saprophyticus mecA +</i>	<i>S. aureus mecC +</i>
Effectif	790	764
Absence de réponse	15 (1,9%)	12 (1,6%)
OUI	730 (92,4%)	496 (64,9%)
NON	45 (5,7%)	256 (33,5%)

tableau XIV - techniques utilisées pour détecter la résistance à la méticilline

	<i>S. saprophyticus mecA +</i>	<i>S. aureus mecC +</i>
Effectif	790	764
Automates ou galeries utilisés seuls (sans test complémentaire)		
Vitek	184/357 (51,5%)	146/322 (45,3%)
Galerie ATB Staph EU	196/251 (78,1%)	191/237 (80,6%)

Phoenix	10/24 (41,7%)	5/18 (27,8%)
Microscan	7/16 (43,8%)	11/21 (52,4%)
Techniques utilisées seules ou en complément d'un automate ou d'une galerie (effectif ≥ 5)		
disque céfoxitine	94	89
PCR <i>mecA</i> + autre(s)	41	39
latex	37	19
gélose screening MRSA	33	35
disques oxacilline + céfoxitine	18	30
disques céfoxitine + moxalactam	17	19
disque oxacilline	13	21
disque céfoxitine + immunochromatographie (IC)	13	16
disque céfoxitine + latex	12	13
céfoxitine + moxalactam + IC	11	6
oxacilline + céfoxitine + moxalactam	11	6
disque céfoxitine + gélose screening MRSA	9	12
Immunochromatographie (IC)	8	8
disque céfoxitine + gélose screening MRSA + IC	7	7
disque céfoxitine + gélose screening MRSA + latex	5	3
céfoxitine + moxalactam + gélose screening MRSA	3	7
oxacilline + céfoxitine + latex	2	5
Autres combinaisons	59	76

tableau XV - *S. saprophyticus* : résultats en fonction des techniques utilisées pour détecter la résistance à la méticilline

<i>S. saprophyticus mecA</i> +				
Souche résistante à la méticilline ?	Effectif	OUI	NON	Pas de réponse
Automates ou galeries utilisés seuls (sans test complémentaire)				
Vitek	184	177	2	5
Galerie ATB Staph EU	196	184	7	5
Phoenix	10	10	-	-
Microscan	7	7	-	-
Techniques utilisées seules ou en complément d'un automate ou d'une galerie (effectif ≥ 5)				
disque céfoxitine	94	81	12	1
PCR <i>mecA</i> + autre(s)	41	40	1	-
latex	37	34	3	1
gélose screening MRSA	33	29	4	-
disques oxacilline + céfoxitine	18	14	3	1
disques céfoxitine + moxalactam	17	16	1	-
disque oxacilline	13	9	4	-
disque céfoxitine + immunochromatographie (IC)	13	13	-	-
disque céfoxitine + latex	12	12	-	-
céfoxitine + moxalactam + IC	11	10	1	-
oxacilline + céfoxitine + moxalactam	11	11	-	-
disque céfoxitine + gélose screening MRSA	9	9	-	-
immunochromatographie (IC)	8	8	-	-

disque céfoxitine + gélose screening MRSA + IC	7	7	-	-
disque céfoxitine + gélose screening MRSA + latex	5	5	-	-
autres combinaisons	64	55	7	2
Total	790	730	45	15

tableau XVI - *S. aureus* : résultats en fonction des techniques utilisées pour détecter la résistance à la méticilline

<i>S. aureus mecC</i> +				
Souche résistante à la méticilline ?	Effectif	OUI	NON	Pas de réponse
Automates ou galeries utilisés seuls (sans test complémentaire)				
Vitek	146	138	5	3
Galerie ATB Staph EU	191	63	123	5
Phoenix	5	5	-	-
Microscan	11	10	1	-
Techniques utilisées seules ou en complément d'un automate ou d'une galerie (effectif ≥ 5)				
disque céfoxitine	89	61	28	-
PCR <i>mecA</i> + autre(s)	39	28	11	-
latex	19	11	8	-
gélose screening MRSA	35	33	2	-
disques oxacilline + céfoxitine	30	16	14	-
disques céfoxitine + moxalactam	19	8	11	-
disque oxacilline	21	7	14	-
disque céfoxitine + immunochromatographie (IC)	16	12	4	-
disque céfoxitine + latex	13	9	4	-
céfoxitine + moxalactam + IC	6	6	-	-
oxacilline + céfoxitine + moxalactam	6	2	4	-
disque céfoxitine + gélose screening MRSA	12	11	1	-
immunochromatographie (IC)	8	7	1	-
disque céfoxitine + gélose screening MRSA + IC	7	7	-	-
céfoxitine + moxalactam + gélose screening MRSA	7	6	1	-
oxacilline + céfoxitine + latex	5	3	2	-
autres combinaisons	79	53	22	4
Total	764	496	256	12

Commentaires

1 - Identification

S. saprophyticus est une espèce pathogène, responsable principalement d'infection urinaire communautaire chez la femme jeune chez qui elle représente la deuxième étiologie après *Escherichia coli* (1) (2). Sa virulence pour l'appareil urinaire provient de ses capacités d'adhésion aux cellules uro-épithéliales grâce à une adhésine particulière, l'hémagglutinine. La morphologie des colonies de *S. saprophyticus*, lisse et le plus souvent pigmentée en jaune-orangé peut être trompeuse d'autant que certaines souches produisent une pseudo-coagulase (inhibée par l'EDTA) et/ou expriment un facteur d'affinité pour le fibrinogène responsable d'autoagglutination, d'où la nécessité d'utiliser des particules de latex témoin non sensibilisées pour la détection de cette autoagglutination (3). L'identification de *S. saprophyticus* par les galeries biochimiques et par MALDI TOF est fiable et la résistance naturelle de cette espèce à la novobiocine et à la fosfomycine est une aide précieuse à l'identification (4) (5).

C'est la 5^{ème} fois qu'une souche de *S. saprophyticus* est proposée pour identification dans le cadre du CNQ. Le pourcentage d'identification exacte à l'espèce est le meilleur à ce jour (91,9%) et seuls deux laboratoires ont fait une erreur au niveau du genre (tableaux VII et IX).

L'identification de *S. aureus* n'a pas posé de problème aux laboratoires (99,1% de réponse exacte). On note deux erreurs de genre (*Streptococcus*), quatre erreurs d'espèce (2 *S. saprophyticus*, 1 *S. chromogenes*, 1 *S. auricularis*) et une réponse incomplète sans précision d'espèce (*Staphylococcus sp.*).

2 - Antibiogramme

Cette opération de contrôle nous permet de connaître la part des différents réactifs utilisés dans les LBM en France, en 2012, pour la réalisation de l'antibiogramme des staphylocoques : l'automate Vitek 2C BioMérieux avec 43,7% d'utilisateurs (+ 10,2% par rapport à 2010) passe devant la galerie ATB STAPH EU BioMérieux (31,2%), suivie par la méthode de diffusion en milieu gélosé avec les disques Biorad (14,8%) (tableau X).

En ce qui concerne les techniques utilisées dans les LBM pour détecter la résistance à la méticilline (tableau XIV), on remarque que de nombreux utilisateurs d'automates (50% des utilisateurs du Vitek) ou de galeries (80% des utilisateurs ATB STAPH) n'effectuent pas de tests complémentaires pour confirmer le phénotype de résistance (Méti-S ou Méti-R) de la souche.

Staphylococcus saprophyticus mecA+

Bêta-lactamines :

En plus de la résistance naturelle à la novobiocine et à la fosfomycine, la majorité des souches de *S. saprophyticus* produisent une pénicillinase. Certaines souches de *S. saprophyticus* sont résistantes à l'oxacilline par acquisition d'un élément SCCmecIV codant une PBP supplémentaire, la PBP2a comme c'est le cas pour la souche du CNQ (6). La prévalence de cette résistance reste faible chez *S. saprophyticus*. C'est la première fois que le CNQ propose une souche de *S. saprophyticus mecA+* résistante à la méticilline.

Cette résistance a été détectée par 92,4% des laboratoires (tableau XIII). Les automates (VITEK, PHOENIX, MICROSCAN) et la galerie ATB STAPH EU ont permis de la mettre en évidence. La PCR mecA était positive. La souche poussait également sur gélose MRSA ID mais les colonies étaient blanches au lieu d'être vertes. Enfin, les tests recommandés par le CA-SFM (disques de céfoxitine et de moxalactam à 30 µg) ont été réalisés et les diamètres d'inhibition obtenus, respectivement 22 et 15 mm, montrent que la souche est résistante selon les critères du CA-SFM (céfoxitine : diamètre < 25 mm et moxalactam : diamètre < 23 mm).

Autres antibiotiques :

Les seuls points faibles rencontrés concernent la fosfomycine, l'acide fusidique et les fluoroquinolones :

- pour cette souche, la CMI de la fosfomycine égale à 64 mg/l est strictement supérieure à la CMI critique unique égale à 32 mg/l. Par conséquent, la souche doit être catégorisée « résistante ». Toutefois la CMI étant très proche de la concentration critique, il est possible (à une dilution près) que le laboratoire rende la souche « sensible » ; c'est d'ailleurs ce qui ressort des réponses brutes des participants (R : 71,4% et S : 27,2%). En revanche, 89,4% ont transmis un résultat « R » car, ayant identifié un *S. saprophyticus*, ils savent que cette espèce bactérienne présente une résistance naturelle à la fosfomycine.

- on retrouve le même type de problème avec l'acide fusidique. Pour cette souche, la CMI de l'acide fusidique égale à 2 mg/l est strictement supérieure à la concentration critique unique égale à 1 mg/l. Par conséquent la souche doit être catégorisée « résistante ». Mais, là aussi, à une dilution près, la souche peut être catégorisée « sensible ». En dehors de la détermination précise de la CMI, seul le Vitek (carte AST P581) permettait de détecter la résistance à l'acide fusidique. En effet, la galerie ATB STAPH EU et la méthode des disques (diamètre 29 mm) conduisaient à rendre la souche « sensible » à cet antibiotique.

- les différentes fluoroquinolones ont une activité similaire sur les staphylocoques et le résultat obtenu en testant l'une d'entre elles est valable pour les autres (résistance croisée). Cette souche était sensible aux fluoroquinolones. Cependant, on observe un pourcentage non négligeable de réponses « intermédiaire » dues au Vitek pour lequel on note 76% de réponses « sensible » et 24% de réponses « intermédiaire ». Selon la société BioMérieux, cet automate teste l'ofloxacin et la CMI égale à 1 mg/l est interprétée « S » ou « I » en fonction de la version du logiciel utilisé.

Staphylococcus aureus mecC +

S. aureus résistant à la méticilline (SARM), longtemps cantonné aux infections hospitalières, est maintenant reconnu comme responsable d'infections communautaires et très récemment d'infections associées aux animaux d'élevage. Parmi les souches de SARM liées aux animaux d'élevage, certaines possèdent non

pas le gène *mecA* habituellement responsable de la résistance à la méticilline, mais un nouveau gène qui a été successivement appelé *mecA_{LGA251}* puis *mecC* codant la PLP2c (7).

La prévalence des souches de *S. aureus* humaines possédant le gène *mecC* est actuellement inférieure à 1% (8).

La résistance à la méticilline des souches possédant le gène *mecC* doit être recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine et de moxalactam. Ces souches présentent le plus souvent des diamètres d'inhibition correspondant à la zone intermédiaire et donc nécessitent des tests de confirmation comme la recherche de l'expression d'une PLP additionnelle (PLP2a, PLP2c) après induction par une bêta-lactamine ou bien la présence d'un gène *mec* additionnel (*mecA*, *mecC*). Pour rechercher l'expression d'une PLP modifiée, les techniques par immuno-chromatographie sont actuellement les plus performantes. Le gène *mecC* ne possède que 70% d'identité avec le gène *mecA* empêchant sa détection avec les tests génotypiques ciblant uniquement le gène *mecA* ; la recherche de la présence du *mecC* doit être réalisé par un centre référent (8).

Bêta-lactamines :

C'est la première fois que le CNQ propose une souche de SARM *mecC*+. La PCR *mecC* était positive tandis que la PCR *mecA* était négative. La résistance à la méticilline a été détectée par les deux tiers des laboratoires participants (tableau XIII).

Les automates (VITEK, PHOENIX, MICROSCAN) ont permis de la mettre en évidence. Pour le VITEK, le « test céfoxitine screen » était positif d'où l'interprétation « R » de la CMI de l'oxacilline qui était pourtant inférieure à 2 mg/l (CMI oxacilline sur le VITEK : 0,5 - 1 mg/l confirmée à 0,5 mg/l par Etest et dilution en gélose).

En ce qui concerne la galerie ATB Staph EU qui comporte une cupule « céfoxitine screen test » à 5 mg/l, seul un tiers des utilisateurs (63/186) ont détecté la résistance à la méticilline. Ce défaut de détection n'a pas été reproduit par le laboratoire de contrôle de la société bioMérieux.

La souche poussait également sur la gélose chromogène MRSA ID.

Enfin, l'expression de la résistance *in vitro* est hétérogène. Elle est détectée par une diminution de la sensibilité à la céfoxitine et au moxalactam mais pas à l'oxacilline (photo 1). Les tests recommandés par le CA-SFM (disques de céfoxitine et de moxalactam à 30 µg) ont été réalisés et les diamètres d'inhibition obtenus par les experts sont respectivement de 24-26 mm pour la céfoxitine et 22-24 mm, pour le moxalactam. Ces résultats montrent que la souche peut être catégorisée d'emblée résistante aux isoxazolyl-pénicillines (lorsque céfoxitine < 25 mm et moxalactam < 23 mm) ou bien, elle peut se situer entre la borne basse et la borne haute (de 25 à 27 mm pour la céfoxitine et de 23 à 24 mm pour le moxalactam). Dans ce cas, la mise en évidence de la résistance à la méticilline était améliorée après induction par la céfoxitine.

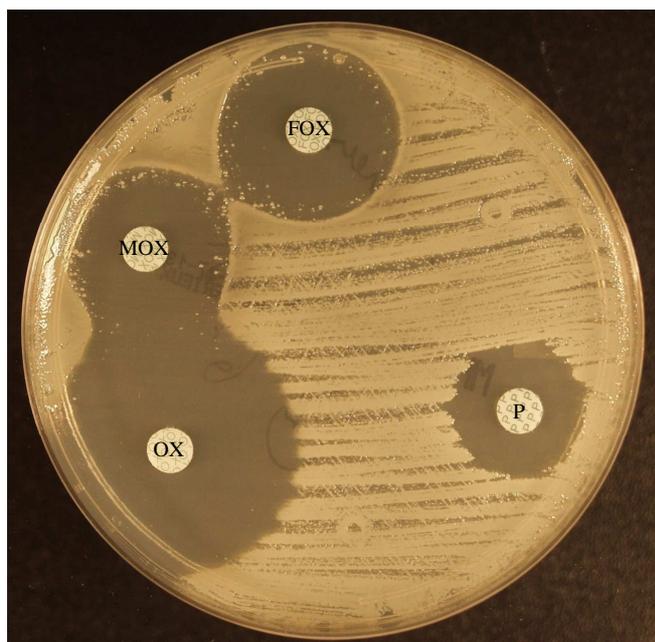


Photo 1 - *Staphylococcus aureus mecC*
Opération 12BAC1

FOX : céfoxitine, MOX : moxalactam, OX : oxacilline, P : pénicilline G.

Autres antibiotiques :

La souche Méti-R ne présentait aucune résistance associée. Les résultats obtenus par les laboratoires participants sont bons (tableau XII) avec au moins 99 % de bonnes réponses « sensible » pour l'érythromycine, la lincomycine, la pristinamycine, les glycopeptides, l'acide fusidique, la fosfomycine et le cotrimoxazole.

Les résultats sont un peu moins bons pour la gentamicine (97,9%), les fluoroquinolones (96%) et surtout la rifampicine pour laquelle on note 16,9% de réponses transmises « intermédiaire ». Ces réponses proviennent exclusivement du Vitek et sont dues à la version 5.04 du logiciel utilisé. Par ailleurs, la concentration critique basse de la rifampicine qui est passée de 0,5 mg/l (recommandations 2008 du Comité de l'antibiogramme de la SFM) à 0,06 mg/l (recommandations 2009) n'a pas été modifiée sur la carte.

Bibliographie

1. Brun Y, Bes M, Vandenesch F. *Staphylococcus*. In Précis de Bactériologie Clinique, 2nd edition. Freney J, Renaud F, Leclercq R ; Riegel P ed. ESKA ed. 2007: p795.
2. Le Bouter A. Infections à *Staphylococcus saprophyticus*. Journal des anti-infectieux. 2011 ; 13(1):12-19.
3. Personne P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun Y, Etienne J. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1997 ; 35(5) :1138-1140
4. Loulergue J, Pinon G, Laudat P, Audurier A. Fosfomycin resistance in *Staphylococcus saprophyticus* and other species of coagulase-negative staphylococci. Ann Microbiol (Paris). 1984 ;135A(2) : 239-47.
5. Lee TF, Lee H, Chen CM, Du SH, Cheng YC, Hsu CC, Chung MY, Teng SH, Teng LJ, Hsueh PR. Comparison of the accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with that of other commercial identification systems for identifying *Staphylococcus saprophyticus* in urine. J Clin Microbiol. 2013 ; 51(5):1563-6.
6. Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Camargo CH, Cunha Mde L. Oxacillin resistance and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus saprophyticus* and other Staphylococci isolated from patients with urinary tract infection. Chemotherapy. 2012 ; 58(6):482-91.
7. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark : a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011 ; 11(8):595-603.
8. Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, Lagier E, Vandenesch F, Tristan A. MRSA harboring mecA variant gene mecC, France. Emerg Infect Dis. 2012 ; 18(9):1465-7.