



**HAL**  
open science

# Caractérisation moléculaire de 188 souches de Staphylococcus aureus responsables de bactériémies au CHU de Grenoble sur l'année 2013

Isabelle Bonnet

► **To cite this version:**

Isabelle Bonnet. Caractérisation moléculaire de 188 souches de Staphylococcus aureus responsables de bactériémies au CHU de Grenoble sur l'année 2013. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01259316

**HAL Id: dumas-01259316**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01259316>**

Submitted on 20 Jan 2016

**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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.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/juridique/droit-auteur>

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année 2015

N°

MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE

Caractérisation moléculaire de 188 souches de *Staphylococcus aureus*  
responsables de bactériémies au CHU de Grenoble sur l'année 2013

*Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de*  
THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE  
DIPLOME D'ETAT

Isabelle BONNET

Née le 26 octobre 1985, à Beaumont (63)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE\*

Le 21 octobre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Monsieur le Professeur Olivier Epaulard

Membres

Madame le Professeur Laurence Bouillet

Monsieur le Professeur François Vandenesch

Madame le Docteur Sandrine Boisset, directrice de thèse

Madame le Docteur Patricia Pavese

*\*La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2014-2015

**ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE**

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
PU-PH	BETTEGA Georges	Chirurgie maxillo-faciale, stomatologie
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
MCU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie

Mise à jour le 14 novembre 2014

PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
MCU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GODFRAIND Catherine	Anatomie et cytologie pathologiques (type clinique)
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation

PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
PU-PH	LANTUEJOU Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU-PH	LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé

Mise à jour le 14 novembre 2014

MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophthalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

## **Remerciements**

Au Professeur Olivier Epaulard, merci d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Au Docteur Patricia Pavese, merci de m'avoir permis de participer à cette étude, initiée par vous.

Au Docteur Sandrine Boisset, merci d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail et de l'avoir fait avec autant de disponibilité et d'implication.

Au Professeur Vandenesch, merci d'avoir bien voulu juger cette thèse, à la fois clinique et biologique, et à laquelle vous avez participé indirectement.

Au Professeur Laurence Bouillet, merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Au Professeur Max Maurin, merci de m'avoir accueillie pendant un an dans votre laboratoire.

A Hélène Meugnier, un grand merci pour cette collaboration.

Au Docteur John Rendu et à l'ensemble du laboratoire de biologie moléculaire, merci de m'avoir permis d'utiliser votre plateforme pour séquencer mes souches.

A Claire Siebert, merci de m'avoir aidé à certains moments dans mes manip.

A Brune, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi sur ce projet, merci pour ta motivation, ton énergie et ta bonne humeur.

Aux chefs et assistants dont j'ai croisé la route, merci d'avoir partagé avec moi un peu de votre savoir et de m'avoir donné envie de poursuivre mon parcours professionnel dans la bactériologie.

Aux internes de biologie que j'ai côtoyés pendant ces quatre années et aux autres !

A mes amis et aux belles personnes que j'ai rencontrées à travers la danse, la musique, les treks, etc.

A ma famille, Louis, François, Papa et Maman, merci infiniment.



## Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	10
<b>II. Revue bibliographique</b> .....	11
A/ Méthodes de typage moléculaire .....	11
1. Le profil de macro-restriction du chromosome (PMRC) obtenu par champs pulsés ...	11
2. Techniques par amplification d'ADN.....	13
a) Empreinte génétique par PCR ou <i>RAPD</i> ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )..	13
b) MLVA .....	14
3. Méthodes basées sur le séquençage .....	15
a) <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST) .....	15
b) <i>Spa typing</i> .....	16
c) Analyse de la cassette <i>SCCmec</i> ( <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> ).....	18
d) Séquençage du génome complet .....	21
e) Puces à ADN .....	21
B/ Epidémiologie moléculaire des bactériémies à <i>S. aureus</i> .....	22
1. En France et en Europe .....	22
2. Aux Etats-Unis.....	25
<b>III. Travail expérimental</b> .....	26
<b>IV. Synthèse des résultats et perspectives</b> .....	42
<b>V. Références bibliographiques</b> .....	43
<b>VI. Serment d'Hippocrate</b> .....	46

## Index des figures et des tableaux

Fig. 1. Profils PMRC d'isolats provenant d'une épidémie. D'après Bannerman <i>et al.</i> .....	12
Fig. 2. Analyse comparative d'images de gels obtenus par PMRC à partir de 20 isolats de <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline. D'après van Belkum <i>et al.</i> .....	13
Fig. 3. Empreinte génétique : deux variants. D'après van Belkum <i>et al.</i> .....	14
Fig. 4. Variants alléliques des gènes <i>glpF</i> , <i>gmk</i> , <i>arcC</i> , <i>aroE</i> . D'après Enright <i>et al.</i> .....	16
Fig. 5. Gène de la protéine A. D'après Shopsin <i>et al.</i> .....	17
Fig. 6. Image d'un gel après amplification de l'ADN extrait par PCR, réalisé au cours de cette étude .....	17
Fig. 7. Type de chromatogramme obtenu après séquençage par technique Sanger. D'après <i>oezratty.net</i> .....	18
Fig. 8. (A) Composition détaillée de <i>SCCmec</i> . (B) Présentations des types I à XI de <i>SCCmec</i> . D'après Hiramatsu <i>et al.</i> .....	20
Fig. 9. Image de biopuce après hybridation et révélation. D'après Alere Technologies .....	22
Fig. 10. Incidence des bactériémies à <i>S. aureus</i> (pour 1000 jours d'hospitalisation) dans la région Centre. D'après van der Mee-Marquet <i>et al.</i> .....	23
Fig. 11. Premier, deuxième et troisième <i>spa type</i> de SASM et SARM les plus fréquents selon le pays européen et les proportions correspondantes. D'après Grundmann <i>et al.</i> .....	24

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CA infections : Community-Acquired infections

CC : *Clonal Complex*

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

HA infections : Hospital-Acquired infections

IE : Infective Endocarditis

MLST : *Multilocus Sequence Typing*

MLVA : *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*

MRSA : Methicillin-Resistant *S. aureus*

MSSA : Methicillin-Sensible *S. aureus*

MT : MLVA type

NORSA FQ : SARM résistants aux fluoroquinolones

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PLP : Protéine Liant la Pénicilline

PMRC : Profil de Macro-Restiction du Chromosome

PVL : Panton Valentine Leucocidin

SASM : *S. aureus* sensible à la méticilline

SARM : *S. aureus* résistant à la méticilline

*SCCmec* : *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

*Spa* : gène de la protéine A

ST : *Sequence Type*

## I. Introduction

Les bactériémies à *Staphylococcus aureus* sont responsables d'infections graves conduisant parfois le patient au décès. Dans un rapport datant de 2013, Laupland *et al.* estiment une incidence annuelle dans le monde entre 10 et 30 pour 100 000 personnes (1). Par ailleurs, l'épidémiologie des *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) est moins connue que celle des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) malgré leur importance croissante ces dernières années et leur implication dans des infections invasives (2). En 2013, nous avons constaté une recrudescence des bactériémies à *S. aureus*, dont les souches étaient majoritairement sensibles à la méticilline (95%), par rapport aux années précédentes au CHU de Grenoble. En effet, 199 souches de *S. aureus* étaient isolées à partir d'hémocultures au cours de l'année 2013 contre 154 en 2012, soit une augmentation de 29%. Cette tendance s'est confirmée en 2014 puisque 197 hémocultures sont revenues positives à *S. aureus* cette année-là.

L'objectif de ce travail était à la fois d'étudier d'un point de vue clinique la population concernée par l'infection en 2013 et d'analyser sur le plan moléculaire les souches de *S. aureus* mises en cause, afin de distinguer des facteurs de risque liés à l'hôte et/ou d'identifier un clone particulièrement virulent et ainsi mettre en œuvre dans le futur des actions adaptées visant à enrayer le phénomène.

Dans un premier temps, je présenterai les différentes méthodes disponibles actuellement pour déterminer le génotype de souches de *S. aureus* et pourquoi notre choix s'est porté sur la technique du *spa typing* puis je ferai une revue de la littérature concernant l'épidémiologie actuelle des bactériémies à *S. aureus* en France, en Europe et aux Etats-Unis. Notre travail expérimental sera développé dans un second temps sous la forme d'un article en anglais. Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe d'infectiologie du CHU de Grenoble et plus particulièrement Brune Millon, qui a effectué le recueil des données cliniques. Pour ma part, j'ai réalisé la caractérisation moléculaire des souches de *S. aureus* et évalué la distribution des *spa type* en regard des informations cliniques. L'analyse complète de ces dernières est détaillée dans le manuscrit de Brune Millon.

## II. Revue bibliographique

Caractériser les souches au sein d'une espèce donnée est fondamental pour connaître l'épidémiologie de l'infection. Les méthodes de typage moléculaire peuvent permettre en effet d'établir avec certitude la source d'une infection ou de détecter une chaîne de transmission.

### A/ Méthodes de typage moléculaire

Les méthodes de typage moléculaire ou méthodes génotypiques reposent sur la détection de polymorphismes au niveau de l'acide nucléique (ADN) de la bactérie et font ainsi appel à des techniques de biologie moléculaire. Elles présentent l'avantage d'apporter des données peu susceptibles de varier dans le temps à la différence des méthodes phénotypiques telles que la sensibilité aux antibiotiques. En outre, elles ont fait la preuve d'être plus reproductibles et plus discriminantes et sont donc les méthodes de choix pour l'épidémiologie (3). On distingue principalement les méthodes fondées sur la restriction de l'ADN, sur l'amplification d'ADN par la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et sur l'analyse de séquence(s) d'ADN.

#### 1. Le profil de macro-restriction du chromosome (PMRC) obtenu par champs pulsés

Le profil de macro-restriction du chromosome (PMRC) obtenu par champs pulsés est la technique de référence utilisée au *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) aux Etats-Unis pour le typage moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* et a ainsi été choisi à la place du typage de bactériophages dans les années 1990 pour étudier la dissémination des souches, en particulier lors d'épidémies nosocomiales (4).

Décrite par Maslow *et al.*, cette technique est basée sur la restriction de l'ADN total (génomique et plasmidique) par une enzyme dont la fréquence de coupure est rare. L'enzyme *SmaI*, qui reconnaît la séquence CCCGGG, est généralement utilisée pour *S. aureus*. Ainsi, on obtient un nombre restreint (entre 20 et 50) de gros fragments d'ADN (entre 10 et 700 kbs) qui ne peuvent être séparés que par une électrophorèse en champs pulsés. Si les profils de

restriction obtenus sont identiques en nombre et taille de bandes pour les différentes souches que l'on souhaite comparer, alors on conclue qu'il s'agit d'une même souche qui a disséminé (Fig. 1). Si les profils de restriction diffèrent entre eux de trois bandes ou plus, on peut affirmer que les souches n'ont pas de lien entre elles. Enfin, une souche qui ne montre sur le profil de restriction qu'une ou deux bande(s) changée(s) par rapport à une autre est à considérer comme un sous-type de la deuxième (5).

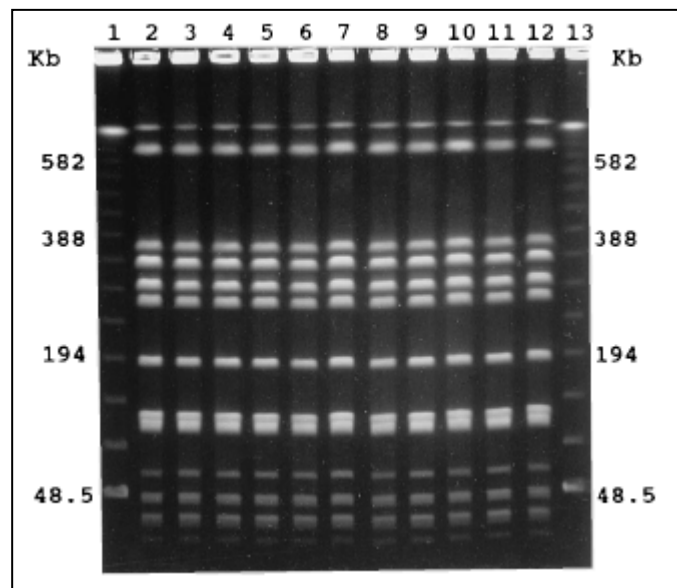


Fig. 1. Profils PMRC d'isolats provenant d'une épidémie. Les marqueurs de poids moléculaire sont positionnés aux lignes 1 et 13. Les lignes 2 à 12 contiennent chacune un isolat. D'après Bannerman *et al.* (4)

Bien qu'il ait été démontré que le PMRC avait le plus fort pouvoir discriminant parmi les méthodes génotypiques, la méthode s'avère laborieuse et peu reproductible entre différents laboratoires (Fig. 2). En outre, comme pour d'autres techniques utilisant un gel, l'interprétation des résultats est souvent subjective. Ces inconvénients rendent complexes l'échange d'informations et la création d'une base de données concernant *S. aureus*.

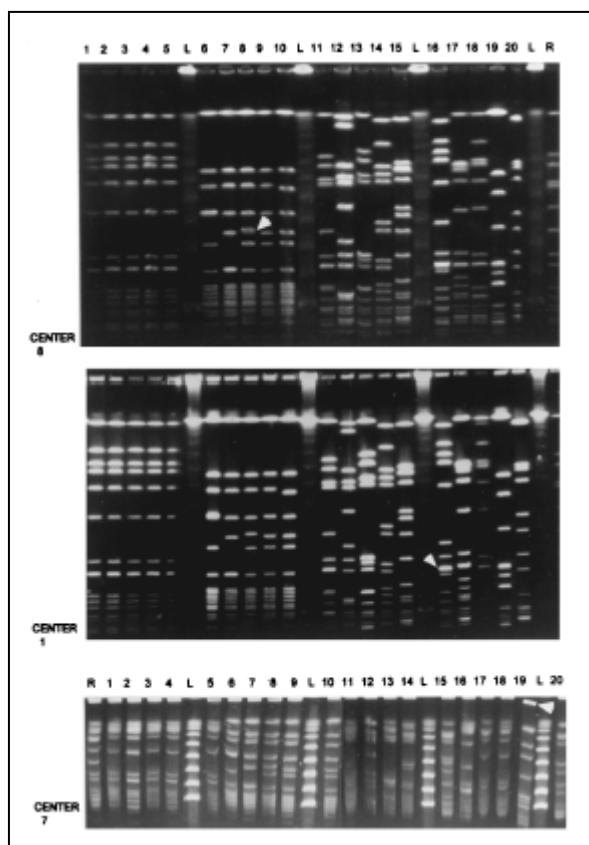


Fig. 2. Analyse comparative d'images de gels obtenus par PMRC à partir de 20 isolats de *S. aureus* résistant à la méticilline. De haut en bas, les résultats expérimentaux de 3 laboratoires participant à une étude sont présentés. Malgré une moins bonne résolution des bandes pour le panel du bas, l'identification des souches était celle attendue sauf pour les souches 9 et 10. La qualité du gel est cependant très inférieure à celle des deux autres et atteste de la difficulté à comparer des données à partir de ce type de technique. D'après van Belkum *et al.* (6)

## 2. Techniques par amplification d'ADN

### a) Empreinte génétique par PCR ou *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

La méthode repose sur l'amplification, à l'aide d'amorces spécifiques, de régions polymorphiques de l'ADN identifiées dans le génome bactérien à l'instar de celui des eucaryotes (7). Ces séquences se caractérisent par une petite taille et une fréquence d'apparition élevée. Initialement découvertes chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, elles ont par la suite été mises en évidence pour d'autres espèces de bactéries telles que *S. aureus*. Bien que leurs fonctions biologiques soient encore mal identifiées, elles pourraient être impliquées dans la transcription, la traduction ou le maintien de l'organisation du chromosome. L'amplification de ces répétitions permet d'obtenir des empreintes d'ADN

suffisamment spécifiques et reproductibles pour distinguer des souches d'une même espèce. Soit deux amorces couvrent un domaine dont la séquence varie (Fig. 3A), soit les amorces détectent une séquence consensus dont la localisation varie au sein du génome (Fig. 3B).

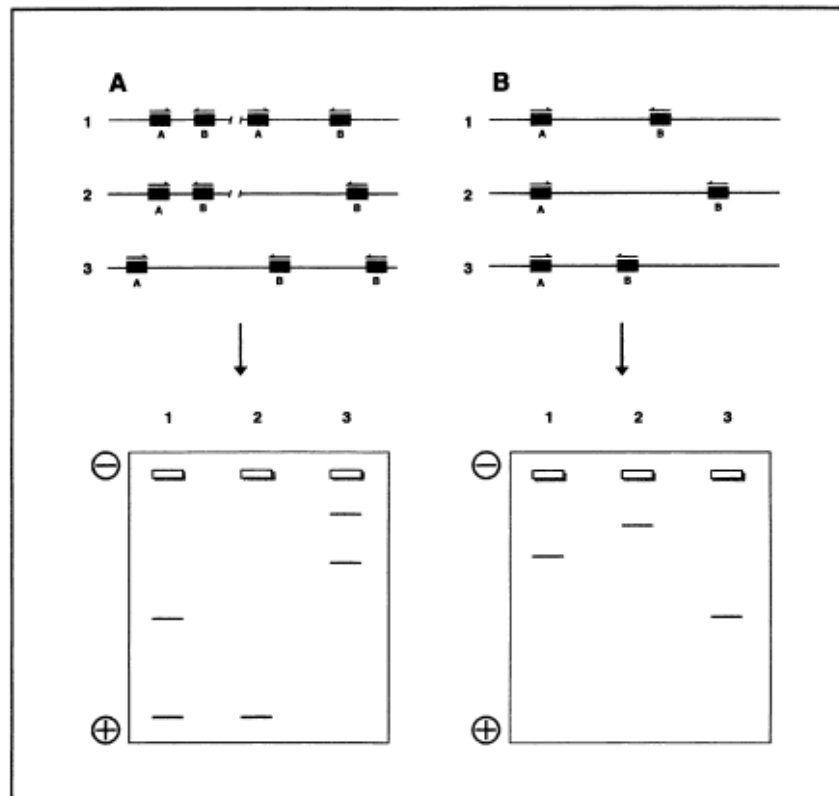


Fig. 3. Empreinte génétique : deux variants. (A) Variation du site de liaison des amorces. Un site présent dans l'ADN 1 n'apparaît pas dans les ADN 2 et 3. (B) Variation du segment d'ADN alors que les sites de liaison des amorces sont constants. D'après van Belkum *et al.* (7)

Selon une étude de van Belkum *et al.* (8), l'empreinte génétique par PCR détecte deux fois plus de variations génétiques que le typage de bactériophages. En revanche, la supériorité en termes de discrimination du PMRC sur l'empreinte génétique n'est pas démontrée dans les différents travaux publiés (9,10).

#### b) MLVA

La méthode MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) ou analyse des répétitions en tandem polymorphes détecte à l'aide d'amorces spécifiques plusieurs *loci*, des répétitions en tandem polymorphes mais également d'autres gènes tels que le gène *mecA*, un variant LGA251 (*mecC*) et la toxine PVL (*lukF*). Il est possible d'ajouter les amorces correspondant aux marqueurs que l'on souhaite étudier dans le mix de PCR.



Lorsque deux isolats diffèrent de deux *loci* ou plus, alors on considère qu'il ne s'agit pas de la même souche. En comparant le MLVA au *spa typing*, méthode qui sera détaillée plus loin, Bosch *et al.* soulignent le fait que son pouvoir discriminant est nettement supérieur, le nombre de MTs (*MLVA types*) étant quasiment deux fois plus élevé que le nombre de STs (*spa types*) (11). De plus, sur 20 771 isolats collectés, 0.4% n'ont pu être typés par la méthode *spa typing* contre seulement 0.01% avec la technique MLVA.

La méthode est certes faiblement coûteuse mais présente l'inconvénient d'être peu utilisée dans le monde, ce qui gêne la comparaison de données.

### 3. Méthodes basées sur le séquençage

A la différence d'autres méthodes pour lesquelles il est difficile de comparer des profils sur gels de fragments d'ADN provenant de différents laboratoires, les techniques de séquençage offrent l'avantage de pouvoir mettre en parallèle des données non ambiguës, reproductibles entre laboratoires.

#### a) *Multilocus sequence typing* (MLST)

Cette méthode au fort pouvoir discriminant consiste à déterminer la séquence de plusieurs gènes structuraux ou gènes de ménage. L'amplification et le séquençage de 450-500 paires de bases des sept gènes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* ont été choisis pour *S. aureus* (12).

Pour chaque gène, la séquence est analysée et assignée à un allèle distinct. Chaque isolat est ainsi défini par l'ensemble des allèles pour chacun des sept gènes structuraux (profil allélique, Fig. 4) et un type de séquence (*sequence type* (ST)) est attribué à chaque souche analysée ; par exemple, les souches ayant le profil allélique 1-4-1-4-12-1-10 appartiennent au ST 5. Tous les ST ayant cinq des sept gènes en commun sont regroupés dans un même complexe clonal (*clonal complex* (CC)). Comme il existe de nombreux allèles pour chaque gène de ménage, la probabilité pour que deux isolats partagent le même profil par hasard est très faible. Par conséquent, deux souches présentant le même profil allélique peuvent être considérées avec une grande certitude comme appartenant au même clone.

<i>glpF</i>		<i>gmk</i>	
	11112223334		1122333334
	55627892791671		2223881355790
	79688657612627		0790568178302
allele 1	GTCGGCAAGCGACC	allele 1	GACAGCACTGAGT
allele 2	.AT.....A.T.	allele 2	..T..TT...AC
allele 3	.AT....T..A.T.	allele 3	..T..TTA...AC
allele 4	.....AT....	allele 4	..T..TT.CA...
allele 6	.A.....	allele 5	...ATT.C..AC
allele 7	..A.....	allele 6	..T..TT...A.
allele 8	AA....G.....T	allele 7	...ATT.C.CAC
allele 9	.....AT.C..	allele 8	.GT..TT.CA...
allele 10	.AT.A....A.T.	allele 9	...G.....
allele 11	.A...T.....	allele 10	.GT..T..CA...
allele 12	.A....G.....	allele 11	A.T..TT...AC
	SNSNNSNSNSNS		NSSNSNSNSNS
<i>arcC</i>		<i>aroE</i>	
	11111122222334		11111122222333444
	667468999013379170		12380234589155671366333
	0987240389301229582		75194344604447921245579
allele 1	TAGTTGCCCACTAAGATT	allele 1	AACGTCACCGCATACTCTCCTAC
allele 2	..A.A...TG.T..G...	allele 2	...A..G...G...A...G.
allele 3	.....TG.T.....	allele 3	...A...T..G.....
allele 4	..C.....A.	allele 4	.....T..G.....G.
allele 5	.....TG.T..T...	allele 5	...A..G...GAG.....GA
allele 6	....A..TG.T.....	allele 6	.....G...G.....A.
allele 7	.....T.....	allele 7	...A...GA...C..G.
allele 8	..A...TG.T.....	allele 8	.....G...G.....G.
allele 9	..A.A.....	allele 9	.....T..G.....A.
allele 10	..A.....	allele 10	G..A..G...TGA..AA...G.
allele 11	.G.....C.....	allele 11	G..A..G..ATGA...A...G.
allele 12	..C...ATG.T.....	allele 12	..A.TG...G...A...G.
allele 13	.....C.....	allele 13	.C.A...T...G...C...
allele 14	A.....TG.TC.....	allele 14	G..A..G...TGA...A...G.
allele 15	.....T...C.....	allele 15	.C.A...T...G...C.G...
allele 16	....A..TG.T.....G	allele 16	..AA..G...G...T...T.G.
allele 17	....A.....G.....	allele 17	...A..G...G...A.T..G.
	SSSSNNSNSNSNSNS		SNNSNNSNNSNSNSNSNS

Fig. 4. Variants alléliques des gènes *glpF*, *gmk*, *arcC*, *aroE*. La séquence de nucléotides pour chaque gène parmi 155 souches de *S. aureus* est retranscrite pour l'allèle 1. Pour les autres allèles, seuls les nucléotides qui diffèrent sont notés ; les autres sont représentés par des points. D'après Enright *et al.* (12)

Ainsi, il existe sur Internet un site correspondant à une banque de données qui autorise n'importe quel laboratoire à comparer une souche, une fois le profil allélique renseigné dans le logiciel, à l'ensemble des profils alléliques inclus dans cette banque de données (<http://mlst.ox.ac.uk>). La méthode a été validée après avoir obtenus des résultats concordants avec ceux recueillis par PMRC (12).

#### b) *Spa* typing

C'est en 1996 que le séquençage de la région polymorphique X du gène de la protéine A (*spa*) a été proposé par Frénay *et al.* pour le typage moléculaire de *S. aureus* (13). Le gène *spa* comprend environ 2150 paires de bases et comporte un certain nombre de régions aux fonctionnalités distinctes : une région codant pour la liaison à la partie Fc de l'immunoglobuline, la région polymorphique X en question et une séquence nécessaire à l'accroche de la paroi cellulaire (Fig. 5).

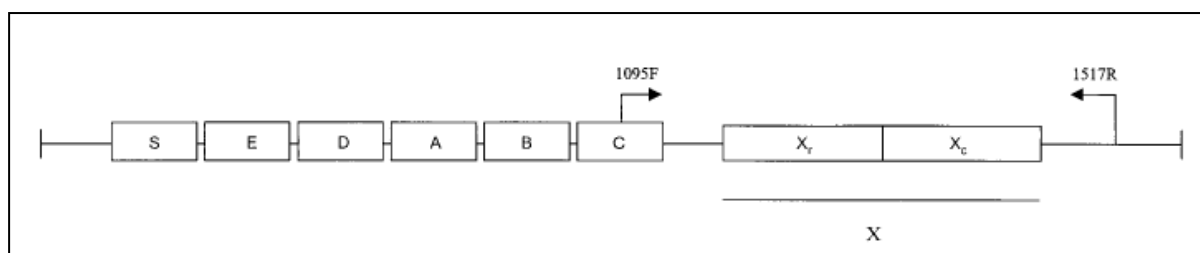


Fig. 5. Gène de la protéine A. Les segments correspondent à une séquence signal (S), la région qui permet la liaison à l'immunoglobuline G (A-D), la région homologue à A-D (E), la partie COOH terminale (X), qui inclut les courtes séquences répétées (X<sub>r</sub>) et la partie codant pour l'attache de la paroi cellulaire (X<sub>c</sub>). Les amorces choisies sont indiquées. D'après Shopsin *et al.* (14)

Bien que la fonction biologique ne soit pas connue, la région polymorphique X pourrait servir à étendre la portion qui se lie à l'immunoglobuline. Suffisamment stable dans le temps, elle correspond à un nombre variable (entre 3 et 15) de répétitions dont la plupart contiennent 24 paires de bases. La diversité de la région provient de délétions et de duplications de ces répétitions mais aussi de mutations ponctuelles. L'existence de *loci* particulièrement bien conservés qui entourent cette région polymorphique X autorise l'utilisation d'amorces (*spa* 1113f et *spa* 1514r dans notre étude) pour une amplification par PCR (Fig. 6) puis un séquençage (Fig. 7).

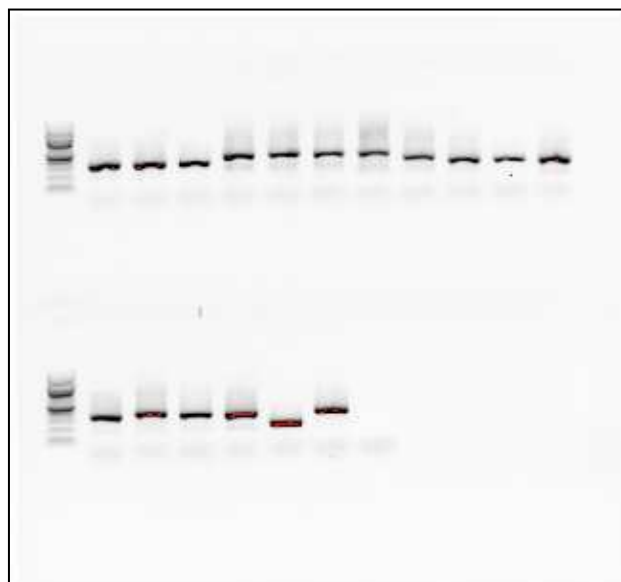


Fig. 6. Image d'un gel après amplification de l'ADN extrait par PCR, réalisé au cours de cette étude. L'intérêt de cette étape est de vérifier que l'ADN a bien été amplifié avant d'entamer l'étape du séquençage. Les marqueurs de poids moléculaire sont en haut et en bas dans les puits à gauche. Un témoin négatif a été placé dans le puit à droite sur la ligne du bas. Dix-sept souches ont ici été testées, une bande grise foncée révèle que la PCR a bien fonctionné.

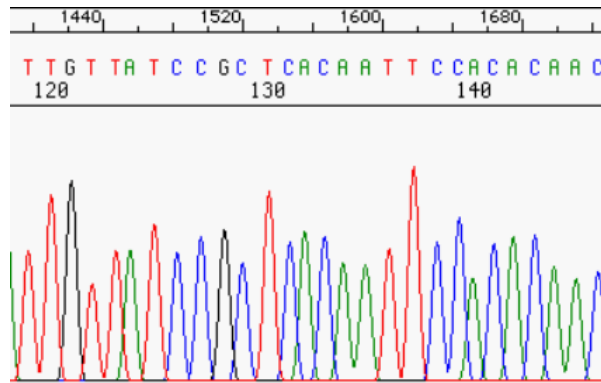


Fig. 7. Type de chromatogramme obtenu après séquençage par technique Sanger. D'après *oezratty.net*

Par la suite, les séquences obtenues à partir des souches étudiées sont analysées à l'aide d'un logiciel et d'une base de données internationale qui nous renseigne sur le *spa* type et le ou les complexe(s) clonal(aux) correspondants (<http://www.ridom.de/staphtype/>).

Le *spa* typing présente de nombreux avantages lorsqu'on le compare notamment aux méthodes de macrorestriction en termes de rapidité, de facilité d'exécution et d'interprétation, de standardisation et de traitement des données (15). En outre, la méthode s'est révélée aussi discriminante et concordante avec les techniques MLST et PMRC. Cependant, comme le mentionne Tenover *et al.* (3), il apparaît évident qu'aucune méthode ne typant qu'une seule région du génome ne peut être plus précise et informative qu'une technique s'appliquant à l'ensemble du génome. En revanche, la capacité du *spa* typing à identifier des souches liées d'un point de vue moléculaire et épidémiologique de manière rapide et aisée en fait une méthode tout à fait adaptée aux études épidémiologiques en première approche. C'est pour toutes ces raisons que nous avons décidé de choisir le *spa* typing pour la caractérisation moléculaire des souches dans notre étude.

### c) Analyse de la cassette *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*)

Présente chez *S. aureus* lorsqu'il est résistant à la méticilline, la région *SCC* comporte le gène *mecA* qui code pour la PLP2A ou PLP2', PLP (Protéine Liant la Pénicilline) se caractérisant par une faible capacité de liaison à l'antibiotique et conférant ainsi la résistance de la bactérie à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines (16). Jusqu'à présent, onze types de cassettes *SCC* ont été mis en évidence (17), d'autres seront sûrement découverts dans le futur (Fig. 8). *SCC* est un élément génétique mobile présent seulement dans les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* qui sont proches. En effet, ces derniers partagent le même ancêtre et auraient divergé il y a environ 300 millions d'années selon une étude des séquences ADN 16S et 23S

(16). Une étude génétique sur plusieurs isolats de *Micrococcus caseolyticus* résistant aux  $\beta$ -lactamines provenant de Chine, du Japon et de Thaïlande a révélé qu'ils n'étaient pas porteurs du gène *mecA* mais d'un gène homologue nommé *mecB* présent sur un plasmide et apportant la résistance à la méticilline. Récemment, un autre gène proche de *mecA* appelé *mecC* a été identifié à partir d'isolats de SARM aussi bien d'origine animale qu'humaine. D'un point de vue génétique, *mecC* est distant de *mecA* et de *mecB* de manière à peu près équivalente.

Le *SCCmec typing* est utilisé en épidémiologie, il s'adresse donc uniquement aux *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) et serait, selon certains auteurs, indispensable à un typage de qualité en complément d'autres techniques (MLST, *spa typing*) (18). On distingue trois techniques pour caractériser la cassette d'un isolat ; la restriction de l'ADN par des enzymes de digestion, la PCR multiplex et la PCR en temps réel, ces deux dernières étant recommandées par Turlej *et al.* pour des raisons de précision (19).

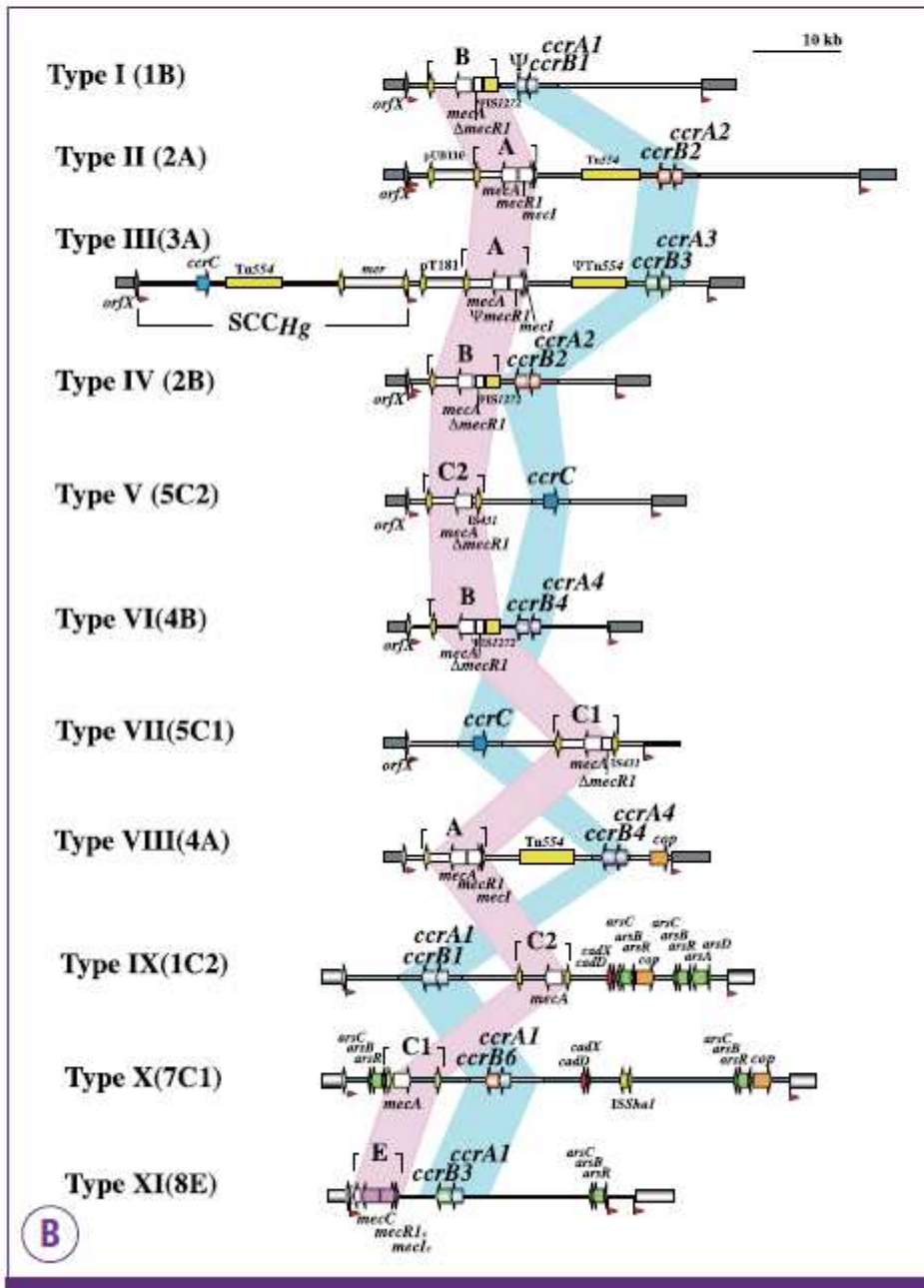
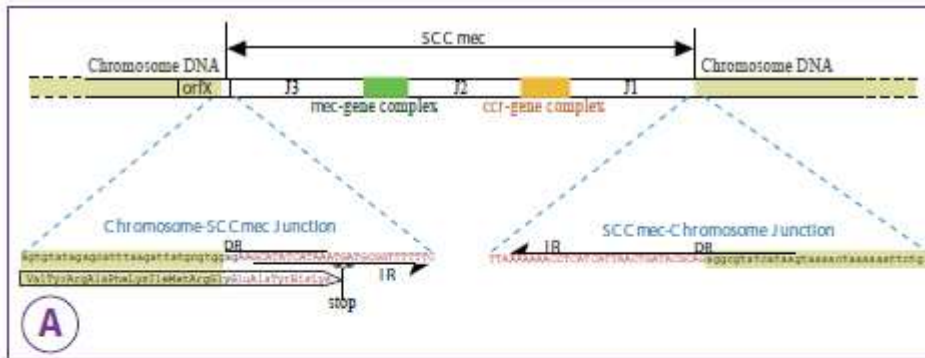


Fig. 8. (A) Composition détaillée de *SCCmec*. (B) Présentation des types I à XI de *SCC mec*. D'après Hiramatsu *et al.* (16)

#### d) Séquençage du génome complet

Enfin, le séquençage du génome complet de *S. aureus* assure une caractérisation fine et précise d'une souche donnée. Récemment, des technologies de nouvelle génération de séquençage de l'ADN sont apparues au sein des laboratoires de microbiologie. L'utilisation de ces plateformes rend possible le séquençage du génome complet de bactéries en seulement quelques jours, permettant de distinguer en théorie deux génomes pour lesquels un seul nucléotide différencierait. Dans une étude comparative publiée en 2014, SenGupta *et al.* ont typé un panel de 44 SARM collectés sur une période de trois ans à travers l'état de Washington aux Etats-Unis à l'aide de plusieurs méthodes dont le séquençage du génome complet. A la différence des techniques MLVA et *spa typing*, le séquençage du génome complet a établi le caractère unique de chacune des souches, suggérant que les autres méthodes comportent le risque d'identifier par erreur des épidémies (20). Initialement réalisé par technique Sanger, le séquençage du génome complet peut désormais être effectué sur Miseq (Illumina) par exemple, comme l'illustrent les travaux de Holden *et al.* (21). La limite réside cependant dans le traitement des données obtenues, qui nécessite de solides compétences bioinformatiques.

#### e) Puces à ADN

Les puces à ADN ou biopuces (*DNA microarray*), comme Identibac *S. aureus* Genotyping (Alere Technologies, Jena, Allemagne), informent sur la présence ou non de gènes de résistance aux antibiotiques, de gènes de virulence tels que les toxines ou les adhésines et de gènes régulateurs globaux. Ces puces permettent aussi d'assigner la souche testée aux clones épidémiques et pandémiques de *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) et *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) présents dans une base de données dédiée.

L'ADN génomique provenant d'une colonie isolée de *S. aureus* est amplifié environ 40 fois et marqué par des nucléotides associés à la biotine (*biotin-dUTP*) (22). A la différence d'une PCR standard, une seule amorce par cible est ajoutée au mix de PCR, ce qui implique la production de produits de PCR avec un brin unique. Le principe autorise ainsi le marquage et l'amplification d'un nombre illimité de cibles. Cependant, la sensibilité est moins bonne que pour une PCR standard (alors que la contamination par des amplicons est quasiment impossible), la méthode est pour cette raison réservée à un travail sur colonie et ne peut être appliquée à des prélèvements (écouvillons, pus, etc.). On procède par la suite à un transfert et une hybridation de l'ADN simple brin marqué sur une plaque où des oligonucléotides (333 cibles pour Identibac *S. aureus* Genotyping) correspondant à divers marqueurs génétiques ont

préalablement été fixés. L'étape suivante consiste à révéler l'hybridation éventuelle par une enzyme spécifique de la biotine appelée streptavidine-peroxidase. La reconnaissance des spots se fait de manière automatique. Enfin, l'analyse du profil par un automate dédié détecte la présence ou l'absence des gènes étudiés (Fig. 9), puis l'ensemble des informations est comparé à une base de données de profils de souches permettant le rattachement de l'isolat à un complexe clonal.

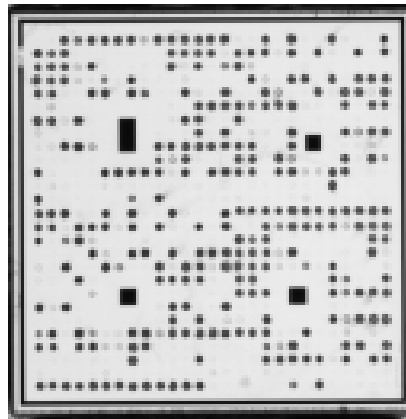


Fig. 9. Image de biopuce après hybridation et révélation. D'après Alere Technologies (22)

Le principal avantage des puces à ADN réside dans le nombre important de *loci* étudiés en parallèle, ce qui implique une affiliation précise à un complexe clonal. Des inconvénients à la technique demeurent, notamment sa complexité (durée, exploitation des données) et son coût élevé, la réservant pour le moment aux laboratoires spécialisés tels que le Centre National de Référence des Staphylocoques.

## B/ Epidémiologie moléculaire des bactériémies à *S. aureus*

### 1. En France et en Europe

Peu de données sont disponibles sur les bactériémies à *S. aureus* en France et en particulier celles impliquant des SASM. Seule la région Centre fait l'objet d'une surveillance de ce type d'infection depuis 2000 avec la coopération de trente-cinq hôpitaux et cliniques. Les observations ont été publiées à plusieurs reprises ces dernières années par van der Mee-



Marquet *et al.* (23–25). Depuis 2000, une baisse régulière de l'incidence des bactériémies à *S. aureus* a été constatée dans cette région, suivie en 2006 par une soudaine augmentation de 80% confirmée par les statistiques des années ultérieures (Fig. 10). Celle-ci correspond à une hausse des bactériémies à SASM et à SARM peu résistants (résistants à pas plus de trois antibiotiques en dehors de la pénicilline G et de l'oxacilline) comme par exemple les SARM résistants aux fluoroquinolones (NORSA FQ). Van der Mee-Marquet *et al.* rapportent une stabilité du nombre de SARM sans diminution franche, suggérant que les méthodes employées pour prévenir la diffusion des SARM, à savoir l'isolement du patient, ne sont pas appliquées de manière satisfaisante ou bien qu'elles ne sont pas suffisamment efficaces. Parallèlement à l'augmentation des NORSA FQ, le nombre de SASM porteurs du gène de la toxine *tst* s'accroît, les auteurs évoquent ainsi un possible lien entre ces deux observations et l'utilisation croissante des fluoroquinolones en France ces dernières années. En effet, ces antibiotiques seraient capables *in vitro* d'entraîner des mutations sur des gènes codant pour la topoisomérase IV et d'induire le transfert horizontal de gènes de virulence tels que le gène *tst*.

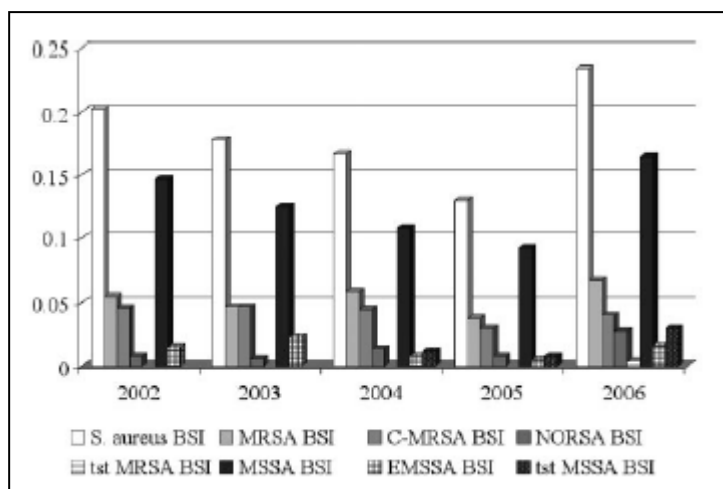


Fig. 10. Incidence des bactériémies à *S. aureus* (pour 1000 jours d'hospitalisation) dans la région Centre selon l'année, le profil de sensibilité aux antibiotiques et les gènes de virulence. *BSI*, *Bloodstream infection*; *C-MRSA*, *classical multiresistant MRSA*; *NORSA*, *nonmultiresistant MRSA*; *EMSSA*, *MSSA with resistance to quinolones or to at least two antibiotics*. D'après van der Mee-Marquet *et al.* (24)

Au cours de la période d'étude 2007/2008, les clones de SASM et SARM identifiés à l'aide de la méthode MLST appartiennent aux complexes clonaux CC5, 8, 22, 30 et 45. Les isolats de SASM sont très variés; à l'inverse, les souches de SARM sont plutôt homogènes et pour la plupart rattachés au clone Lyon (ST8-IV) et au clone pédiatrique (ST5-IV). A partir de 2007 apparaissent des souches du complexe clonal 398, isolées auparavant uniquement chez les

animaux d'élevage, qui représentent 11% des bactériémies à SASM en 2014. Elles sont associées aux infections ostéo-articulaires et aux endocardites ainsi qu'à la porte d'entrée chirurgicale. Les patients impliqués sont plus jeunes que ceux infectés avec une souche d'un clone autre que CC398.

L'hétérogénéité des SASM est décrite plus largement en Europe par Grundmann *et al.* dans une étude portant sur 2890 SASM et SARM responsables d'infections invasives de septembre 2006 à février 2007, utilisant les méthodes *spa typing* et MLST et faisant appel à 26 centres nationaux de référence de *S. aureus* à travers l'Europe (26). En effet, seuls cinq *spa type* comprennent quasiment la moitié des SARM (48,1%), tandis que la même proportion de SASM est représentée par 26 *spa type* différents. Le *spa type* le plus couramment identifié varie selon le pays considéré (Fig. 11).

Country	MSSA <i>spa Type</i>				MRSA <i>spa Type</i>			
	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)	<i>n</i>	1st (%)	2nd (%)	3rd (%)
Austria	120	t091 (8.3)	t002 (6.7)	t012 (5.0)	54	t190 (18.5)	t041 (16.7)	t001 (14.8)
Belgium	107	t002 (9.4)	t209 (4.7)	t012, t091, t740 (3.7)	88	t008 (29.6)	t002, t038 (13.7)	t740 (12.5)
Bulgaria	29	t056 (10.3)	t078, t148, t156, t1346 (6.9)	a	25	t030 (36.0)	t037 (16.0)	t010 (12.0)
Croatia	50	t050 (10.0)	t005, t015, t1361 (8.0)	t164 (6.4)	38	t041 (36.8)	t091 (10.5)	t026, t1003 (8.3)
Cyprus	9	t002 (22.2)	a	—	7	t012, t30 (28.6)	a	—
Czech Republic	94	t015, t130 (5.3)	t024, t122, t1081 (4.3)	t056, t156, t491, t1231 (3.2)	51	t003 (66.7)	t032 (13.7)	t002 (7.8)
Denmark	108	t230 (7.4)	t002, t127 (4.6)	t065, t084 (3.7)	4	t024, t037 (50.0)	—	—
Finland	15	t026 (13.3)	a	—	7	b	—	—
France	114	t002 (11.4)	t008 (6.1)	t012 (4.4)	111	t008 (48.6)	t777 (7.2)	t024 (5.4)
Germany	98	t008 (11.2)	t084 (7.1)	t015, t091 (6.1)	82	t032 (35.4)	t003 (28.1)	t001 (8.6)
Greece	20	t267 (15.0)	t012 (10.0)	a	15	t002, t044 (26.7)	t037 (20.0)	a
Hungary	66	t091, t216 (10.6)	t012, t084 (7.60)	t002, t015, t2115 (4.7)	44	t032 (38.6)	t041 (25.0)	t062 (13.6)
Iceland	5	b	—	—	0	—	—	—
Ireland	85	t021 (7.1)	t012 (4.7)	t078, t127, t166, t382, t548 (3.6)	84	t032 (45.2)	t515 (9.5)	t022 (4.8)
Italy	80	t091 (10.04)	t084 (8.8)	t012 (7.5)	67	t041 (34.3)	t008 (28.4)	t001 (13.4)
Latvia	38	t435 (21.1)	t015 (13.2)	t313, t698 (7.9)	5	b	—	—
Malta	3	b	—	—	12	t001, t032 (30.0)	t012 (20.0)	t002, t022 (10.0)
Netherlands	195	t091 (7.7)	t127 (6.2)	t002, t012, t084 (4.2)	9	b	—	—
Norway	55	t065 (9.1)	t084 (9.1)	t002, t015, t095 (3.7)	0	—	—	—
Poland	132	t127 (12.9)	t084 (9.9)	t015 (7.6)	47	t037 (29.81)	t003, t015 (14.9)	t002, t041, t1574 (6.4)
Portugal	48	t008 (8.3)	t002, t645 (6.3)	t021, t127, t148, t148, t179, t189 (4.2)	40	t032 (32.5)	t002 (20.0)	t535, t747, t2357 (7.5)
Romania	25	t021, t284 (12.0)	t005, t008, t450 (8.0)	a	11	t030 (54.6)	t127 (36.4)	t015 (9.1)
Slovenia	48	t091 (20.8)	t015 (10.4)	t005 (8.5)	10	t041 (70.0)	a	—
Spain	113	t002 (12.4)	t012, t067 (8.0)	t015 (4.5)	91	t067 (47.3)	t002 (15.4)	t008 (7.7)
Sweden	195	t015 (9.2)	t084 (8.2)	t012 (5.7)	5	b	—	—
UK	71	t012, t127 (5.6)	t021 (4.2)	nine different types	60	t032 (61.7)	t788, t1516 (3.3)	a

<sup>a</sup>All remaining *spa types* equally distributed.  
<sup>b</sup>No ranking, all *spa types* equally distributed.  
doi:10.1371/journal.pmed.1000215.t004

Fig. 11. Premier, deuxième et troisième *spa type* de SASM et SARM les plus fréquents selon le pays européen et les proportions correspondantes. D'après Grundmann *et al.* (26)

Quel que soit la résistance à la méticilline, les auteurs n'ont pas montré de lien entre un *spa type* précis et la mortalité 14 jours après le diagnostic d'infection invasive à *S. aureus*, révélant qu'aucun *spa type* n'est synonyme d'hyper-virulence en particulier.

## 2. Aux Etats-Unis

A l'image de la France, les travaux publiés aux Etats-Unis se concentrent essentiellement sur l'épidémiologie moléculaire des SARM alors que les SASM sont impliqués de façon courante dans des infections invasives. L'analyse en *spa typing* de 708 souches américaines de SASM isolées à partir de bactériémies et d'infections de peau et tissus mous de 2004 à 2010 dévoile une large diversité génétique contrastant avec la distribution clonale habituelle des SARM (27). Parmi les 274 *spa type* identifiés, *spa* t002 (n = 63, 8,9%) et t008 (n = 56, 7,9%) sont les plus fréquemment rapportés dans cette étude. Alors que la prédominance des *spa type* ne semble pas varier selon la région ou la période, *spa* t008 est identifié presque deux fois plus souvent dans les infections de peau et tissus mous comparé aux septicémies (respectivement 11,1% versus 5,6% ; p = 0,008).

Fowler *et al.* ont quant à eux génotypé par *spa typing*, MLST et *SCCmec* le cas échéant, 379 isolats de *S. aureus* (125 SARM et 254 SASM) et les ont classé en trois catégories selon l'impact clinique : portage nasal (n = 118), infection non compliquée (n = 104) et septicémie (n = 157) (28). Dix-huit complexes clonaux ont été identifiés parmi 371 isolats (huit se sont avérés non typables), dont trois (CC5, CC15, CC30) ont montré une association significative avec la sévérité de l'infection, ce qui correspond en termes de *spa type* aux types 2 (CC5) et 16 (CC30). Dans un autre travail de la même équipe, une relation est établie entre les souches du complexe CC30 et celles isolées lors d'endocardites (29).

### III. Travail expérimental

#### TITLE

Molecular characterisation of 188 *Staphylococcus aureus* strains associated with bacteraemia in the French teaching hospital of Grenoble in 2013

#### AUTHORS AND AFFILIATIONS

Isabelle Bonnet<sup>1</sup>, Brune Millon<sup>4</sup>, Hélène Meugnier<sup>5-10</sup>, François Vandenesch<sup>5-10</sup>, Max Maurin<sup>1-3</sup>, Patricia Pavese<sup>4</sup>, Sandrine Boisset<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Bactériologie, CHU de Grenoble, France

<sup>2</sup>Univ. Joseph Fourier, LAPM, Grenoble, France

<sup>3</sup>CNRS, UMR5163, LAPM, Grenoble, France

<sup>4</sup>Service de Maladies infectieuses, CHU de Grenoble, France

<sup>5</sup>Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Bron, France

<sup>6</sup>CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>7</sup>Inserm, U1111, Lyon, France

<sup>8</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

<sup>9</sup>Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>10</sup>CNRS, UMR 5308, Lyon, France

## ABSTRACT

Bacteraemia due to *Staphylococcus aureus* mean severe infections, which are sometimes responsible for patient death. In 2013, we noted an increase of this infection in the French teaching hospital of Grenoble compared to 2012 (+29%); this observation was confirmed in 2014. This work aimed to study population concerned by infection in 2013 and to genotype corresponding *S. aureus* strains in order to identify a host risk factor and/or a virulent clone and then elaborate adequately program to control the infection. Clinical data did not indicate any new risk factor. One hundred eighty-eight *S. aureus* isolates (4.8% were methicillin-resistant) on 199 corresponding bacteraemia were characterised with *spa* typing method. Among 108 *spa* types, t571, t002, t008 and t084 were the most prevalent. No major clone was identified. There is no difference between community-acquired strains and hospital-acquired ones, between isolates associated with infective endocarditis and other ones. Thus, we demonstrated that there is no new host risk factor and no emergent clone in the French teaching hospital of Grenoble in 2013. On the microbiologic side, it would be interesting to further characterise our strains to determine their toxic profile and other virulence factors.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bacteraemia, *spa* typing

## INTRODUCTION

The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection has changed dramatically over the past 15 years (1). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections, once confined to individuals in the hospital setting, are now routinely seen in the community. Coordinated research efforts have successfully characterised the distribution of MRSA clonal types across different geographic regions and care settings. Although methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) accounts for a large proportion of staphylococcal infections, comparatively little is known about its molecular epidemiology, in particular in France.

*S. aureus* bacteraemia, methicillin-resistant as well as susceptible, is a worldwide problem associated with increased morbidity and mortality among hospitalized patients; therefore, the identification of the factors influencing its rise, genetic or environmental, is of great concern for the prevention of this infection (2).

In 2013, a significant increase of *S. aureus* bacteraemia was observed in the French teaching hospital of Grenoble compared to the previous years. To investigate this, clinical data of all cases of *S. aureus* bacteraemia in 2013 were collected and corresponding isolates were characterised by *spa* typing in order to determine any new risk factor and/or a potential emerging clone.

## MATERIALS AND METHODS

**Study population.** All cases of *S. aureus* bacteraemia in the French teaching hospital of Grenoble (2000 beds) in 2013 were retrospectively collected. *S. aureus* bacteraemia was defined as at least one positive blood culture performed with the Bactec system (Becton Dickinson, USA). Demographic, clinical and therapeutic data were collected from the patient's medical records. Data concerned age, sex, trip abroad, immunocompromised status, comorbidities, foreign body, *S. aureus* nasal carriage status, the leading cause of hospitalisation, medical history, origin of the bacteraemia (classified as either community-acquired or hospital-acquired), severity and duration of hospitalisation. Infective endocarditis (IE) diagnosis was based on modified Duke criteria and patients were classified in three groups: definite IE, possible IE and excluded IE.

***S. aureus* isolates.** One hundred and ninety-nine bacteraemia-associated *S. aureus* strains of 2013 conserved at room temperature in agar tubes were collected. The *S. aureus* isolates were

identified on the basis of their characteristic growth pattern, colony morphology, Gram staining, catalase test and slide test for clumping factor (Staphytest Plus; Oxoid, UK). All identifications were confirmed by MALDI-TOF MS, using a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics, USA), Flexcontrol 3.0 software and the Biotyper 2.0 database (Bruker Daltonics, USA).

**Antimicrobial susceptibility testing.** Susceptibility testing was performed on Mueller-Hinton agar plates by the disk diffusion method (antibiotic disks; Bio-Rad, USA), according to CA-SFM guidelines. Antibiotics tested were cefoxitin, kanamycin, tobramycin, gentamicin, netilmycin, amikacin, doxycycline, erythromycin, lincomycin, pristinamycin, linezolid, rifampicin, cotrimoxazole, ofloxacin, fusidic acid, fosfomycin, vancomycin, and teicoplanin.

**Spa sequencing.** Polymerase Chain Reaction (PCR) for *spa* typing was performed using primers targeting the *spa* gene as previously described (3). Briefly, genomic DNA was extracted from a three hours culture of bacteria in brain-heart infusion broth by using spin columns with an enzymatic (Lysostaphin) pre-step to ensure lysis of the bacteria (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN). Purified DNA was amplified by primers (*spa*-1113F 5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'; *spa*-1514R 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'). Each 50 µL PCR mixture contained 25 µL of 2X Premix Ex *Taq* DNA polymerase HS (TaKaRa, Otsu, Japan), 5 µL of the forward and reverse 10 µM primers, 10 µL of nuclease free water and 5 µL of DNA. A negative control (DNA free water) was included. The PCR was performed using a TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra, Germany) with an initial denaturation step at 95°C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s and a final extension step at 72°C for 5 min. Five microliters of PCR product were analysed by gel electrophoresis in 1% agarose gel in 1X Tris-borate-EDTA buffer and viewed using Gel Red Nucleic Acid stain (Interchim, Montluçon, France) under UV light. PCR products were then purified during an enzymatic step (Exosap; Ozyme, France). The sequences of both strands were determined. Sequencing was performed using the same primers and the dye terminator method on an ABI 3130xl sequencer (Applied, USA). PCR sequence reaction mixtures contained 3.85 µL of BigDye Terminator, sequencing primers (PA 1113F and PA 1514R, 2pmol/µL), 0.5 µL of purified PCR product and 5.6 µL of DNA free water. PCR were performed on a S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) with the following conditions: an initial step at 95°C for 1 min followed by 25 cycles at 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 4 min at 60°C. Dye terminator

cycle sequencing reaction products were purified with 1 µL of EDTA 125 mM, 1 µL of sodium acetate 3M and 50µL of ethanol 100%, then resuspended in 15 µL of highly deionized formamide. *Spa* types were assigned through the *spa* type database [www.ridom.de/spaserver](http://www.ridom.de/spaserver) (3).

## RESULTS

**Patient characteristics.** Over the study period, 199 *S. aureus* clinical strains were isolated from blood culture. Sixty seven percent of the strains were isolated from men ( $n = 133$ ) and 33% from women ( $n = 66$ ). The mean age of the infected individuals was 63.6 years, with a range of 12 days to 95 years. One hundred and forty-three patients (71.9%) were hospitalized in medical units, 29 (14.6%) in surgical units and 27 (13.6%) in intensive care units. Community-acquired (CA) infections accounted for 50.8% ( $n = 101$ ) of the cases and hospital-acquired (HA) infections for 49.2% ( $n = 98$ ). The clinical description of the population is reported in Table 1.

**Strain characteristics.** Although 199 strains were initially included in this study, two were not found, five did not grow after conservation, one was identified as *Escherichia coli* and were subsequently excluded. Three are about to be characterised (Fig. 1). Of the 188 strains that we typed, the overall MRSA rate was 4.8% ( $n = 9$ ) and the major associated resistances of the 188 isolates concerned erythromycin ( $n = 39$ , 20.7%) and ofloxacin ( $n = 12$ , 6.4%) (Table 2). Of note, all the isolates were susceptible to vancomycin. Among the 188 characterised isolates, MRSA were detected in 2.1% ( $n = 2$ ) of the HA infections ( $n = 94$ ) and in 7.4% ( $n = 7$ ) of the CA infections ( $n = 94$ ). Three MRSA were only resistant to ofloxacin excluding penicillin and methicillin (33.3%).

Among the 188 *S. aureus* isolates examined, 108 *spa* types were identified, two of which were newly assigned during this study. One of the 188 isolates was not able to be assigned a *spa* type through the protocol described above and was consequently excluded from clustering analyses. For two patients, two *S. aureus* isolates were identified corresponding to two different *spa* types. The frequency of each *spa* type was variable, with 1 to 16 isolates per clonal type. Eighty-one *spa* types were represented by only one single isolate, while 27 were represented by at least two isolates. The largest clone was t571, which accounts for 16 isolates (8.5% of all isolates), either in CA or HA infections. Note that 11 of these strains were



resistant to erythromycin (68.8%) (Table 2). The other most prevalent *spa* types were t002 ( $n = 11$ , 5.8%), t008 ( $n = 9$ , 4.8%) and t084 ( $n = 8$ , 4.2%). Among MRSA isolates, t008 was the most frequently detected ( $n = 5$ , 55.6%). Only one MRSA isolate was typed t080, which is probably related to ST80. Figure 2 illustrates the prevalences of the *spa* types within our sample. Using the integrated BURP algorithm, the 108 *spa* types were divided into 15 *spa* clonal complexes and 19 singleton *spa* types (Supplementary data S1). Five clonal complexes are not yet given a name (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*). The prevalence of each *spa* clonal complex (or cluster) is noted in Table 2. Ten strains were excluded because of a number of repeats smaller than five. The four major clonal complexes *spa* CC t015, CC t012, CC t024 and CC t002 contained 42.6% ( $n = 46$ ) of the *spa* types and 53.2% ( $n = 101$ ) of the strains. *Spa* CC t015, CC t084, CC t002 and CC t012 were the clonal complexes the most frequently detected for isolates associated with infective endocarditis (definite and possible) (Fig. 3). The same clonal complexes except for *spa* CC t084 were identified for strains not associated with infective endocarditis. *Spa* CC t015, CC t012, CC t002 and CC t005 were the main clusters detected for isolates associated with severe infection (intensive care unit admission, septic shock and deaths attributable). The same clonal complexes except for *spa* CC t005 were detected for strains associated with no severe infection. *Spa* CC t015 was the most prevalent clonal complex for strains isolated in bone and joint infections, in skin and soft tissue infections and in infections of intravascular devices. *Spa* CC t012 was mostly detected for strains associated with respiratory infections and urinary tract infections.

## DISCUSSION

Significant research has characterised the evolution and spread of MRSA in hospital and community settings. Despite this, comparatively little is known about the evolution and spread of MSSA. Several reports have examined the relationship between MRSA and MSSA in both colonisation and infection and have noted high rates of MSSA invasive disease (4). In 2013, a 29% increase of *S. aureus*, mainly methicillin-susceptible (95%), bacteraemia was observed in the French teaching hospital of Grenoble compared to the previous years. This study aimed to characterise all *S. aureus* isolates associated with bacteraemia in 2013 in order to discriminate between coincident but independent infections and epidemics caused by a single isolate as it directly affects the preventive and hygienic measures to be implemented. Clinical data were also collected for determining any unknown risk factors for *S. aureus* bacteraemia and interpreting *spa* types according to clinical status.

Regarding antimicrobial susceptibility, MRSA strains were more prevalent in CA infections than in HA infections, attesting that MRSA infections are now routinely identified in the community (1). The majority of MRSA were related to *spa* t008 clone, which is usually observed in the USA (5). Only one MRSA isolate was probably associated with the European clone ST80. This observation supports a recent report by Deurenberg *et al.* showing that MRSA clones are disseminating worldwide (5).

Van der Mee-Marquet *et al.* have conducted a regional surveillance of *S. aureus* bacteraemia since 2000 in the Centre region of France (2.5 million inhabitants) (6,7). They reported a regular decrease in incidence, followed by a sudden increase in 2006, which was confirmed the next years. *S. aureus* isolates were mainly methicillin-susceptible as observed in the present study. Their great proportion of NORSA FQ is also reported in our study, even if the MRSA part of our sample is little. According to MLST method, their MSSA isolates were highly diverse and MRSA ones more homogenous. Recently, Valentin-Domelier *et al.* highlighted the emergence of ST398 *S. aureus* bacteraemia (8), as it is described worldwide (9); indeed, ST398 bacteraemia incidence showed a seven-fold increase between 2007 and 2010 with different isolates from the livestock-associated multiresistant and highly pathogenic clone described before. In Valentin-Domelier *et al.* study, 18 ST398 strains collected on an annual 3-month bacteraemia survey were almost all methicillin-susceptible and belonged mainly to the *spa* types t571 and t1451. In our study, the largest clone was t571 (8.5% of the 188 typed isolates) while t1451 was the 6<sup>th</sup> most prevalent clone. However, we must confirm the attribution of isolates exhibiting *spa* type t571 and t1451 to ST398. Note that *spa* type t571 strains described so far were resistant to macrolides due to *ermT* mediated erythromycin resistant. In this study, 68.8% of the *spa* type t571 strains are erythromycin resistant. This important result shows us that we are probably also concerned by the dissemination of this clone, which is not the case for all European countries as in Germany. MSSA t571 represented only 0.14% of German isolates from infections in human between 2006 and 2012 (10).

In contrast to the clustering usually noted with MRSA strains, the main part of our isolates, which was methicillin susceptible, showed a large genetic diversity. This finding is consistent with the previous report of Grundmann *et al.* which indicated similar MSSA heterogeneity across Europe (11). In the same way, wide genetic diversity without geographical or temporal clustering of MSSA was observed in the US (12). Two of the more prevalent MSSA clones found in our study (*spa* t002 and t008) are analogous to MRSA strains and also to commonly circulating ones in Europe (11). These data support the previous findings of Orscheln *et al.*

and suggest that spread of *S. aureus* through hospitals and the community is related more to the characteristics of particular clones than to methicillin resistance, for example the presence of genes encoding Panton-Valentine leucocidin (PVL) exotoxin (13). Moreover, some studies raised the possibility that MRSA originated through the transfer of staphylococcus chromosomal cassette *mec* (SCC*mec*) into extant MSSA lineages with a genetic background common to MRSA (14). Conversely, other MSSA lineages would have a genetic background uncommon to the MRSA clones, supporting the notion that these MSSA lineages may not provide a stable genomic environment for the integration of SCC*mec*, as has been shown before (15).

With clinical data that correspond to staphylococcal isolates, we observe that no particular *spa* type or clonal complex is associated with severe infections because *spa* types are equally distributed whatever the severity of the infection. Likewise, no major *spa* type or clonal complex was identified when strains responsible for definite or possible IE was considered. In an article by Nienaber *et al.*, MSSA IE isolates were significantly more likely to be CC30 (16). This result was not verified in our study, since only 3 among the 15 isolates associated with CC30 were found in IE. Our observations were consistent with a study by Tristan *et al.* comparing IE and bacteraemia isolates showing that a wild range of different *S. aureus* clonal complexes were found to be involved in IE (17). A report by Feil *et al.* described the molecular characteristics of 334 *S. aureus* and noted no link between MLST type and capability of triggering an infection (18). On the contrary, Booth *et al.* identified genetic differences with PFGE when strains from asymptomatic carriers were compared to those from infected patients (19). For other bacteria as *Streptococcus pneumoniae* or *Neisseria meningitidis*, studies are more unequivocal and show a clear association between strain type and pathology (20,21). Feil *et al.* explained their results by a weak link between clonality and virulence factors. In other words, isolates within the same clone may be distinct due to their virulence factors and therefore their capability of infecting the patient.

Our study is not without limitations. First, it would have been interesting to characterise *S. aureus* strains of 2012 in order to compare to those of 2013 and distinguish some genetic differences since the rate of *S. aureus* bacteraemia was lower in 2012; unfortunately, they were not available. Furthermore, given the type of molecular characterisation of strains, which concerns only a small part of the genome, our results should be completed. The detection of virulence factors could be analysed by the use of a microarray available in the National Reference Center of Staphylococcus in Lyon (puce StaphyType<sup>®</sup>, Alere).

## REFERENCES

1. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis. 2001 Apr;7(2):178–82.
2. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2003 Jan 1;36(1):53–9.
3. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3556–63.
4. David MZ, Boyle-Vavra S, Zychowski DL, Daum RS. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: a possible reversal of roles? PLoS One. 2011;6(4):e18217.
5. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. 2008 Dec;8(6):747–63.
6. van der Mee-Marquet N, Epinette C, Loyau J, Arnault L, Domelier A-S, Losfelt B, et al. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections changed significantly in 2006. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):851–7.
7. van der Mee-Marquet N, Domelier A-S, Girard N, Quentin R, Bloodstream Infection Study Group of the Relais d'Hygiène du Centre. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5650–7.
8. Valentin-Domelier A-S, Girard M, Bertrand X, Violette J, François P, Donnio P-Y, et al. Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? PLoS One. 2011;6(12):e28369.
9. van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. Emerg Infect Dis. 2007 Dec;13(12):1834–9.
10. Cuny C, Leyer F, Köck R, Werner G, Witte W. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) of clonal complex CC398, t571 from infections in humans are still rare in Germany. PLoS One. 2013;8(12):e83165.
11. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med. 2010 Jan;7(1):e1000215.
12. Miko BA, Hafer CA, Lee CJ, Sullivan SB, Hackel MAM, Johnson BM, et al. Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):874–9.

13. Orscheln RC, Hunstad DA, Fritz SA, Loughman JA, Mitchell K, Storch EK, et al. Contribution of genetically restricted, methicillin-susceptible strains to the ongoing epidemic of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug 15;49(4):536–42.
14. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4289–94.
15. Katayama Y, Robinson DA, Enright MC, Chambers HF. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2380–3.
16. Nienaber JJC, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. J Infect Dis. 2011 Sep 1;204(5):704–13.
17. Tristan A, Rasigade J-P, Ruizendaal E, Laurent F, Bes M, Meugnier H, et al. Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. PloS One. 2012;7(12):e51172.
18. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? J Bacteriol. 2003 Jun;185(11):3307–16.
19. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. Infect Immun. 2001 Jan;69(1):345–52.
20. Müller-Graf CD, Whatmore AM, King SJ, Trzcinski K, Pickerill AP, Doherty N, et al. Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. Microbiol Read Engl. 1999 Nov;145 ( Pt 11):3283–93.
21. Townsend R, Goodwin L, Stevanin TM, Silcocks PB, Parker A, Maiden MCJ, et al. Invasion by *Neisseria meningitidis* varies widely between clones and among nasopharyngeal mucosae derived from adult human hosts. Microbiol Read Engl. 2002 May;148(Pt 5):1467–74.

Table 1. Classification of *S. aureus* bacteraemia according to associated infection site and severity of the infection (intensive care unit admission, septic shock and deaths attributable)

	CA infections	HA infections	Total, n (%)
<i>Associated infection site</i>			
Bone and joint infections	25	6	31 (15.6)
Skin and soft tissue infections	27	11	38 (19.1)
Infections of vascular foreign body	22	42	64 (32.2)
Respiratory infections	8	9	17 (8.5)
Urinary tract infections	2	3	5 (2.5)
Infective endocarditis (definite)	7	1	8 (4.0)
Infective endocarditis (possible)	31	25	56 (28.1)
Total infective endocarditis	38	26	64 (32.2)
<i>Severe infections</i>			
	21	31	52 (26.1)

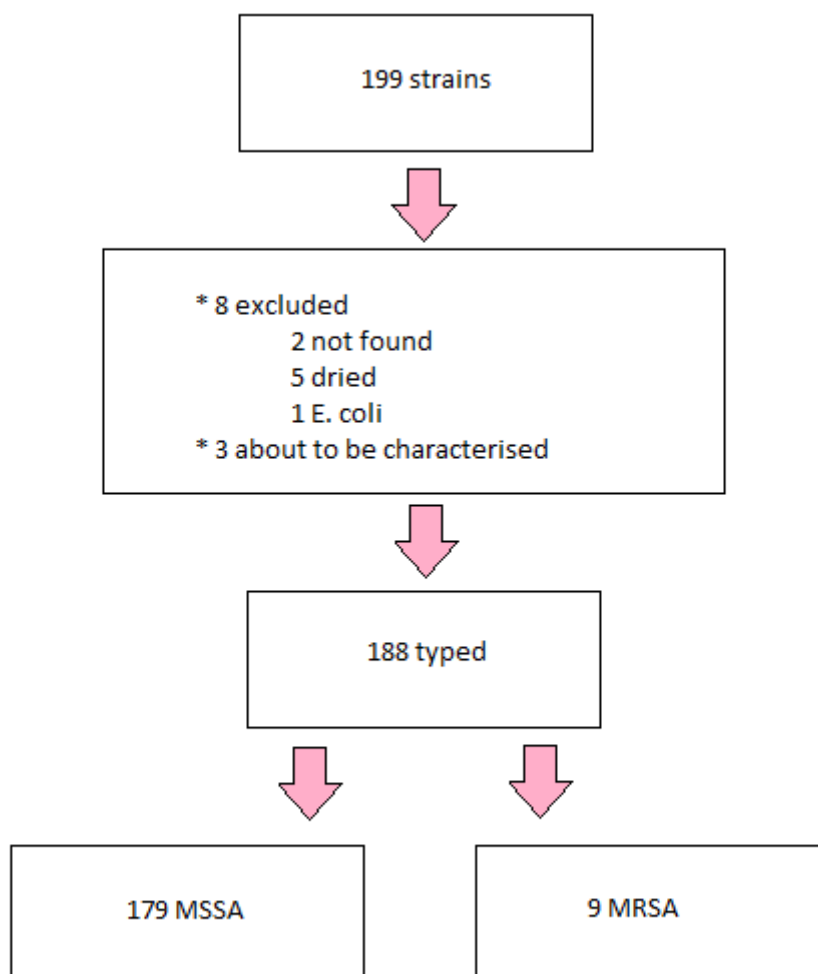


Fig. 1. Flowchart of the strains selection

Table 2. Antibiotic resistance profiles of 188 isolates of *S. aureus* collected in 2013 in the teaching hospital of Grenoble

	<i>MSSA</i>		<i>MRSA</i>		<i>t571</i>	
	<i>(n = 179)</i>		<i>(n = 9)</i>		<i>(n = 16)</i>	
<b>Antibiotic</b>	S	R (%)	S	R (%)	S	R (%)
Oxacillin	179	0	0	9(100)	16	0
Gentamicin	178	1(0.6)	9	0	16	0
Tobramycin	178	1(0.6)	5	4(44.4)	16	0
Kanamycin	176	3(1.7)	4	5(55.6)	16	0
Amikacin	177	2(1.1)	6	3(33.3)	16	0
Netilmycin	178	1(0.6)	9	0	16	0
Doxycycline	175	4(2.2)	9	0	16	0
Erythromycin	143	36(20.1)	6	3(33.3)	5	11 (68.8)
Lincomycin	175	4(2.2)	7	2(22.2)	16	0
Cotrimoxazole	178	1(0.6)	9	0	16	0
Fosfomycin	179	0	9	0	16	0
Fusidic acid	179	0	9	0	16	0
Pristinamycin	179	0	9	0	16	0
Rifampicin	179	0	8	1(11.1)	16	0
Nitrofurantoin	179	0	9	0	16	0
Ofloxacin	175	4(2.2)	1	8(88.9)	16	0
Linezolid	179	0	9	0	16	0
Teicoplanin	179	0	9	0	16	0
Vancomycin	179	0	9	0	16	0
<b>Total</b>		179		9		16

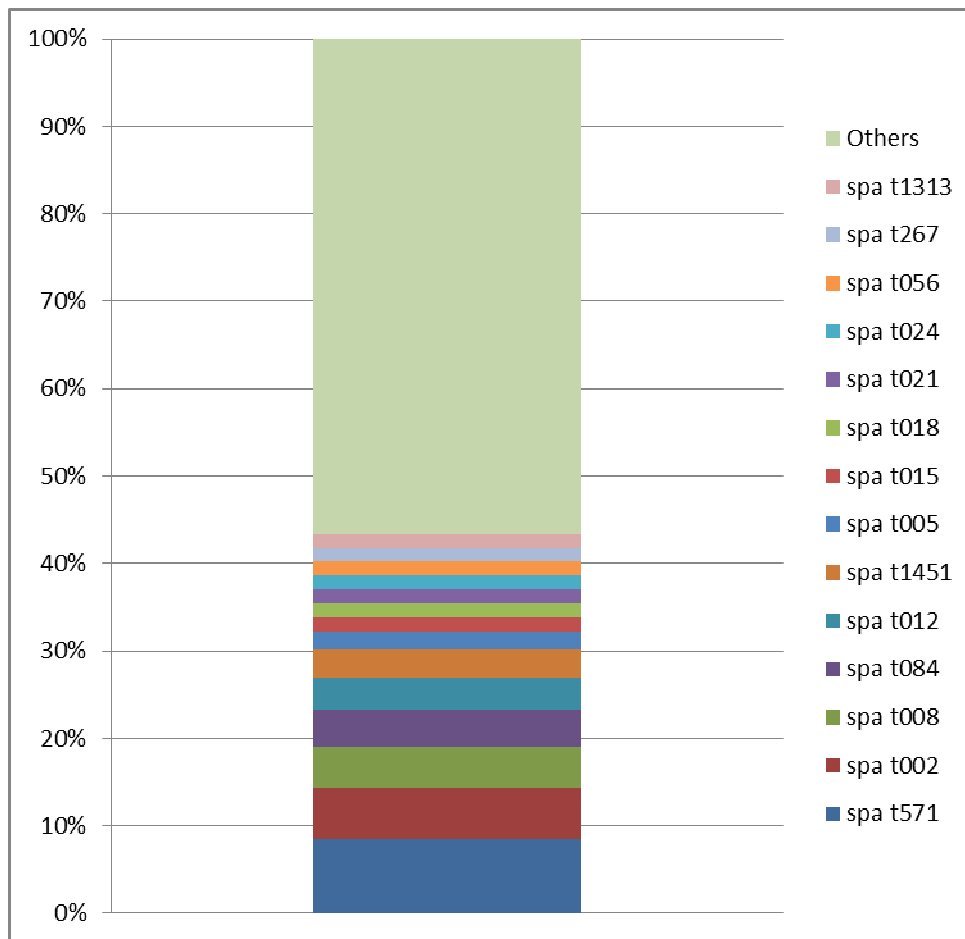


Fig. 2. Overall frequency of *spa* types. Types with  $\leq 2$  isolates per type are categorized as “others” ( $n = 95$  of 108 total *spa* types).



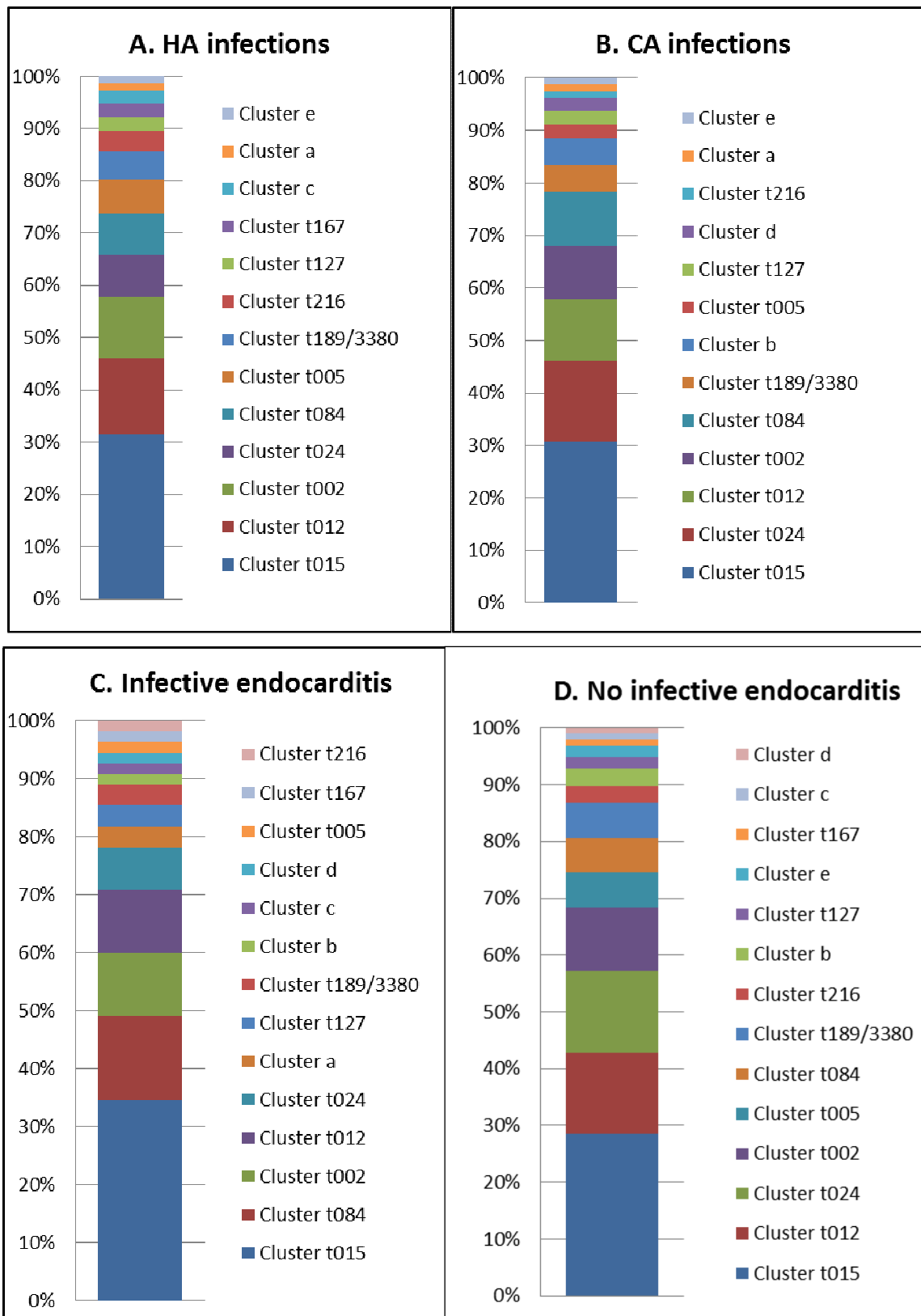


Fig. 3. A & B: Frequency of *spa* clusters of *S. aureus* isolates by clinical origin (community- and hospital-acquired infections); C & D: Frequency of *spa* clusters of *S. aureus* isolates from patients with infective endocarditis (definite and possible) and patients without infective endocarditis.

Table 2. Frequencies of *spa* clusters. CA: Community-acquired infections; HA: Hospital-acquired infections; IE: Infective endocarditis (definite and possible); severe infections: intensive care unit admission, septic shock and deaths attributable

<i>Cluster (prevalent types)</i>	<i>No. of spa types (%) (n = 108)</i>	<i>No. of strains (%) (n = 188)</i>	<i>No. of CA strains (%) (n = 94)</i>	<i>No. of HA strains (%) (n = 94)</i>	<i>No. of strains (%) (n = 61)</i>	<i>No. of IE strains (%) (n = 127)</i>	<i>No. of severe infections (n = 46)</i>	<i>No. of no severe infections (n = 142)</i>
t015 (t015, t050, t230, t571, t1451, t4896)	22 (20.4)	46 (24.5)	24 (25.5)	24 (25.5)	19 (31.1)	28 (22.0)	11 (23.9)	35 (24.6)
t012 (t012, t018, t021)	10 (9.3)	20 (10.6)	9 (9.6)	11 (11.7)	6 (9.8)	14 (11.0)	8 (17.4)	13 (9.2)
t024 (t008, t024, t1171)	7 (6.5)	18 (9.6)	12 (12.8)	6 (6.4)	4 (6.5)	14 (11.0)	1 (2.2)	15 (10.6)
t002 (t002)	7 (6.5)	17 (9.0)	8 (8.5)	9 (9.6)	6 (9.8)	11 (8.6)	4 (8.7)	13 (9.2)
t189/3380 (t267)	6 (5.6)	8 (4.3)	4 (4.3)	4 (4.3)	2 (3.3)	6 (8.7)	3 (6.5)	4 (2.8)
t216 (t216)	5 (4.6)	6 (3.2)	1 (1.1)	3 (3.2)	1 (1.6)	3 (2.4)	1 (2.2)	3 (2.1)
t084 (t084, t279, t346)	5 (4.6)	14 (7.4)	8 (8.5)	6 (6.4)	8 (13.1)	6 (4.7)	2 (4.3)	10 (7.0)
t005 (t005)	4 (3.7)	7 (3.7)	2 (2.1)	5 (5.3)	1 (1.6)	6 (4.7)	3 (6.5)	4 (2.8)
t167	3 (2.8)	3 (1.6)	0	2 (2.1)	1 (1.6)	1 (0.8)	0	2 (1.4)
t127 (t177)	3 (2.8)	4 (2.1)	2 (2.1)	2 (2.1)	2 (3.3)	2 (1.6)	2 (4.3)	2 (1.4)
<i>a</i>	2 (1.9)	2 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (3.3)	0	1 (2.2)	1 (0.7)
<i>b</i> (t056)	2 (1.9)	4 (2.1)	4 (4.3)	0	1 (1.6)	3 (2.4)	0	4 (2.8)
<i>c</i>	2 (1.9)	2 (1.1)	0	2 (2.1)	1 (1.6)	1 (0.8)	1 (2.2)	1 (0.7)
<i>d</i>	2 (1.9)	2 (1.1)	2 (2.1)	0	1 (1.6)	1 (0.8)	0	2 (1.4)
<i>e</i>	2 (1.9)	2 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0	2 (1.6)	0	2 (1.4)



#### IV. Synthèse des résultats et perspectives

Parmi les 199 bactériémies à *S. aureus* survenues en 2013, 101 (50,8%) étaient communautaires et 98 (49,2%) étaient nosocomiales. La grande majorité des patients étaient hospitalisés dans un service de médecine (71,9%). Les foyers infectieux associés à la bactériémie étaient variés, allant de l'infection ostéo-articulaire à celle du tractus urinaire. On note en particulier 64 cas d'endocardite infectieuse (32,2%) si l'on tient compte à la fois des endocardites infectieuses probables et certaines selon les critères de Duke modifiés. D'un point de vue clinique, aucun nouveau facteur de risque n'a été identifié. Sur les 199 souches de *S. aureus* correspondantes aux bactériémies, 188 ont pu être typées selon la méthode du *spa typing*. Ces 188 isolats étaient composés de 179 SASM (95,2%) et de 9 SARM (4,8%). Cent huit *spa type* ont été identifiés, dont le plus fréquent était t571 (8,5%,  $n = 16$ ). L'hypothèse d'un éventuel clone émergent responsable de la recrudescence des bactériémies à *S. aureus* au CHU de Grenoble a donc été écartée. Néanmoins, *spa* t571 est probablement rattaché au complexe clonal CC398, dont l'incidence croissante a récemment été observée en France et dans le reste du monde ces dernières années. Après avoir rassemblé nos *spa type* en *cluster*, aucune différence n'a été constatée entre les souches liées à des infections graves et celles liées à des infections moins graves. En outre, aucun *cluster* de *spa type* en particulier n'était associé à l'endocardite infectieuse.

Prochainement, nous souhaiterions affiner la caractérisation moléculaire de certaines de nos souches au Centre National de Référence des Staphylocoques à Lyon à l'aide de biopuce (StaphyType<sup>®</sup>, Alere). L'association au CC398 des isolats *spa* t571 serait ainsi établie avec certitude. Un profil toxinique particulier, expliquant la hausse récente des bactériémies associées, pourrait être mis en évidence par cette technique. Il serait également intéressant d'effectuer le génotypage des souches de *S. aureus* des années suivantes, selon la méthode du *spa typing*, afin d'étudier l'évolution de la distribution des *spa type* dans le temps. Sur le plan clinique, la population comportant des facteurs de risque de développer une bactériémie à *S. aureus*, notamment le port de matériel étranger vasculaire, a augmenté. Par conséquent, ce constat devrait influencer le médecin dans sa décision d'introduire et de maintenir ou non un dispositif intra-vasculaire chez un patient.

THESE SOUTENUE PAR : Isabelle BONNET

TITRE :

**Caractérisation moléculaire de 188 souches de *Staphylococcus aureus* responsables de bactériémies au CHU de Grenoble sur l'année 2013**

## CONCLUSIONS

Les bactériémies à *Staphylococcus aureus* sont synonymes d'infection grave et amènent parfois le patient au décès. En 2013, nous avons remarqué une recrudescence de ce type d'infection par rapport à l'année précédente au CHU de Grenoble. En effet, 199 souches de *S. aureus* étaient isolées à partir d'hémocultures au cours de l'année 2013 contre 154 en 2012, soit une augmentation de 29%. Cette tendance s'est confirmée en 2014 puisque 197 hémocultures sont revenues positives à *S. aureus* cette année-là.

L'objectif de ce travail était à la fois d'étudier la population concernée par l'infection en 2013 et d'analyser sur le plan moléculaire les souches de *S. aureus* mises en cause, afin de distinguer des facteurs de risque liés à l'hôte et/ou d'identifier un clone particulièrement virulent et ainsi mettre en œuvre dans le futur des actions adaptées visant à enrayer le phénomène.

Les données cliniques de notre étude n'ont pas montré de nouveau facteur de risque. D'un point de vue biologique, 188 isolats de *S. aureus*, dont 9 étaient résistants à la méticilline (4,8%), issus de bactériémies en 2013 ont été caractérisés selon la méthode du *spa typing*. Parmi les 108 *spa type* identifiés, t571, t002, t008 et t084 sont les plus fréquents. Aucun clone majoritaire n'a été mis en évidence. Il n'apparaît pas de différence majeure entre les souches



## V. Références bibliographiques

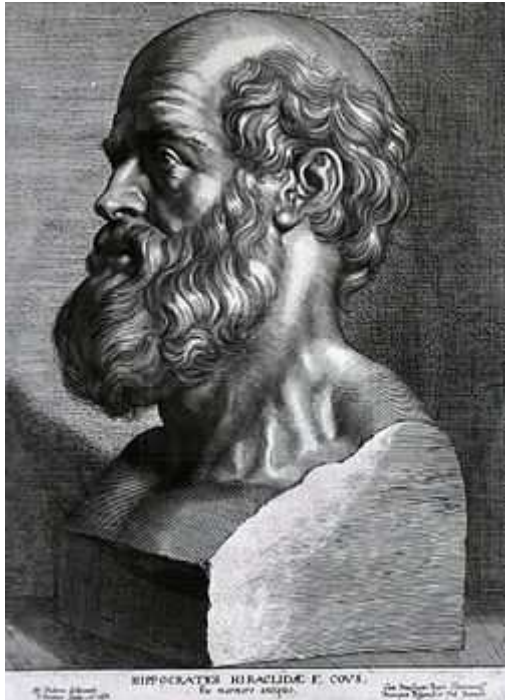
1. Laupland KB, Lyytikäinen O, Søgaaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 May;19(5):465–71.
2. David MZ, Boyle-Vavra S, Zychowski DL, Daum RS. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: a possible reversal of roles? *PloS One*. 2011;6(4):e18217.
3. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1994 Feb;32(2):407–15.
4. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1995 Mar;33(3):551–5.
5. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233–9.
6. van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *SmaI* macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 1998 Jun;36(6):1653–9.
7. van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Apr;7(2):174–84.
8. van Belkum A, Bax R, Peerbooms P, Goessens WH, van Leeuwen N, Quint WG. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1993 Apr;31(4):798–803.
9. Saulnier P, Bourneix C, Prévost G, Andremont A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1993 Apr;31(4):982–5.
10. Struelens MJ, Bax R, Deplano A, Quint WG, Van Belkum A. Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1993 Aug;31(8):1964–70.
11. Bosch T, Pluister GN, van Luit M, Landman F, van Santen-Verheuvél M, Schot C, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis is superior to *spa* typing and sufficient to characterize MRSA for surveillance purposes. *Future Microbiol*. 2015 Jul;10:1155–62.

12. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1008–15.
13. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 1996 Jan;15(1):60–4.
14. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3556–63.
15. Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonça R, De Ryck R, Struelens MJ. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan;45(1):127–33.
16. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother*. 2013 Jun;45(2):117–36.
17. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):4961–7.
18. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2008 Dec;8(6):747–63.
19. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc Microbiol*. 2011;60(2):95–103.
20. SenGupta DJ, Cummings LA, Hoogestraat DR, Butler-Wu SM, Shendure J, Cookson BT, et al. Whole-genome sequencing for high-resolution investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and genome plasticity. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2787–96.
21. Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9786–91.
22. Manual\_S aureus\_ PM 7\_2013-03-21 - 05\_16\_04\_0001\_V05\_Manual\_S\_aureus.pdf [Internet]. [cited 2015 Sep 10]. Available from: [http://alere-technologies.com/fileadmin/Media/Downloads/op/manuals/05\\_16\\_04\\_0001\\_V05\\_Manual\\_S\\_aureus.pdf](http://alere-technologies.com/fileadmin/Media/Downloads/op/manuals/05_16_04_0001_V05_Manual_S_aureus.pdf)



23. van der Mee-Marquet N, Domelier A-S, Girard N, Quentin R, Bloodstream Infection Study Group of the Relais d'Hygiène du Centre. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5650–7.
24. van der Mee-Marquet N, Epinette C, Loyau J, Arnault L, Domelier A-S, Losfelt B, et al. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections changed significantly in 2006. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):851–7.
25. van der Mee-Marquet N, François P, Domelier A-S, Arnault L, Girard N, Schrenzel J, et al. Variable-number tandem repeat analysis and multilocus sequence typing data confirm the epidemiological changes observed with *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):2863–71.
26. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med. 2010 Jan;7(1):e1000215.
27. Miko BA, Hafer CA, Lee CJ, Sullivan SB, Hackel MAM, Johnson BM, et al. Molecular characterization of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States, 2004 to 2010. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):874–9.
28. Fowler VG, Nelson CL, McIntyre LM, Kreiswirth BN, Monk A, Archer GL, et al. Potential associations between hematogenous complications and bacterial genotype in *Staphylococcus aureus* infection. J Infect Dis. 2007 Sep 1;196(5):738–47.
29. Nienaber JJC, Sharma Kuinkel BK, Clarke-Pearson M, Lamlertthon S, Park L, Rude TH, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. J Infect Dis. 2011 Sep 1;204(5):704–13.

## VI. Serment d'Hippocrate



# **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*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.*