

Staphylococcus aureus
Résistant à la Méthiciline :
Comment ne pas les rater !

Gérard Lina

Centre de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon
CIRI- INSERM U1111, UCBL-1, équipe "Pathogénie des
staphylocoques"

SARM, ne pas les rater !

- Est ce la fin programmée des SARM ?
- Comment *S. aureus* devient résistant à la méthiciline ?
- Comment les dépister ?
 - Surveillance épidémiologique
 - Antibiogramme
 - Tests immunologique

Les SARM n'ont pas disparu !

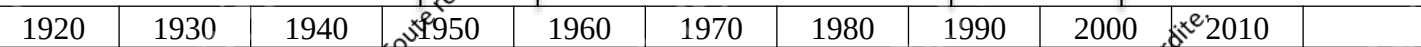
Première utilisation de la méthicilline

Emergence des SARM hospitaliers

Emergence des SARM communautaires

Emergence des SARM dans les élevages

2014



Pandémie de SARM

Pandémie de SARM hospitaliers

Pandémie de SARM communautaires

Pandémie de SARM élevages/aliments



HA-MRSA

124 Jan. 14, 1961

Correspondence

Because of heavy pressure on our space, correspondents are asked to keep their letters short.

"Colloids" - resistant Staphylococcus

Sir,—The Staphylococcus Reference Laboratory receives for phage-typing large numbers of strains of staphylococci, and it seemed that this material might usefully be examined to see whether any strains resistant to the new penicillin-resistant penicillin (NRP, 1241, "colloids") were in circulation at about the time of introduction of the new antibiotic.

Between the beginning of October and the end of November, 1960, 1,440 strains have been tested. 4,340 of these strains were from routine material from hospitals, largely from South-eastern England; some were from other parts of the country and from abroad. Not all the 4,340 are truly independent strains. The great majority were penicillin-resistant and many were resistant to several antibiotics. The remaining 1,100 strains were isolated during October and November, 1959, from nasal swabs of healthy R.A.F. personnel.

M. Patricia Dwyer.

Staphylococcus Reference Laboratory,
Colindale, London N.W.9.



NEWS HEALTH

Rugby players 'share towels, razors and bugs'

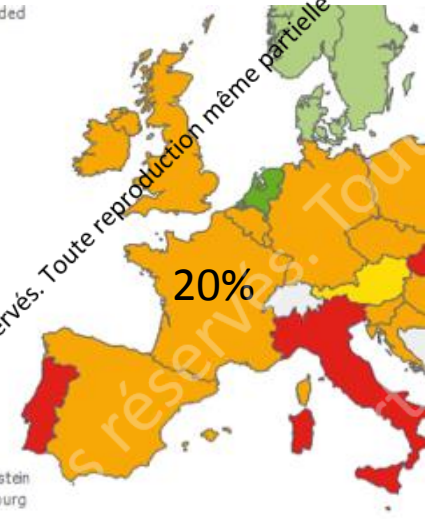
By Sandra Marchant



Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Pig Farming

Andreas Voss,*† Frans Loeffen,* Judith Bakker,* Corne Klaassen,† and Mireille Wulf*

We conducted a study among a group of 26 regional pig farmers to determine the methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevalence rate and found it was >760 times greater than the rate of patients admitted to Dutch hospitals. While spa-type 1108 is apparently a more widespread clone among pig farmers and their environment, we did find other spa-types.



20%

Question 1

Quelle est la technique la plus sensible pour la détection direct de SARM à partir d'un prélèvement ?

- A. Ensemencement direct sur milieux chromogène
- B. Ensemencement sur milieu chromogène après enrichissement
- C. Tests moléculaires

Question 1

Quelle est la technique la plus sensible pour la détection direct de SARM à partir d'un prélèvement ?

- A. Ensemencement direct sur milieux chromogène
- B. Ensemencement sur milieu chromogène après enrichissement
- C. Tests moléculaires

SARM-mecA, quel milieu chromogénique ?

Nombreuses formulations

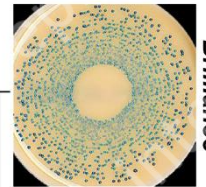
- SARM = colonies colorées, facile à lire
- Variation de la sensibilité & spécificité
- Bonne performance générale, 48h

Prospective Two-Center Comparison of Three Chromogenic Agars for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Screening in Hospitalized Patients

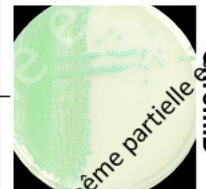
TABLE 1 Summary of the diagnostic performance of both methods

Performance	Direct culture at incubation time of:					
	24 h			48 h		
	SMART	chromID	OX2	SMART	chromID	OX2
No. with result of:						
True positive	71	54	65	84	76	
False negative	36	5	42	23	31	29
True negative	1,102	1,105	1,110	1,089	1,077	1,090
False positive	11	8	3	24	36	23
Sensitivity (% [no./total no.])	66.4 (71/107)	50.5 (54/107)	60.7 (65/107)	78.5 (84/107)	71.0 (76/107)	72.9 (78/107)
Specificity (% [no./total no.])	99.0 (1,102/1,113)	99.3 (1,105/1,113)	99.7 (1,110/1,113)	97.8 (1,089/1,113)	96.8 (1,077/1,113)	97.9 (1,090/1,113)
PPV (% [no./total no.])	86.6 (71/82)	87.1 (54/62)	95.6 (65/68)	77.8 (84/108)	67.9 (76/112)	77.2 (78/101)
NPV (% [no./total no.])	96.8 (1,102/1,138)	95.4 (1,105/1,158)	96.4 (1,110/1,152)	97.9 (1,089/1,112)	97.2 (1,077/1,108)	97.4 (1,090/1,119)
High selectivity (%)	88.2	89.0	92.5	78.0	73.3	83.4

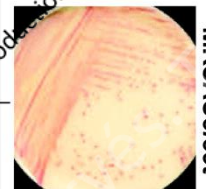
* Total number of samples, 1220; no. of MRSA isolates, 107.



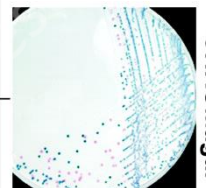
Brilliance



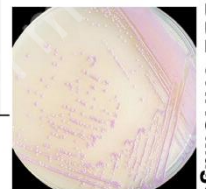
chromID



MRSASelect

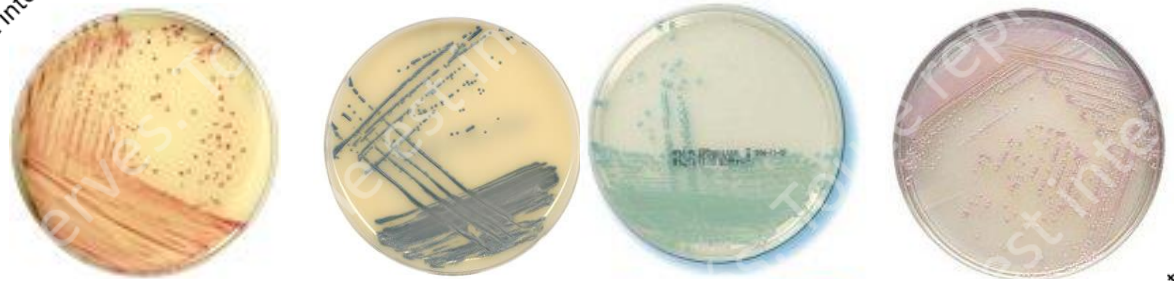


CHROMagar



BBL-CHROMagar

SARM-mecC, quel milieu chromogénique ?



Laurent et al, ECCMID 2012

			MRSA Select (bioRad)	MRSA Brilliance 2 (Oxoid)	ChromID MRSA (bioMérieux)	CHROM Agar II (BD)
Clonal Complex	Spa- types	agr	Res / Sens	Res / Sens	Res / Sens	Res / Sens
CC130 n=92	t843, t528, t1048, t1532, t1535, t3218, t3256, t3570, t5970, t6220, t6293, t7734, t7485, t7946, t7947	agr 3	62 / 30	89 / 2	91 / 1	74 / 18
CC1943 n=14	t978, t2343, t2345, t3391, t8835	agr 4	6 / 8	14 / 0	14 / 0	9 / 5
CC425 n=5	t6386, t742, t6292, t6292	agr 2	2 / 3	5 / 0	5 / 0	5 / 0
Correctly identified			63%	98.2%	99.1%	79.3%

Enrichissement sélectif - ↑ détection

Table 1. Study results evaluating direct plating on BA and ChromID MRSA (ChromID), with and without enrichment step in NB or semi-selective enrichment broth (TSB-SSI) of 1224 clinical samples from the hospitals in EUREGIO; 263 samples were positive by at least one method

	Direct plating		NB+plating		TSB-SSI+plating	
	ChromID	BA and ChromID	ChromID	BA and ChromID	ChromID	BA and ChromID
True positive	183	203	200	205	216	223
True negative	957	853	957	848	960	901
False positive ^a	4	105	4	110	1	60
False negative	80	63	63	61	47	40
Sensitivity % ^b	69.6	76.3	76.0	77.1	82.1	84.8
Specificity %	99.5	89.1 ^c	99.6	88.6 ^c	99.6	93.8 ^c
PPV	97.9	65.9 ^c	98.0	65.1 ^c	99.5	78.8 ^c
NPV	92.3	93.5	93.8	93.4	95.3	95.4

^aGrowth of MSSA.

^bThe procedure of using previously analysed swabs (see the Materials and methods section) may have lowered sensitivity in general.

^cResults when including MSSA growth on BA.

Sensitivity <85% pre-used swabs + dilution

Enrichissement sélectif - ↑ détection

Effet temps d'enrichissement

Treatment	No. of CFU/ml ^a			No. of positive samples
	Range	Average	95% confidence interval	
Direct plating	1.00×10^2 to 3.89×10^8	1.83×10^7	1.68×10^2 to 1.67×10^8	28
4-h pre-enrichment	2.00×10^2 to 5.19×10^8	2.07×10^7	2.66×10^2 to 2.01×10^8	27 ^b
Overnight pre-enrichment	4.00×10^2 to 6.39×10^8	9.23×10^7	9.5×10^2 to 5.67×10^8	40 ^c

^a Colony counts are expressed per ml to allow comparison between the three plating treatments.

^b Two samples showed growth after direct plating but not after 4 h of pre-enrichment.

^c Two samples showed growth after direct plating, of which one also grew after 4 h but not after 24 h of pre-enrichment.

Heirstraeten *et al* JCM 2009;47:3326

Effet milieux d'enrichissement

TABLE 1. Sensitivity and specificity of MRSA selective media evaluated in vitro^a

Medium	Direct inoculation (24-h incubation)			Enrichment broth plus agar (48-h incubation)					
	Sensitivity (%)	Specificity (%) ^b		TSB			PHMB		
				Sensitivity (%)	Specificity (%) ^b		Sensitivity (%)	Specificity (%) ^b	
		MSSA	MRCNS						
	MRSA			MRSA	MSSA	MRCNS	MRSA	MSSA	MRCNS
MRSA SSI	99		100	100	96	100	75	96	100
ChromID MRSA	98	100	94	100	92	96	73	92	96
MRSA Select	98	100	98	100	87	98	75	94	96
MSA	87/92 ^c	100	70	100	87	65	71	98	73
BA	100			100	85	33	76	73	43

^a Both direct inoculation and subculture in two different broths and subsequent plating were evaluated for 196 staphylococcal isolates in pure culture.

^b Percentage of plates without additional workload due to growth of MSSA and MRCNS exhibiting the same colony color as the MRSA isolates.

^c Following 24 and 48 h of incubation, respectively.

Böcher *et al* JCM 2008;46:3136

Détection augmenté par l'enrichissement

Référence	Total no. SARM / No. échantillon	Milieux	Milieu d'enrichissement	% de SARM additionnelle détecté
Cookson et al. Lancet (1987) March 21;1:696	139 / 666	☐ MSA + 5mg/L methicillin	Oxoid nr.2 (7,5% NaCl) + same agar	44%
Van Ogtrop et al. Antimic agents & chemoterapy (1995) Sept.,p. 269	464 / 1548	☐ BA ☐ MSA	Nutrient broth (6,5% NaCl) Oxoid + same agars	14%
Davies et al. J Clin Pathol (1997);50:257-258	134 / 402	☐ MSA ☐ MSA ox ☐ BP + ciproxin	Tryptone broth, Unipad (6% NaCl) + same agars	9 - 18%
Wanten et al. Nephrol Dial Transplant (1998)13:1256- 1258	141 / 454	☐ BA ☐ MSA	TSB (6,5% NaCl) , BBL + same agars	23%
Gardam et al. Inf contr hosp epid (2001) March, P. 152-156	156 / 1644	☐ MSA ox 2mg/L ☐ MSA ox 4 mg/L	Tryptone broth (7,5% NaCl), Difco + MSA 4mg/L oxa. (ASM protocol)	13 - 23%
Wertheim et. al J Clin microbiol (2001),39: P.2660- 2663	40 / 1098	☐ BA ☐ MSA	MSB + Ceftizoxime + Aztreonam + BA	43%
Blanc et al. J Clin microbiol (2003) Aug, P.3499-3502	1112 / 7929	ORSA (Oxoid)	Mueller Hinton 5mg/l oxa. (4, 5% NaCl) + ORSA / LSMA	24%
Safdar et al. J Clin microbiol (2003) July, 41, P. 3161-3166	43 / 816	☐ MSA ☐ MHA ox ☐ MSA ox ☐ MSAL ox	TSB (6,5% NaCl) + same agars	7 - 14 %
Grmek-Kosnik et al. J hosp inf (2005) 61, P. 155-161	86 / 1254	☐ BA ☐ ORSA (Oxoid)	Todd-Hedwitt broth (BD)+ CNA supplement (Oxoid) + same agars	20 - 30%

Détection des SARM par les méthodes moléculaires

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Nombreux tests commercialisés

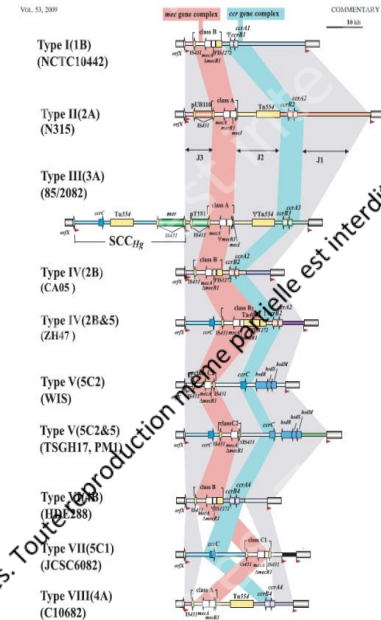
■ Détection

- *mecA* & *mecC*
- jonction avec *orfX*
- mise à jour des nouveaux SCCmec types

■ Différents amorces/sondes

■ PCR <2h

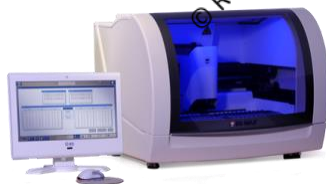
■ Accrédité (nez) – CE, FDA, etc...



Simplexa™



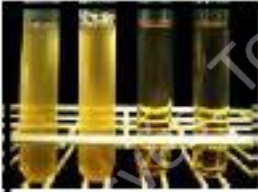
BD MAX™



Performances détection moléculaire?

Produits	Echantillon	Sensibilité	Specificité
GeneOhm™ MRSA BD*	Nez	83-94 %	94-97%
	Autres	76-100 %	93-98%
Cepheid Xpert MRSA	Nez	86-90%	95-97%
GenoQuick® MRSA, Hain Lifescience	Nez	70%	96%
	Autres	68%	96%

van Hal; JCM 2007, 2486; De San; JCM 2007, 1098 ; Zhang, JCM, 2007,2278; Paule, JCM, 2993; Farley, JCM, 2008,743; Rossney, JCM, 2008,3286; Wolk, JCM,2009



Performances des différentes méthodes commerciales de détection des SARM

Methods	TAT hours	Limit of detection CFU/ml*	Costs	Trained personnel	Core lab	Workload
Chromogenic agars	24-48	170	+	No	No	++
Enrichment broth	48-96	10	+	No	No	++
BD GeneOhm MRSA	2.5	190	+++	Yes	No	+
GeneXpert MRSA	<1.5	60	++++	No	Yes	+/-



TAT, turnaround time

* Rossney et al. JCM 2009

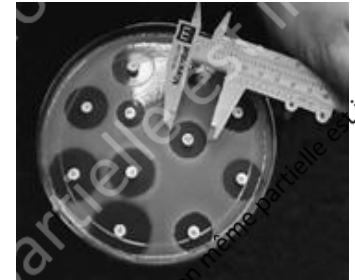


Détection phénotypique des SARM à partir de l'antibiogramme

“Microbiologists do it with culture and sensitivity” !

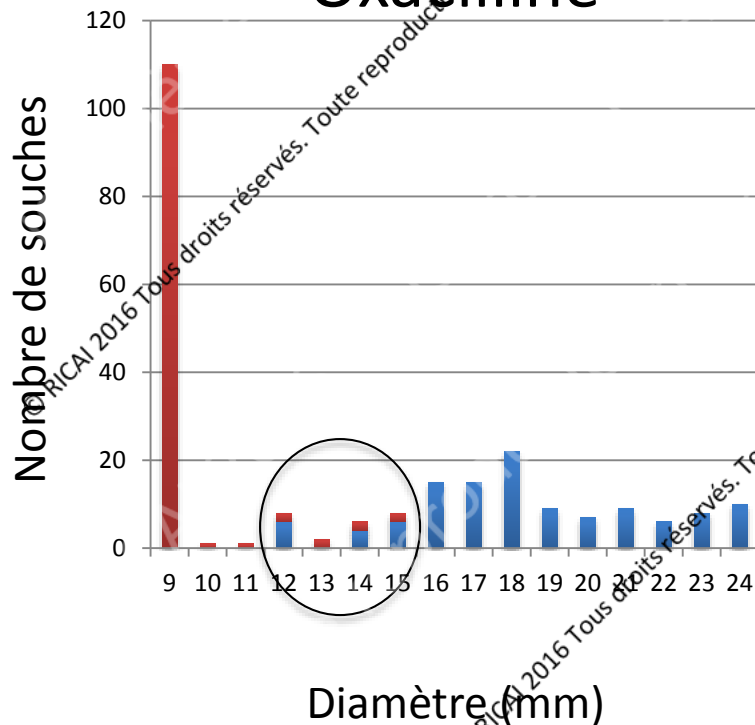
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

- Méthodes qualitative (S/I/R)
 - Diffusion en gélose
- Méthodes quantitatives (CMI, mg/L)
 - Microdilution
 - Gradient (Etests, MICE™)
- Automates

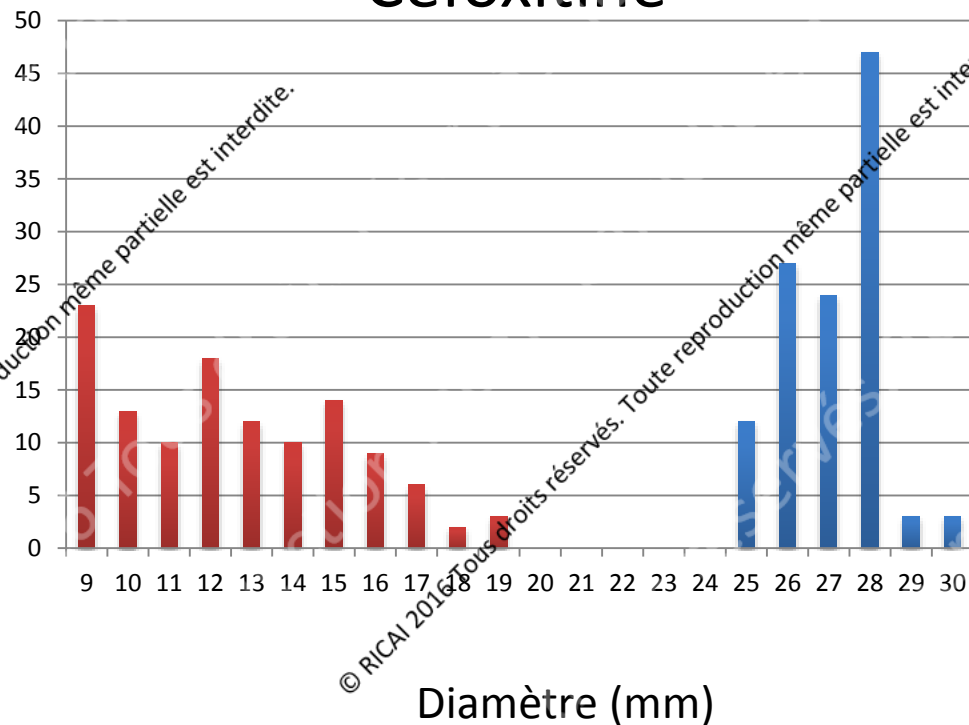


Oxacilline versus Cefoxitine

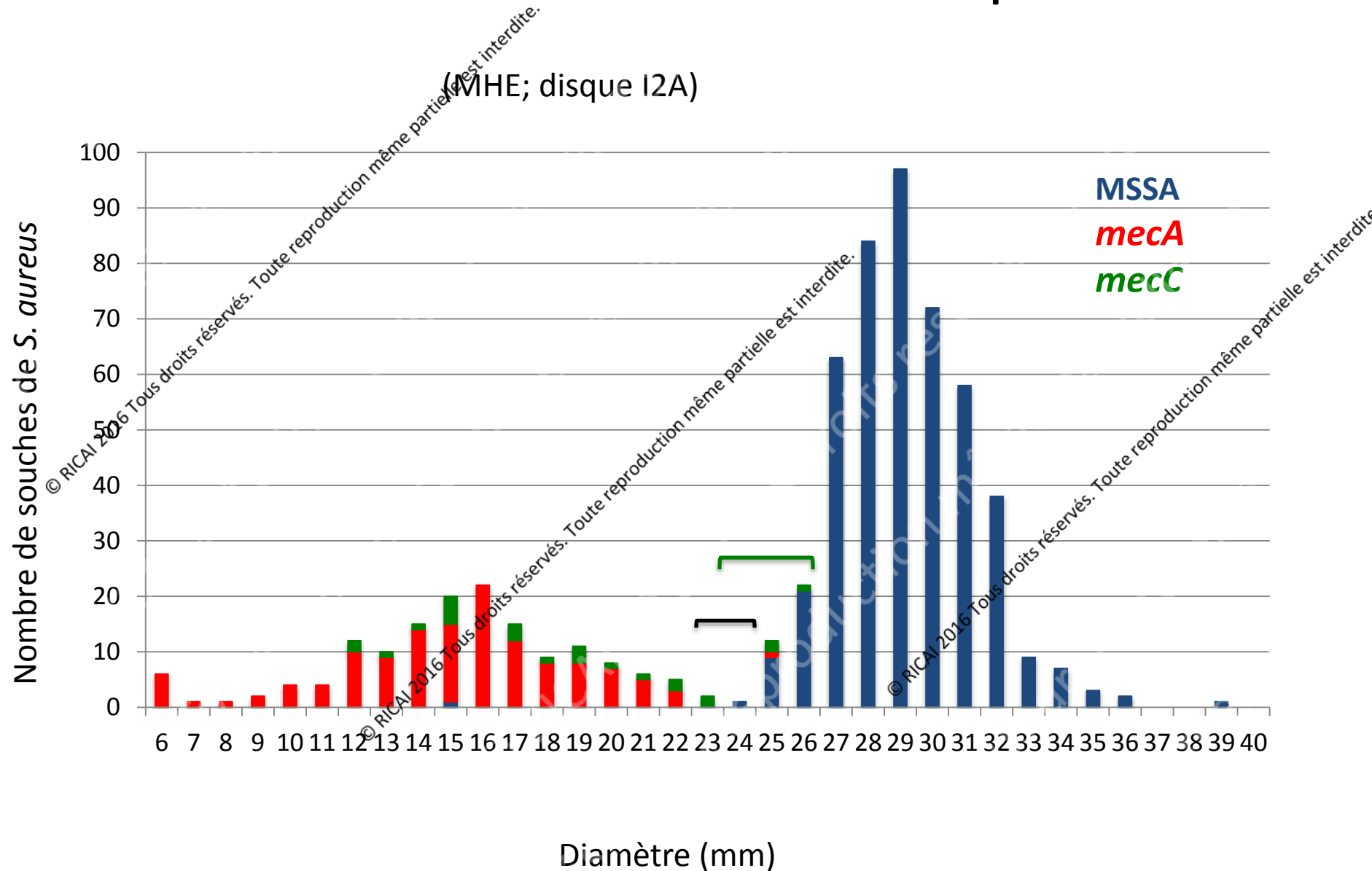
Oxacilline



Cefoxitine



Détection de SARM *mecA* et *mecC* par diffusion



Détection des SARM

Pénicillines	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Les souches productrices de pénicillinase sont résistantes à la pénicilline G, à la phénoxyméthylpénicilline, aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux ureidopénicillines. Les souches ne produisant pas de pénicillinase, sensibles à la céfoxitine (la céfoxitine étant utilisée pour la détection des souches résistantes à l'oxacilline) sont sensibles à ces antibiotiques. Les souches productrices de pénicillinase et sensibles à la céfoxitine sont sensibles à l'association pénicilline - inhibiteur de bêta-lactamase et aux pénicillines résistantes aux pénicillinases (oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline et flucloxacilline), aux céphalosporines (sauf à la ceftazidime, ceftixime et ceftibuten) et aux carbapénèmes. Ces molécules sont utilisables dans les limites de l'AMM. Il est inutile de les tester en routine. La résistance des staphylocoques aux isoxazoly-pénicillines (oxacilline, cloxacilline) est recherchée à l'aide d'un disque de céfoxitine (30 µg) dans les conditions standards de l'antibiogramme. Il ne doit pas être tenu compte d'une éventuelle zone fantôme pour la lecture des diamètres d'inhibition. Pour <i>S. aureus</i>, <i>S. lugdunensis</i> et <i>S. saprophyticus</i> avec des diamètres d'inhibition de 22, 23 et 24 mm et les autres espèces avec des diamètres d'inhibition de 24 et 25 mm, il convient de rechercher l'expression d'une PLP additionnelle (PLP2a, PLP2c) après induction par une bêta-lactamine ou la présence d'un gène <i>mec</i> additionnel (<i>mecA</i>, <i>mecC</i>) par une technique appropriée. Les souches de staphylocoques résistantes à la céfoxitine ou possédant un gène <i>mec</i> additionnel (<i>mecA</i>, <i>mecC</i>) ou exprimant une PLP2 additionnelle (PLP2a, PLP2c) après induction par une bêta-lactamine, doivent être interprétées résistantes à toutes les bêta-lactamines (pénicillines associées ou non à un inhibiteur de bêta-lactamase, céphalosporines et carbapénèmes), sauf à la ceftaroline et au ceftobiprole qui possèdent une activité sur les staphylocoques résistants à l'oxacilline mais leur activité doit être testée séparément. Les staphylocoques résistants à la méticilline sont souvent résistants à de multiples familles d'antibiotiques; cependant, certaines souches ont une résistance isolée à l'oxacilline, notamment les souches possédant le gène <i>mecC</i>.						
Oxacilline <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i>	2	2				
Céfoxitine (dépistage), <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> et <i>S. saprophyticus</i>	Note ²	Note ²	30	25	22	2. <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i> caractérisés par des CMI de la cefoxitine >4 mg/L, et <i>S. saprophyticus</i> caractérisé par des CMI de la cefoxitine >8 mg/L sont résistants à la méticilline principalement du fait de la présence d'un gène <i>mec</i> additionnel. La méthode de diffusion en milieu gélosé permet la détection de la résistance à la méticilline.

Détection des SARM mecA par les automates

BD Phoenix™



bioMérieux Vitek 2™



Beckman Coulter MicroScan™



Appareil	Sensibilité	Spécificité	Références
Microscan	89%	96%	Swenson, DMID 2007; 58:33
Vitek 2	91% 94% 97%	75% 100% 100%	Swenson, DMID 2007; 58:33 Felten, JCM 2002;40:2766 Roisin, JCM 2008;46:2525
Phoenix	67% 100%	96% 100%	Swenson, DMID 2007; 58:33 Cekin, Clin Lab 2014;60:863

Question 2

Peut on suspecter un SARM *mecC* à partir d'un résultat d'automate ?

- A. Non
- B. Oui, avec un résultat Oxa S, Cefox S
- C. Oui, avec un résultat Oxa S, Cefox R
- D. Oui, avec un résultat Oxa R, Cefox S
- E. Oui, avec un résultat Oxa R, Cefox R

Question 2

Peut on suspecter un SARM *mecC* à partir d'un résultat d'automate ?

A. Non

B. Oui, avec un résultat Oxa S, Cefox S

C. Oui, avec un résultat Oxa S, Cefox R

D. Oui, avec un résultat Oxa R, Cefox S

E. Oui, avec un résultat Oxa R, Cefox R

Détection des SARM *mecC* par les automates ?

TABLE 1 Results of Vitek 2 antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates

Identity of <i>S. aureus</i> isolate ^a	Total no. of isolates	No. of susceptible and/or resistant isolates/total no. of isolates (%) by Vitek 2 ^b			
		Oxacillin S and cefoxitin R (S/R)	Oxacillin R and cefoxitin S (R/R)	Oxacillin R and cefoxitin S (R/S)	Oxacillin S and cefoxitin S (S/S)
MRSA <i>mecC</i> positive	62	55/62 (88.7)	7/62 (11.3)	0/62 (0)	0/62 (0)
MRSA <i>mecA</i> positive	455	4/455 (0.9)	446/455 (98.0)	5/455 (1.1)	0/455 (0)
MSSA <i>mecA</i> and <i>mecC</i> negative	379	0/379 (0)	0/379 (0)	4/379 (1.1)	377/379 (98.9)

^a As determined by bacterial whole-genome sequencing.

^b S, susceptible; R, resistant; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.

- Résultats oxa S/cefox R >> oxa R/cefox R
- “Review raw data – consider possible *mecC*-MRSA”

Tests immunologiques de détection des PBP2a et PBP2c

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Question 3

Quelle est la technique immunologique la plus sensible pour la détection des PBP2a et PBP2c à partir de colonies ?

- A. Test d'agglutination de particule
- B. Test d'agglutination de particule après induction
- C. Test immuno-chromatographique
- D. Test immuno-chromatographique après induction

Question 3

Quelle est la technique immunologique la plus sensible pour la détection des PBP2a et PBP2c à partir de colonies ?

- A. Test d'agglutination de particule
- B. Test d'agglutination de particule après induction
- C. Test immuno-chromatographique
- D. Test immuno-chromatographique après induction

Etudes comparatives

Détection de la PBP 2a

- Test d'agglutination de particule sensibilisé
- Inférieure à la détection de *mecA*
- Modification des instructions pour ↑ sensibilité
- MAIS diminution de la spécificité

TABLE 1. Results of testing of a challenge group of 55 *S. aureus* isolates by seven methods for the detection of oxacillin resistance as shown by the number (percentage) of strains that gave correct results for each method using presence of *mecA* gene as the reference

Organism group (n)	Test ^a	No. (%) of correct results as determined by:									
		Broth microdilution	Disk diffusion	Oxacillin salt agar screen	MicroScan conventional	MicroScan rapid	Vitek	Veloc	MRSA-Screen		
									3 min	6 min	15 min
<i>mecA</i> positive (19)	First	19 (100)	19 (100)	17 (90)	14 (74)	17 (90)	18 (95)	19 (100)	17 (90)	18 (95)	19 (100)
	Repeat			18 (95)	14 (74)	19 (100)	18 (95)		18 (95)	19 (100)	
<i>mecA</i> negative (36)	First	36 (100)	32 (89)	33 (92)	35 (97)	31 (86)	35 (97)	36 (100)	36 (100)	36 (100)	36 (100)
	Repeat		32 (89)	36 (100)	36 (100)	32 (89)	35 (97)				

^a Repeat, repeat testing was done only on strains with discrepant results. The results reported include discrepant strains that were repeated in duplicate and considered correct only if both repeat results were correct.

^b For *mecA*-positive strains, results in the "I" or "R" category were considered correct.

Détection immunologique de PBP2a à partir de colonies

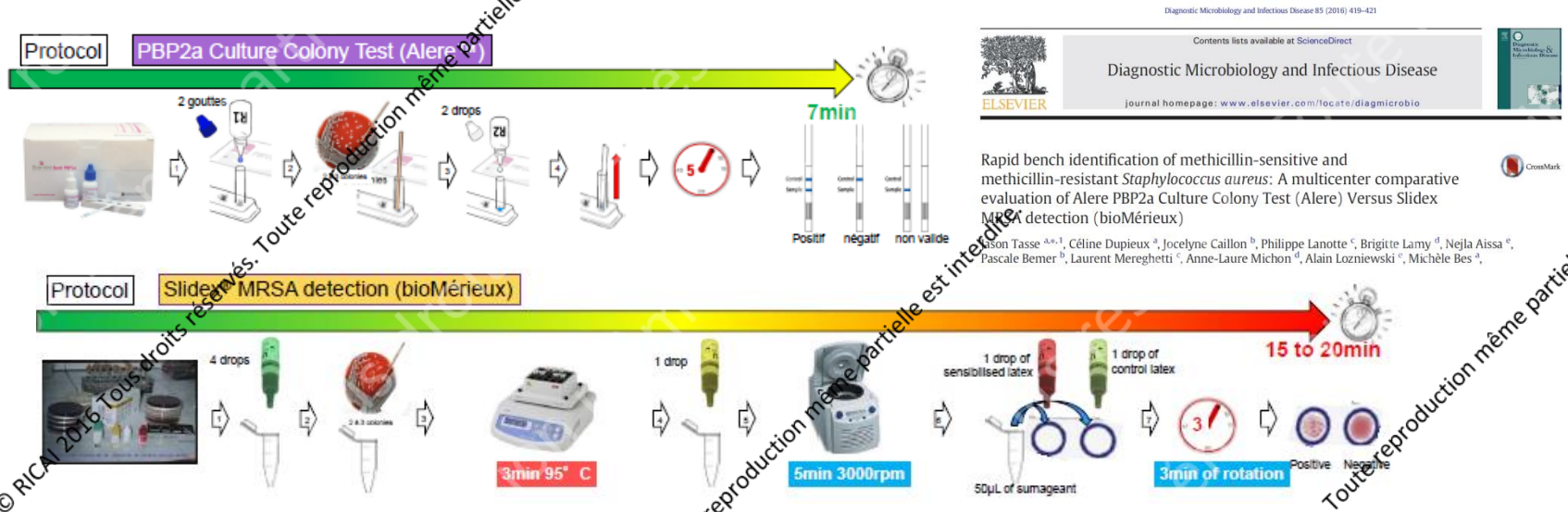


Table 1

Comparison of the analytical performance of CCT (Alere) and SMD (bioMérieux) for the detection of the methicillin resistance in *S. aureus* (n = 30) and the qualitative perception of both tests.

		Centers					
		Test	Hospices Civils de Lyon	CHU de Nantes	CHU de Tours	Hôpital Arnaud Villeneuve	Hôpital Central Nancy
Analytical study (%)	Sensitivity	CCT	100	100	100	100	100
		SMD	75	70	100	100	90
	Specificity	CCT	100	100	100	100	100
		SMD	100	100	100	100	100

Détection immunologique de PBP2c à partir de colonies

	Clearview Exact PBP2a (Alere)		PBP2a agglutination (Oxoid)	
		Après induction		Après induction
CC130 n=92	10	92	1	1
CC1943 n=14	0	14	0	0
CC425 n= 5	0	5	0	0
Correct ID	9%	100%	<1%	<1%

**Clearview Exact PBP2a = détection PBP2c après induction par la
cefoxitine**

Pièges possibles

“Gold standard” = détection *mecA/mecC*

Présence pas toujours = Résistance (MICs <1)

- Expression hétérogène e.g. CA-MRSA
- Altérations régulation d'expression *mecA/C*

Absence pas toujours = Sensible (Oxa >2; Cefox >4)

- Borderline-resistant *S. aureus* (BORSA)
 - Oxacilline < 16 mg/L, céphalosporine 5
 - Hyper-producteur betalactamase
- Moderately-resistant *S. aureus* (MODSA)
 - Oxacilline ≥ 16 mg/L, céphalosporine R
 - PBP modifié

BORSA & MODSA → CNR Staphylocoques

Remerciements

Public Health England, Colindale

- Angela Kearns

CNR des Staphylocoques, résistance

- Frédéric Laurent
- Oana Dumitrescu
- Céline Dupieux

Laboratoire de bactériologie CBS

- Jean-Philippe Rasiade
- Elisabeth Hodille
- Marie Bonjean

Comité de l'Antibiogramme - SFM

- Hubert Chardon