

Staphylocoques
communautaires : nouveaux
aspects ?

Quels SARM communautaire?

- Ceux qui ont diffusé dans la communauté à partir de patients hospitalisés (en général avec des facteurs de risque),
 - Minoritaires
 - Absence du gène de la Leucocidine de Panton Valentine

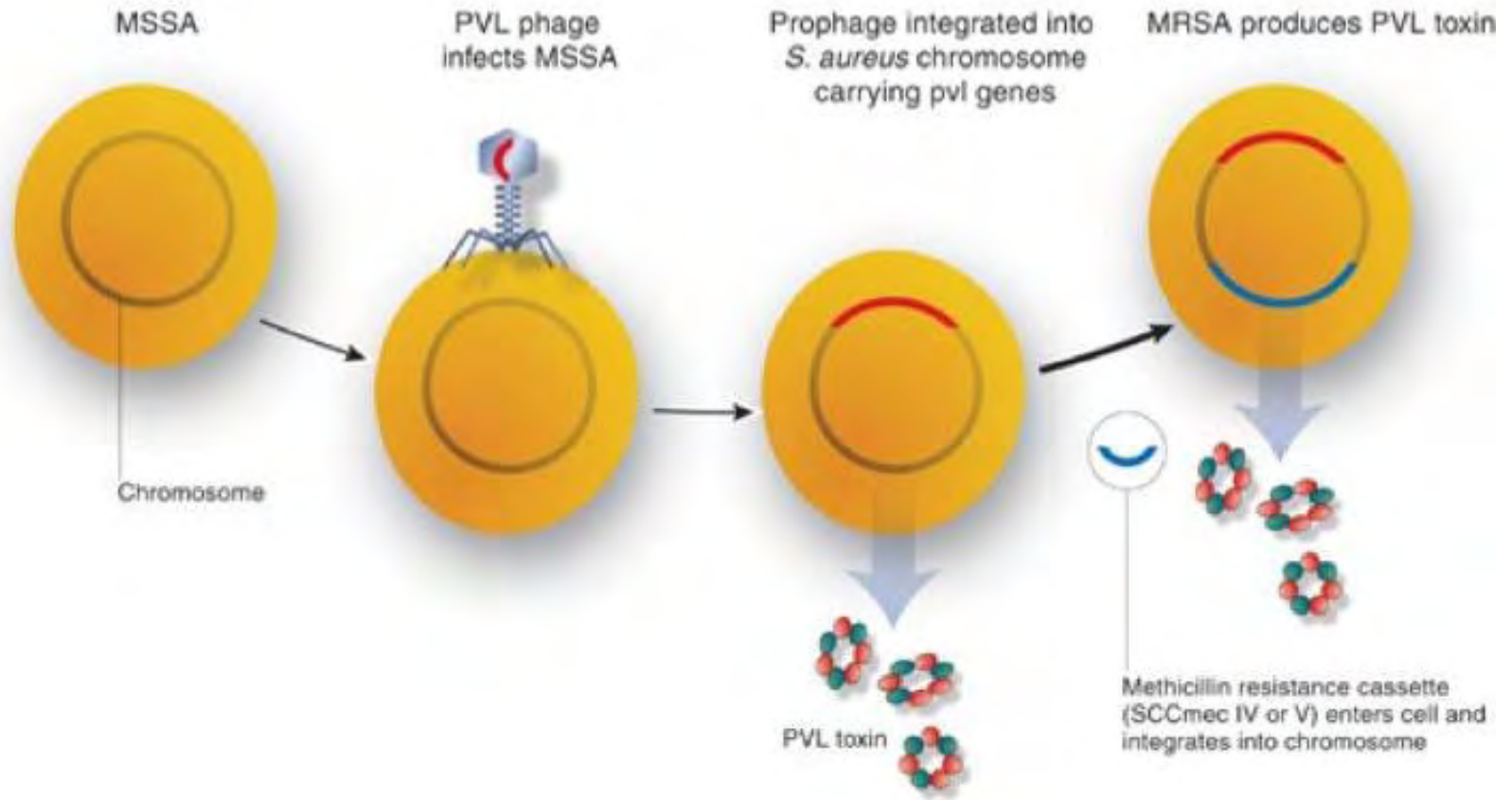
Quels SARM communautaire?

- Ceux qui sont apparemment issus de clones communautaire
 - rencontrés chez des patients plutôt jeune et sans facteur de risques d'acquisition de SARM.
 - possèdent le plus souvent le gène de la Leucocidine de Panton Valentine

CA-MRSA : une histoire ancienne ?

- Les CA-MRSA ont été identifiés à la fin du 20ème siècle
- Le phénomène est apparu d'emblé à une échelle mondiale avec des clones spécifiques de continent :
 - ST80 en Europe,
 - ST8 et ST1 aux USA,
 - ST30 en Océanie.

CA-MRSA : modèle évolutif



Quelles tendances en 2007 ?

- Diffusion mondiale des clones initiaux
- Apparition de nouveaux clones
- Des épidémies un peu partout
- Apparition de nouvelles résistances
- Forte prévalence dans certains pays
- Prévalence hospitalière en augmentation dans les pays à forte prévalence de CA-MRSA

Phase 1: emergence

Phase 2: diffusion

Phase 3: new clones

Roman
si

ST8 C
ST59 USA 10
ST1 USA

....and the world became covered with C-MRSA

agr

Numerous outbreaks have been reported

- in social minorities (Indians, Aborigens, etc.)
- in IV drug-abusers
- in athletic teams
- in military recruits
- in incarcerated populations
- in kindergarten children
- in MSM



Evolution du profil de résistance aux antibiotiques

- 2003: pas de multirésistance
 - ST80 typique: Peni, Oxa, Kana, Tetra, fusi (I)
- 2007: diversification

European ST80 and antibiotic resistance (357 isolates)

	N (%)	Country of origin (N)
P, OX, K	25 (7.0)	Algeria (9), France (13), Greece (1), Switzerland (2)
P, OX, K,E	12 (3.4)	Algeria (5), France (6), Switzerland (1)
P, OX, K, FU	19 (5.3)	Algeria (4), France (13), Switzerland (2)
P, OX, K, TE	6 (1.7)	Algeria (1), France (5)
P, OX, K, E, FU	8 (2.2)	Algeria (1), France (5), Switzerland (2)
P, OX, K, E, L	1 (0.3)	France (1)
P, OX, K, E, Rif	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, OFL, FU	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, TE, FU	205 (57.4)	Algeria (27), Belgium (1), France (147), Germany (1), Greece (3), The Netherlands (2), Slovenia (3), Switzerland (20), Singapore (1)
P, OX, K, T, G	1 (0.3)	France (1)
P, OX, K, E, L, FU	1 (0.3)	France (1)
P, OX, K, E, TE, OFL	1 (0.3)	France (1)
P, OX, K, E, TE, FU	59 (16.5)	Algeria (5), France (48), Roumania (1), Switzerland (5)
P, OX, K, E, L, TE, FU	2 (0.6)	France (2)
P, OX, K, T, E, L, TE	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, T, G, OFL, FU	2 (0.6)	Algeria (2)
P, OX, K, T, G, TE, FU	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, E, L, TE, OFL, FU	2 (0.6)	Algeria (2)
P, OX, K, T, G, E, OFL, FU	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, T, E, L, OFL, FU	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, T, G, E, TE, FU	1 (0.3)	France (1)
P, OX, K, T, G, OFL, FU, Rif	2 (0.6)	Algeria (2)
P, OX, K, T, G, TE, FU, Rif	1 (0.3)	Algeria (1)
P, OX, K, T, E, L, PRI, OFL, FU	2 (0.6)	Algeria (2)
P, OX, K, T, G, E, L, PRI, OFL, FU	1 (0.3)	Algeria (1)

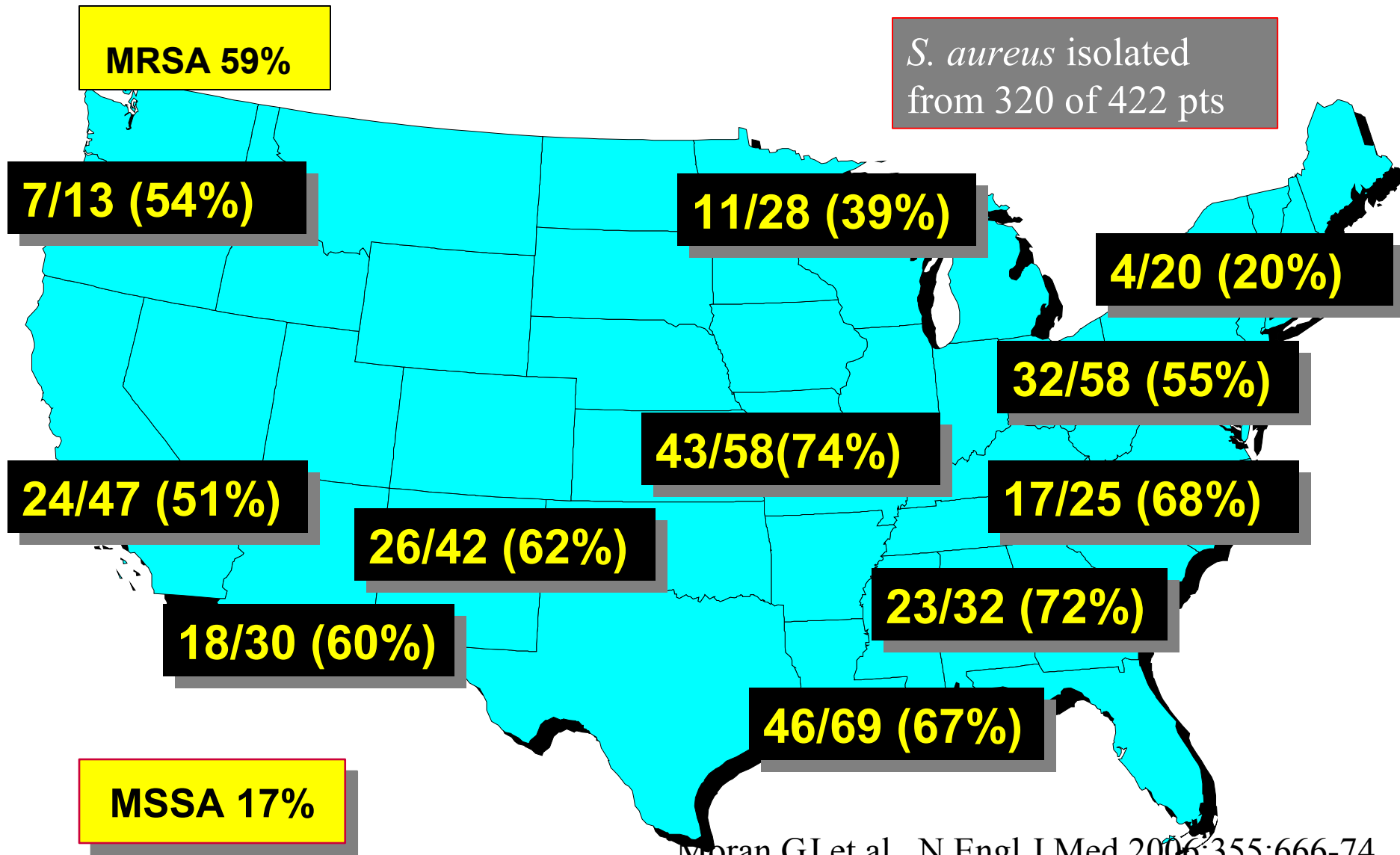
Ramdani-Bougoussa N, et al
Antimicrob Agents Chemother.
2006;50:1083-5.

Tristan A et. EID, April 2007

Prévalence très variable selon les pays

- Pays à haute prévalence:
 - USA
 - Algerie
 - Grèce
- Prévalence globalement faible en europe

Prevalence of MRSA among 422 Emergency Department Patients with SSTI



Europe-France

- Pas d'étude récente spécifique des SARM communautaires mais :
- Etude de 111 SARM d'infection profonde provenant de 23 laboratoires français entre sept 2006 et fev 2007.
- 4 souches (soit 3,6%): clone européen ST80 prédominant en Europe
- 1 souche (<1%): clone ST59 détecté en France, Pays bas, USA et Singapour
- **-> Total < 5%**

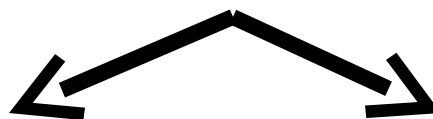
Prévalence hospitalière en
augmentation dans les pays à
forte prévalence de CA-MRSA

USA300 (ST8) semble envahir les hôpitaux américains

- Grady Memorial hospital (Atlanta, USA)
 - 116 SARM de bactériémie : 34% = USA300
 - 28% des bactériémies nosocomiales sont dues à USA300

Grèce 2001-2003

- Collection of 1058 *S. aureus* isolates
- 498 were MRSA (47%)
- 222/498 MRSA were PVL + (45%)



C-MRSA in the community

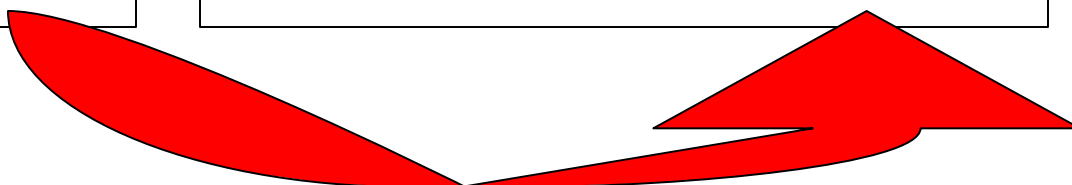
218 isolates
157 PVL+

72%

C-MRSA in the hospitals

280 isolates
65 PVL+

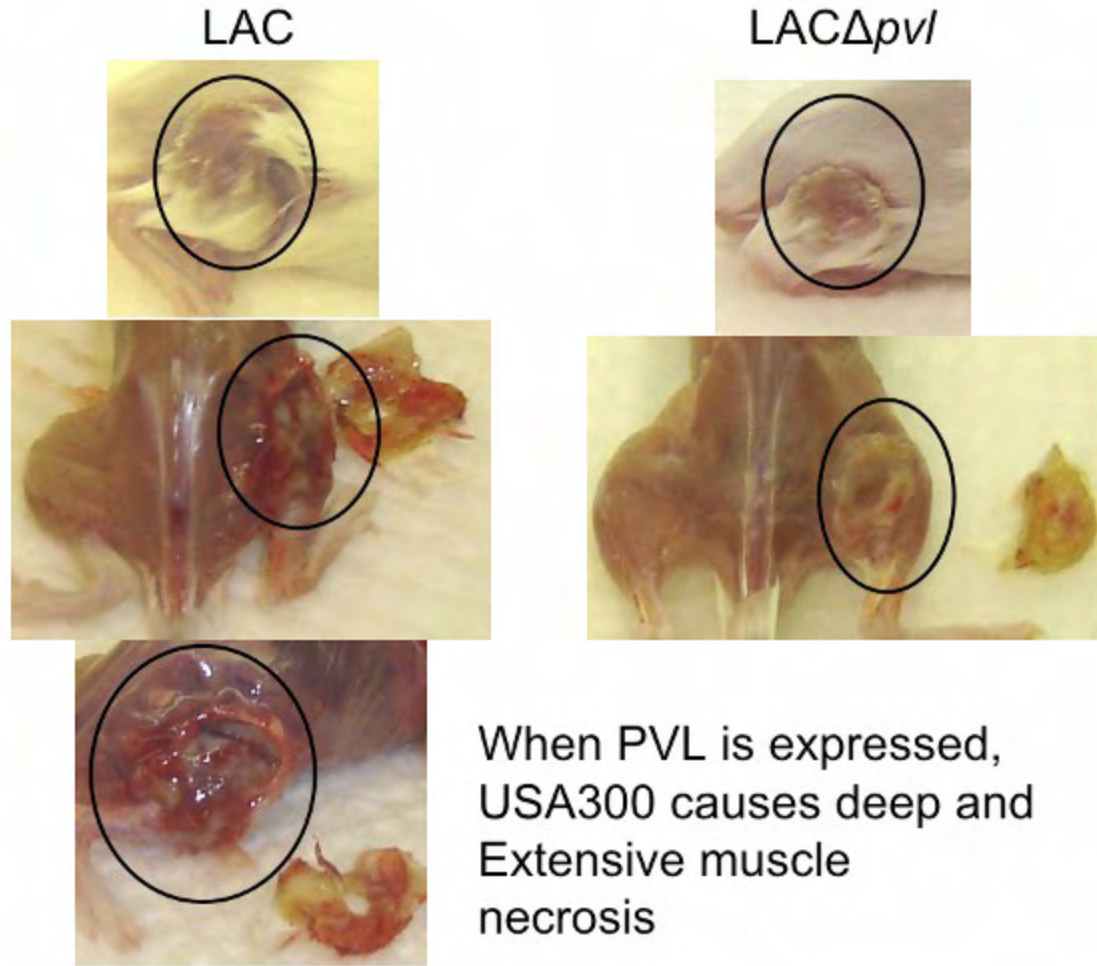
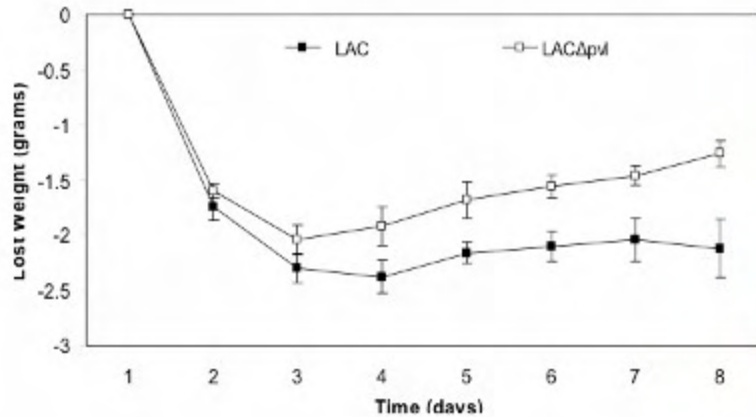
23%



Thérapeutique anti-CA-MRSA

- La LPV est un facteur de virulence majeur des CA-MRSA
- Quels sont les meilleurs antibiotiques agissant sur la production de toxine ?

The expression of PVL enhances the pathogenicity of LAC (USA300)



Mouse model of necrotizing pneumonia

INFECTION:

- Balb/c 7-9 weeks old
- Intranasal inoculation using $2-6 \times 10^7$ CFU in solution
- 2 day infection

PARAMETERS:

- Survival
- Overall appearance
- Weight loss
- Bacteremia
- Gross lung morphology
- Lung histology



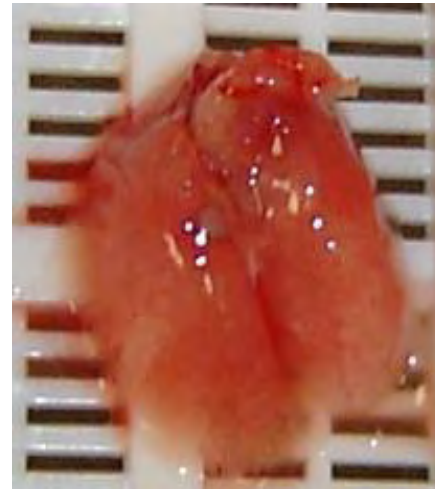
PVL-

Overall appearance

PVL+

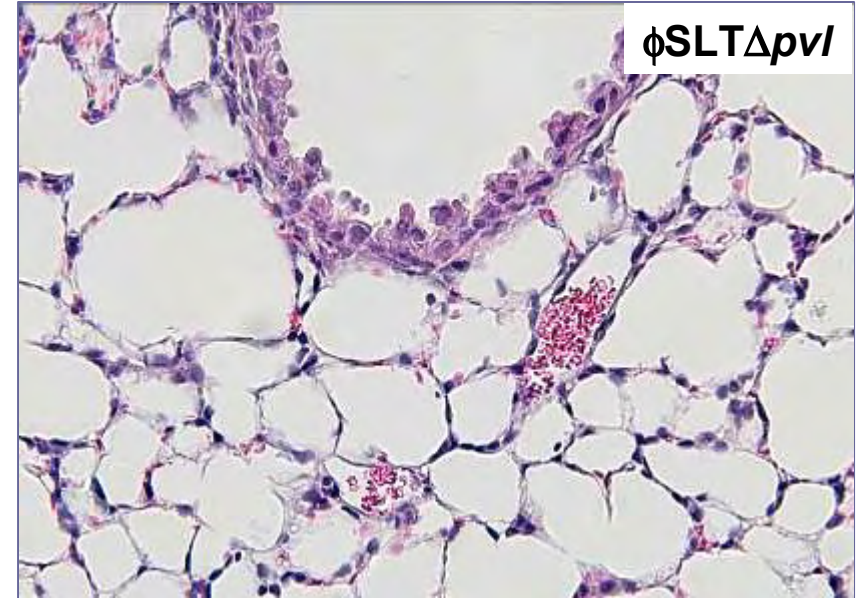
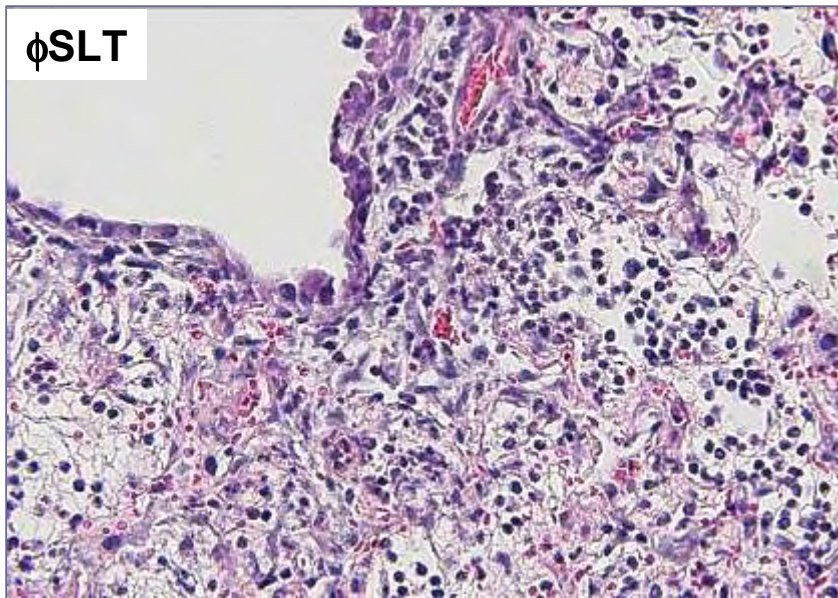
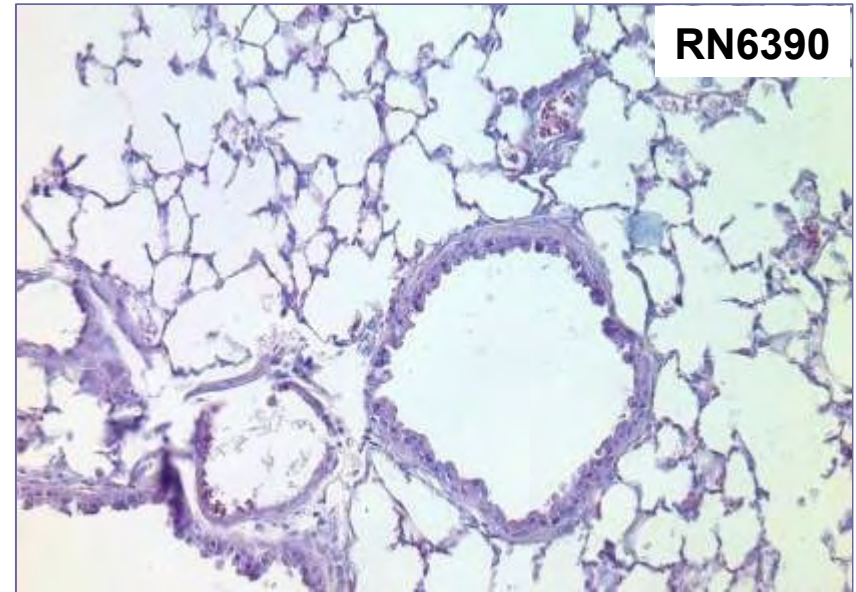
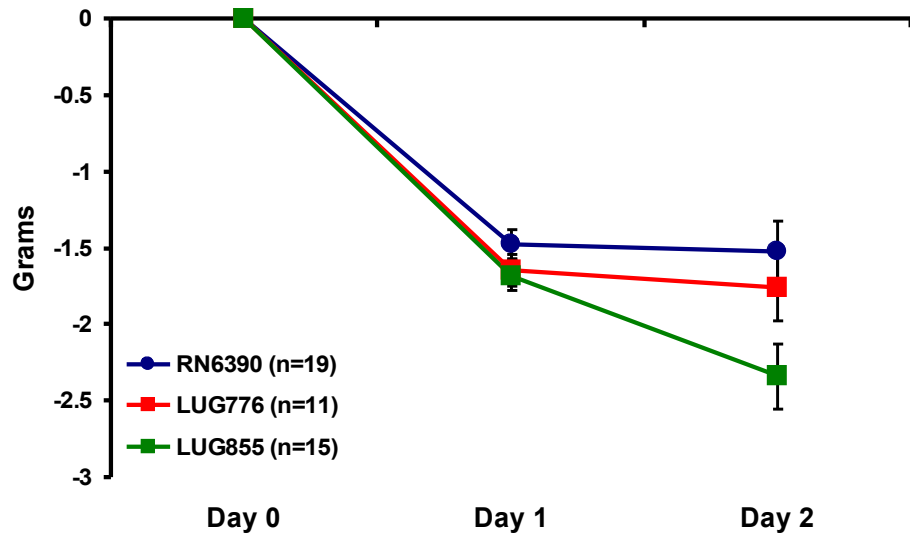


Gross Morphology



Isogenic strains: RN6390

ϕ SLT is the phage encoding PVL genes



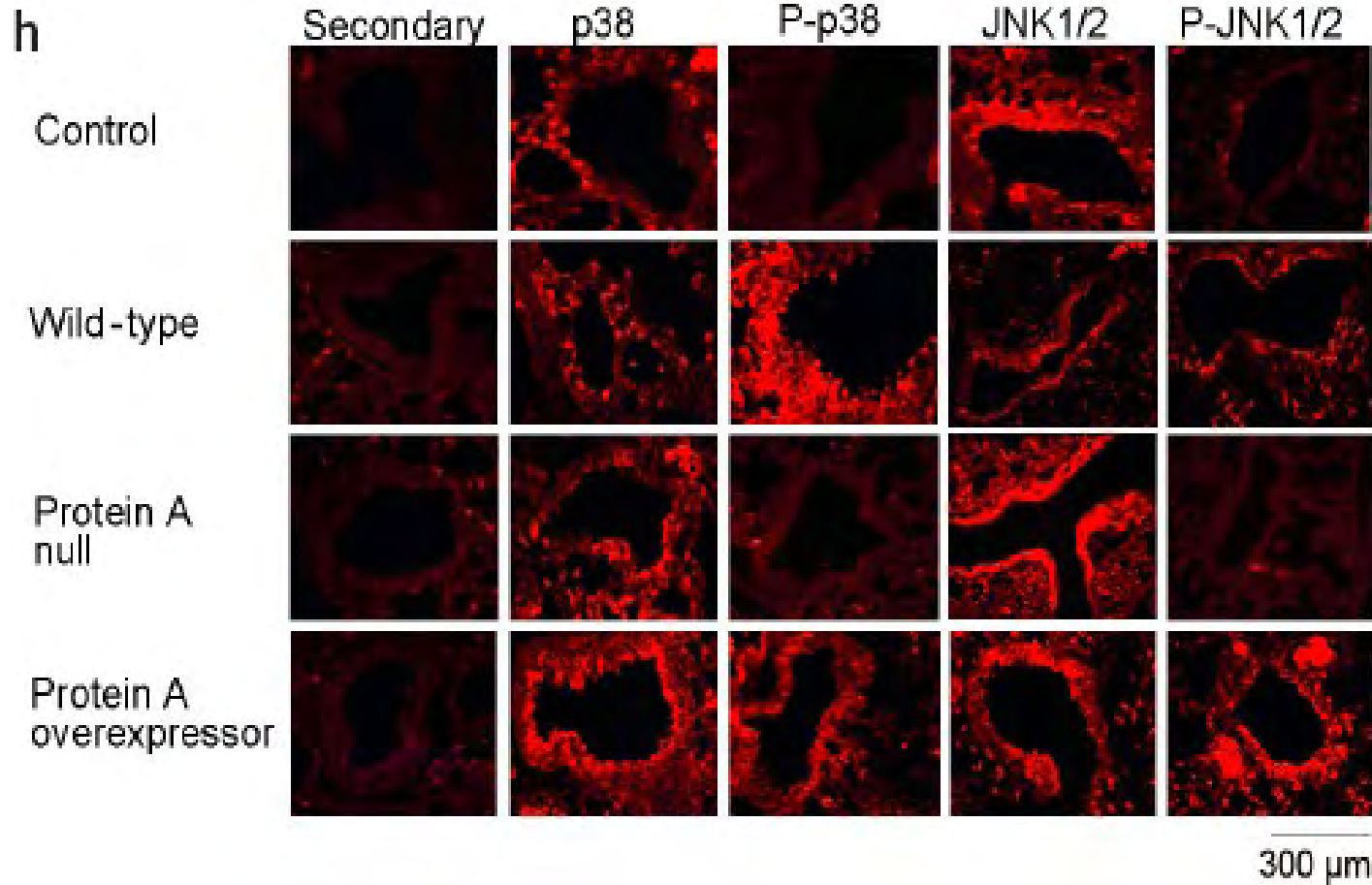
La LPV: un facteur de virulence multifonctionnel

- LPV : effet cytolytique direct sur PMN, monocytes
- LPV augmente l'adhésion à la lame basale de l'épithélium respiratoire
- LPV augmente l'expression de nombreux facteurs de virulence de *S.aureus* dont la protéine A

Protein A = a multi functional virulence factor

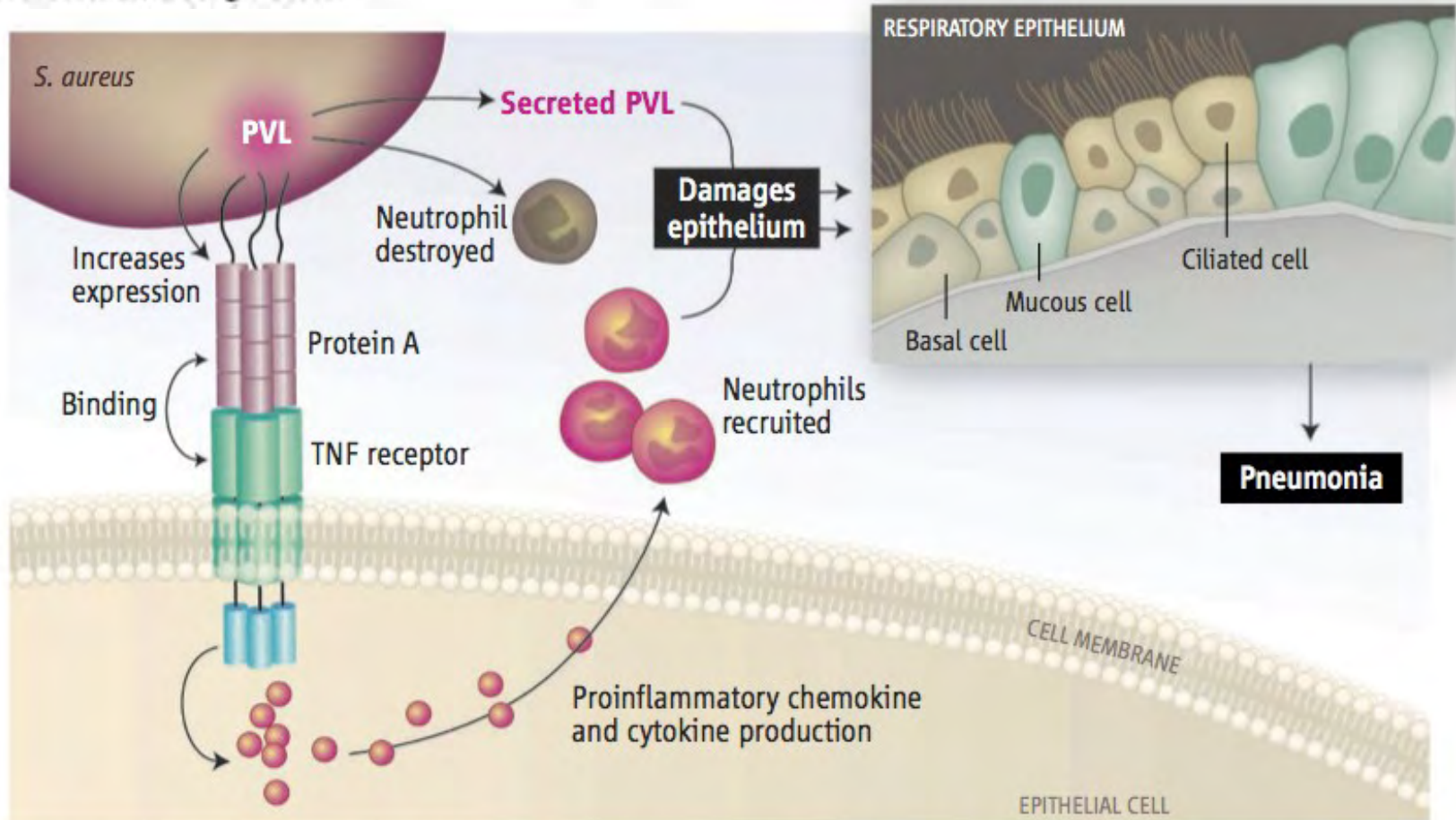
- Fixe le Fc des Immunoglobulines
 - -> anti-opsonisant
- Fixe le facteur de von Willebrand
 - -> adhésine
- Fixe TNFR1 (récepteur du TNF-alpha)
 - Active les MAP kinases
 - induit une réponse inflammatoire locale

Protein A : a pro-inflammatory factor



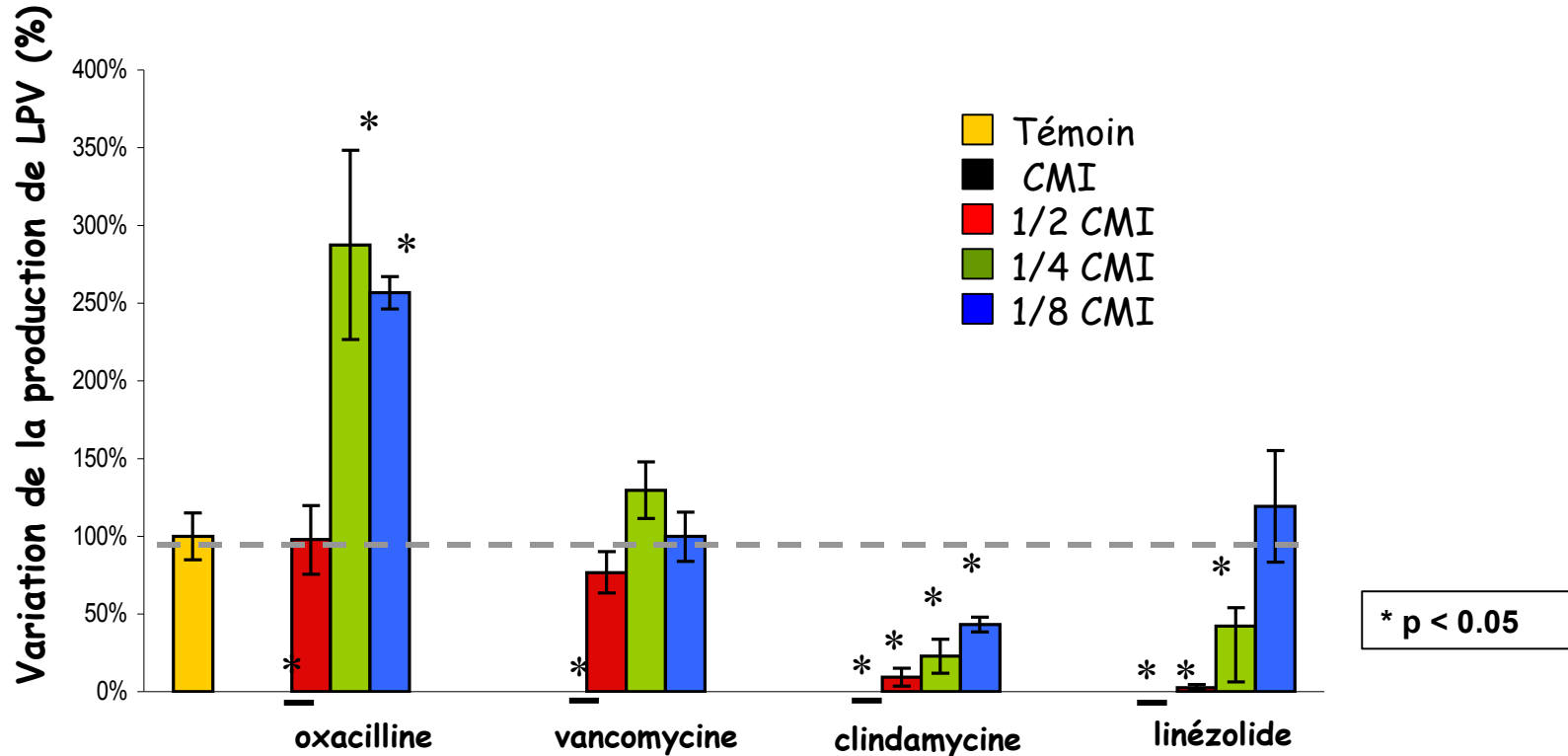
Mayhem in the Lung

Barbara C. Kahl, Georg Peters



Busy toxin. The *S. aureus* protein PVL triggers a combination of events in an infected lung including the destruction of respiratory tissue and host defense cells (neutrophils) and increased inflammation. This ultimately leads to fatal necrotic pneumonia.

Effets des antibiotiques sur la production de LPV par *S. aureus* RN6390phiSLT



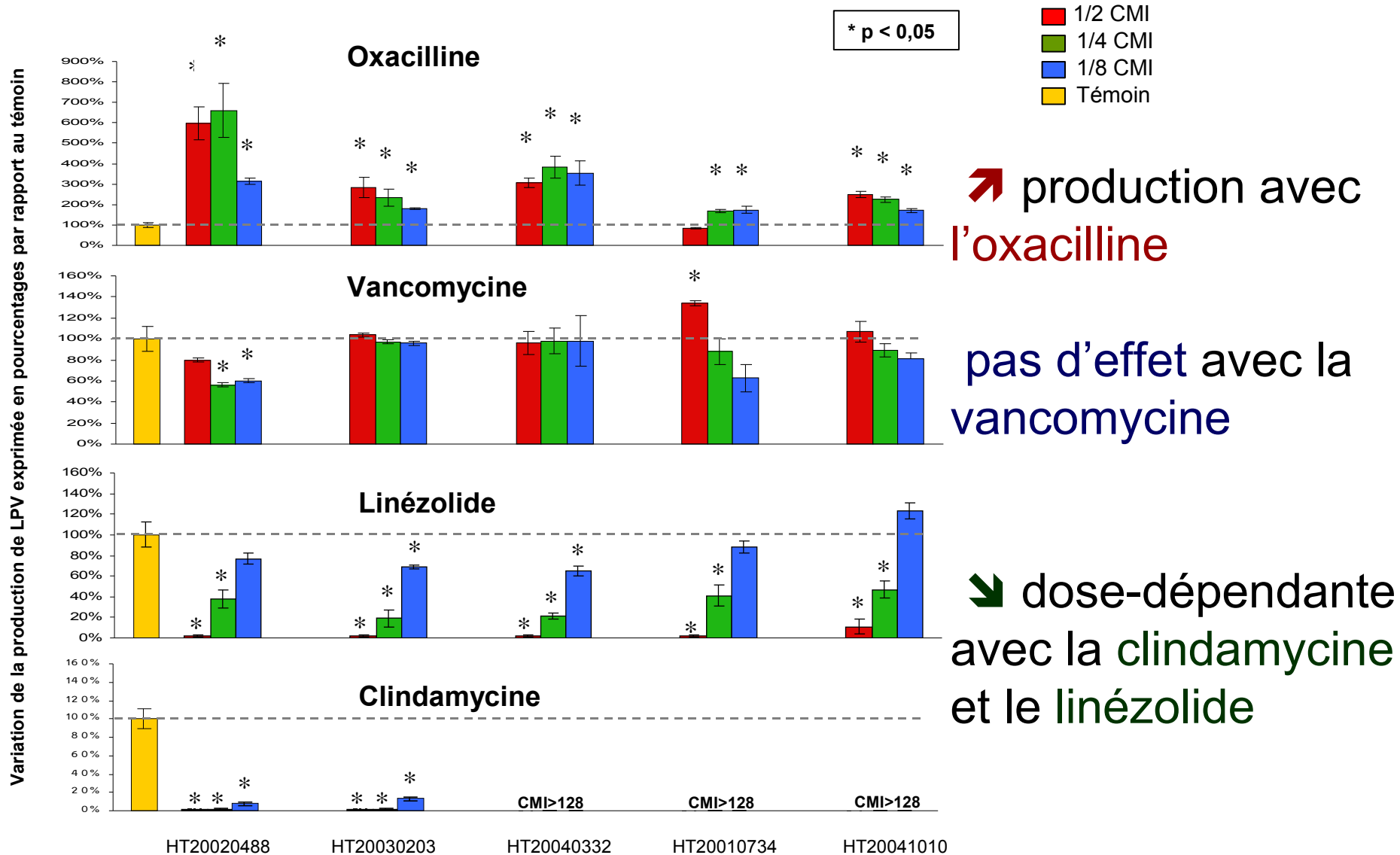
Concentrations subinbitrices

↗ de la production avec l'oxacilline

pas d'effet avec la vancomycine

↘ dose-dépendante avec la clindamycine et le linézolide

Effets des antibiotiques sur la production de LPV par les souches cliniques *S. aureus mecA+* LPV+



En résumé

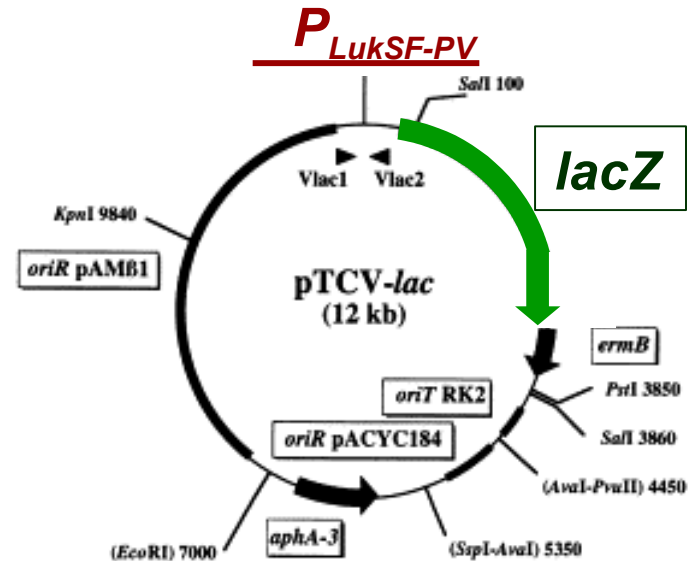
- Les concentrations subinhibitrices d'oxacilline augmentent la production de LPV
- Les concentrations subinhibitrices de clindamycine et linézolide diminuent la production de LPV

Par quel mécanisme les antibiotiques agissent-ils sur la production de LPV?

- Variation de la transcription des gènes de *LPV*?
- Inhibition de la synthèse protéique seulement : clindamycine et linézolide?

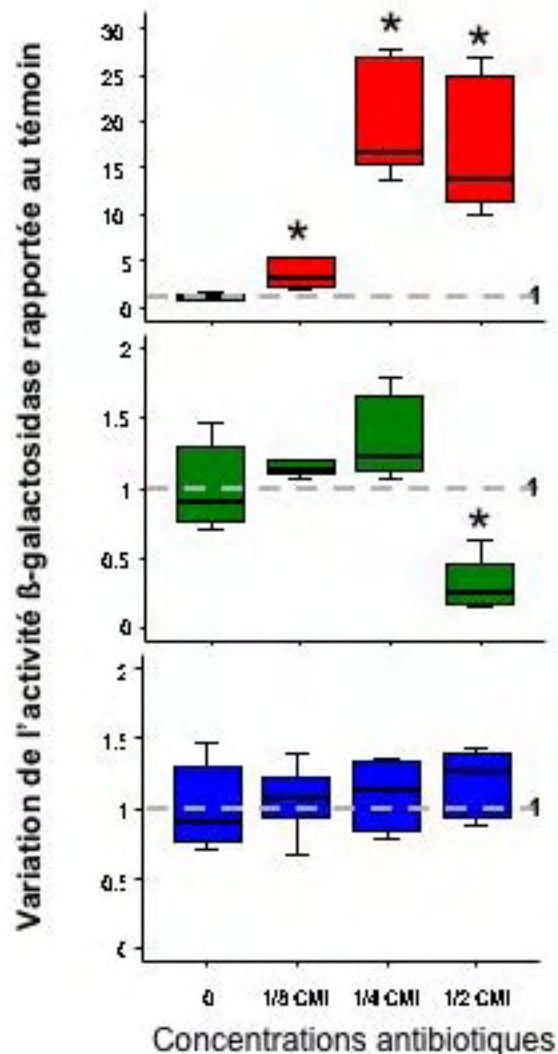
Effets des antibiotiques sur la transcription *LPV*

- Étude de l'expression $P_{LukSF-PV}::lacZ$



- Cultures de 24h avec des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques
- Lyse et mesure de l'activité β -galactosidase

Effets des antibiotiques sur la transcription *LPV*?



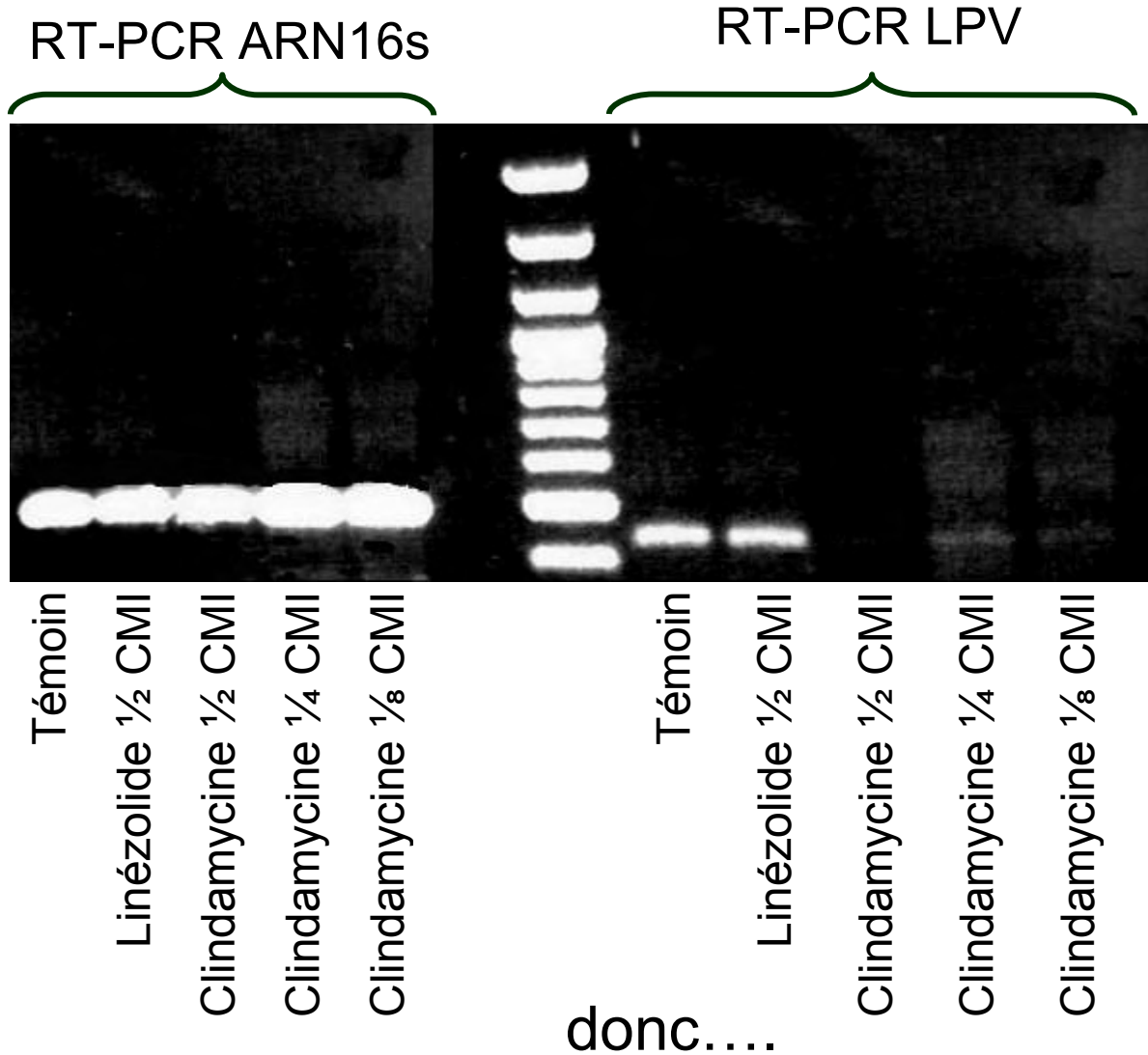
Oxacilline ↗ avec les trois concentrations testées

Linézolide ↘ avec $\frac{1}{2}$ CMI

Vancomycine pas d'effet

* $p < 0.05$

Effets des antibiotiques sur la transcription *LPV*

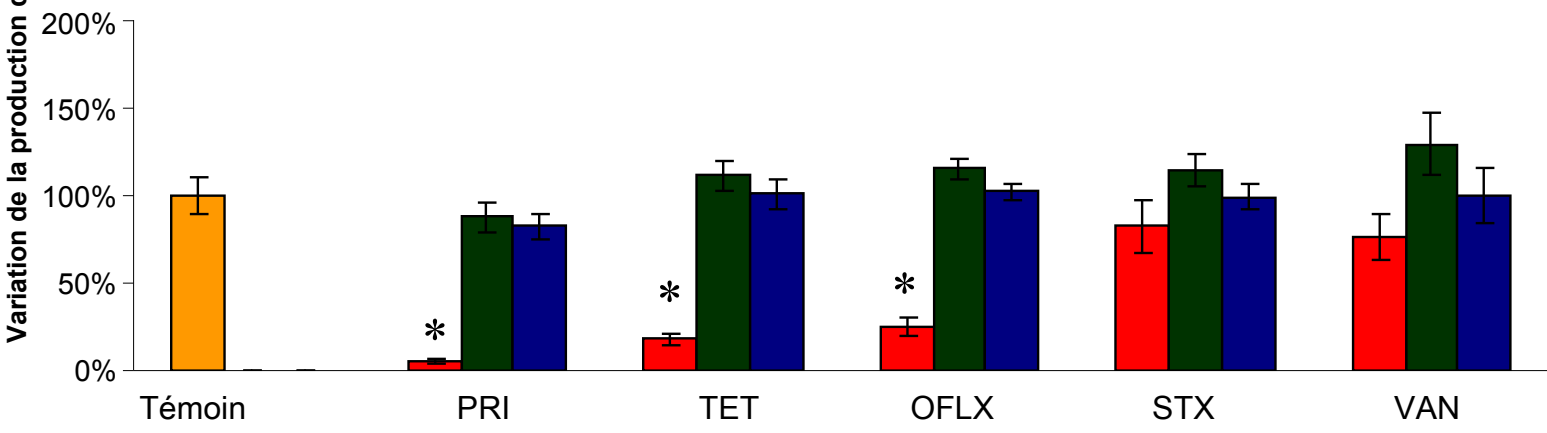
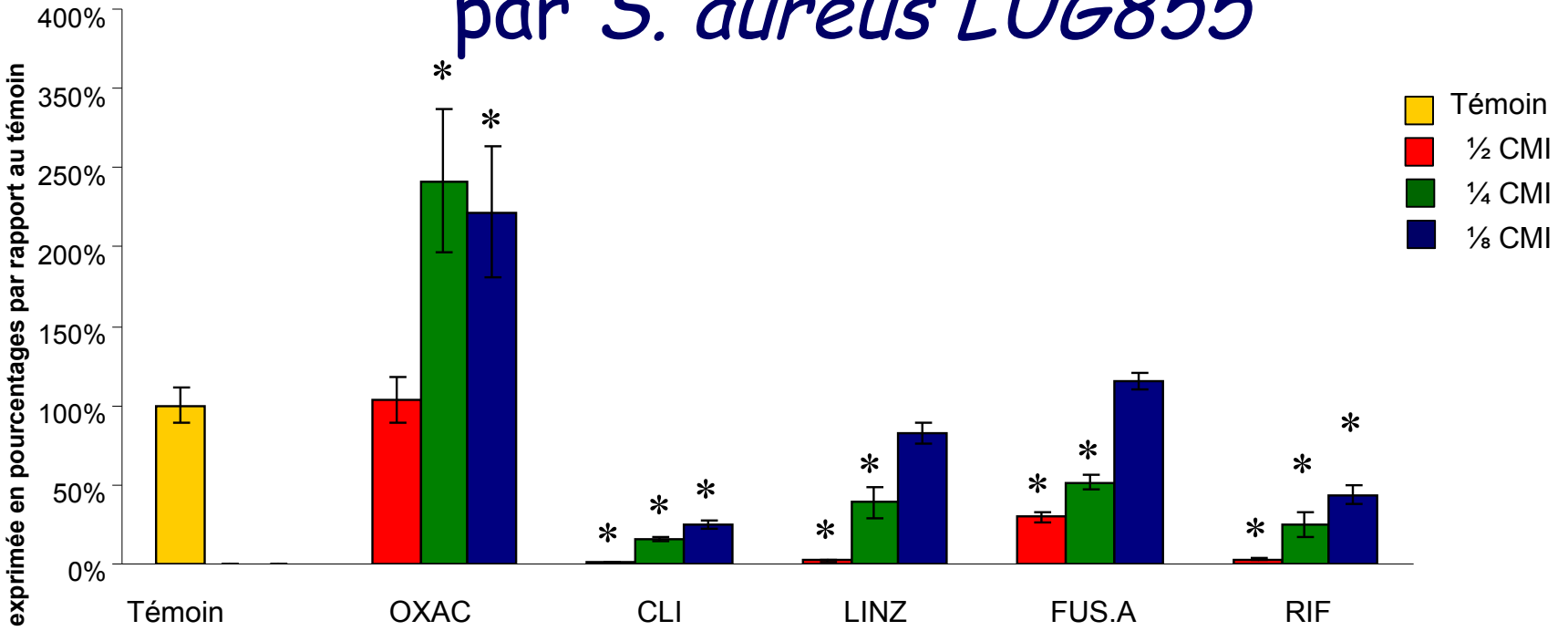


En résumé :

- Oxacilline
 - Activation de la transcription *LPV*
- Clindamycine
 - Inhibition de la transcription *LPV*
- Linézolide
 - Probable inhibition de la transcription *LPV* avec $\frac{1}{2}$ CMI en plus de l'inhibition de la synthèse protéique
- Vancomycine
 - Pas d'effet

Qu'en est-il des autres antibiotiques
anti-staphylococciques?

Effets des antibiotiques sur la production LPV par *S. aureus* LUG855



- Antibiotique inducteur
 - Oxacilline

- Antibiotiques inhibiteurs
 - Clindamycine
 - Rifampicine
 - Linézolide
 - Acide fusidique

- Antibiotiques indifférents
 - Vancomycine
 - Pristinamycine
 - Tétracycline
 - Ofloxacine
 - Cotrimoxazole

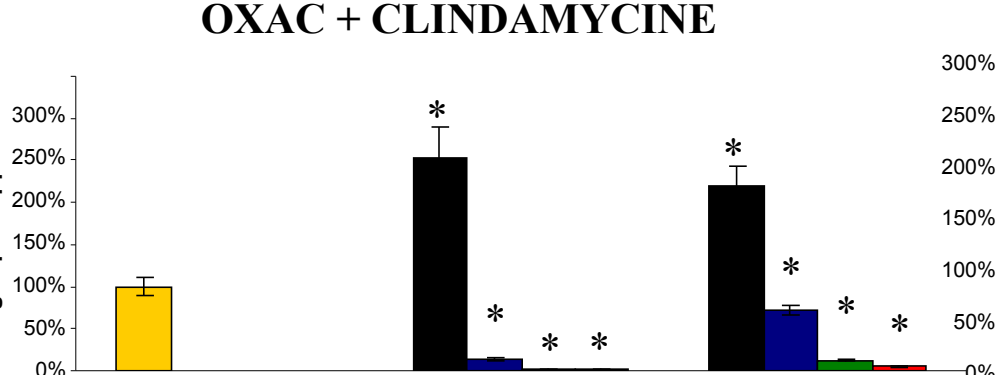
Effet des associations d'antibiotiques sur la production de LPV

- Culture en microplaque en présence de deux antibiotiques selon la technique de l'échiquier
- Dosage de la LPV dans les surnagenats de culture
- Oxacilline ($\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ CMI) + antibiotiques inhibiteurs de la LVP à des concentrations subinhibitrices ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ CMI)
 - Clindamycine
 - Rifampicine
 - Linézolide
 - Acide fusidique

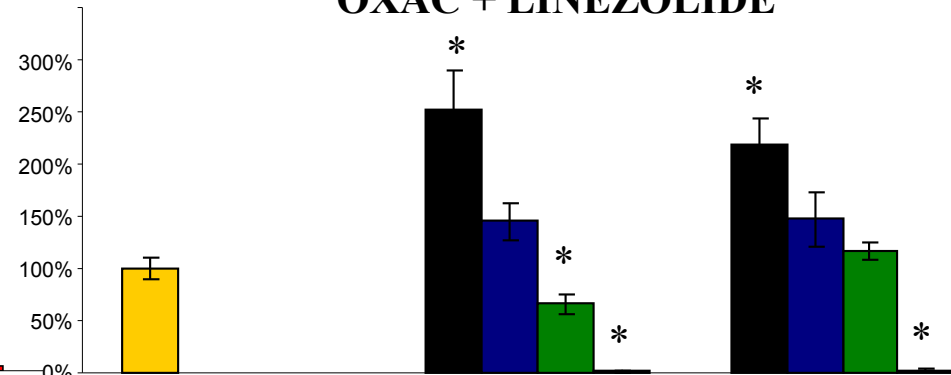
Effets des associations sur la production *LPV* par *S. aureus* LUG855

- Témoin
- OXAC seule
- OXAC+ $\frac{1}{8}$ CMI autre atb
- OXAC+ $\frac{1}{4}$ CMI autre atb
- OXAC+ $\frac{1}{2}$ CMI autre atb

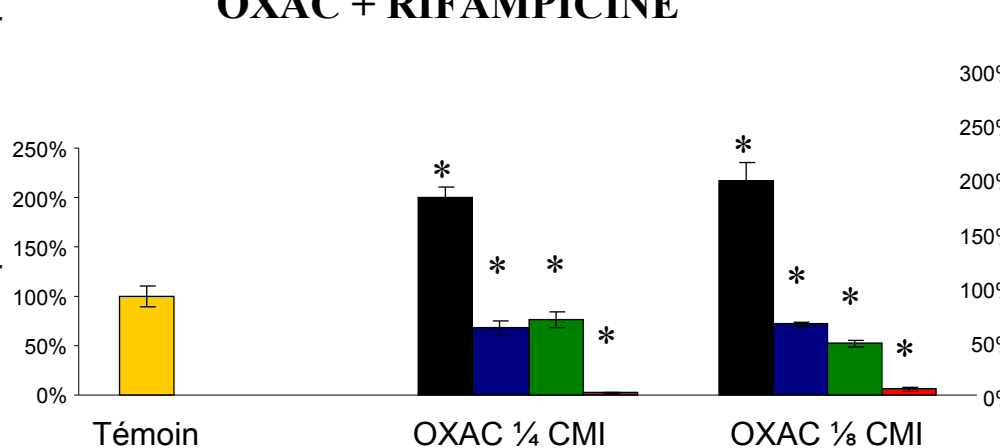
OXAC + CLINDAMYCINE



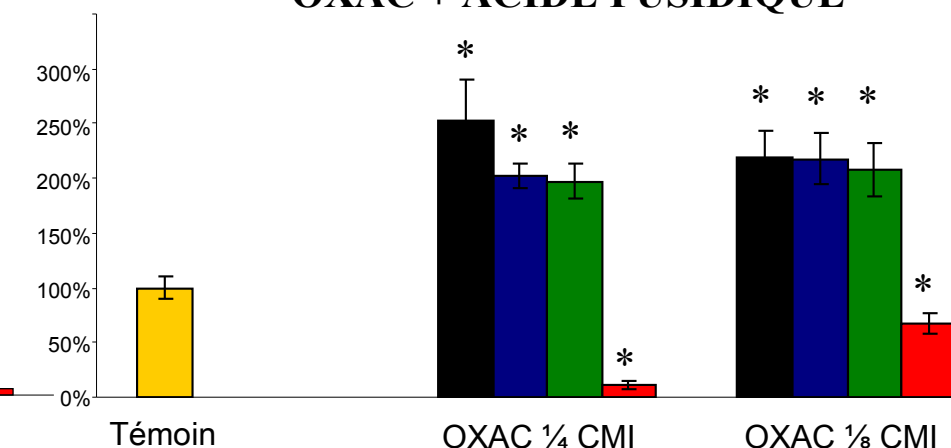
OXAC + LINEZOLIDE



OXAC + RIFAMPICINE



OXAC + ACIDE FUSIDIQUE



En résumé :

- Les antibiotiques inhibiteurs de la production de LPV ont la capacité de bloquer l'effet inducteur de l'oxacilline à l'exception de l'acide fusidique
- L'effet inhibiteur est dose dépendant et l'amplitude de l'inhibition est propre à chaque antibiotique

Clindamycine > Rifampicine > Linézolide

Conclusions

- Les antibiotiques modulent l'expression de facteurs de virulence telle la LPV
 - Dans le sens de l'augmentation : oxacilline
 - Dans le sens de la diminution : clindamycine, rifampicine, linézolide, acide fusidique
- Ces effets reposent en partie sur une variation de la transcription des gènes *LPV*
- Ces effets apparaissent à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques
- Donc pertinent in vivo car faible diffusion tissulaire due à la nécrose tissulaire des infections graves à LPV

Conséquences thérapeutiques

- Pertinence des schémas thérapeutiques habituels (axés sur les pénicillines M seules) dans les infections graves à *S. aureus* LPV+ ???
- Association d'antibiotiques
 - Activité bactéricide sur *S. aureus*
 - Diminution de l'expression de facteurs de virulence (LPV)
Oxacilline + Clindamycine/Rifampicine/Linézolide
- Dans les infections sévères à SARM LPV+ l'utilisation du linézolide est sans doute préférable à la vancomycine

Conclusion

- Les SARM communautaires sont à nos portes ; à terme le phénotype courant des staph sera PeniR, OxaR
- La prévalence de la LPV devrait augmenter en parallèle (comme aux USA)
- La thérapeutique des infections sévères à staph devra/doit prendre en compte cette toxine
- Les nouvelles voies thérapeutiques doivent être explorées : immunothérapie passive, active..

Acknowledgements



INSERM U851:

- Jerome Etienne,
- Gerard Lina,
- Anne Tristan
- Géraldine Durand
- Olivier Dauwalder
- Florence Couzon
- Sandrine Boisset
- Michele Bes
- Yvonne Benito
- Thomas Perpoint
- Tristan Ferry
- Damien Thomas
- Cédric Badioux
- Frédéric Laurent
- Muriel Croze
- Virginie Brun



Institute of Biosciences and Technology, Houston TX:

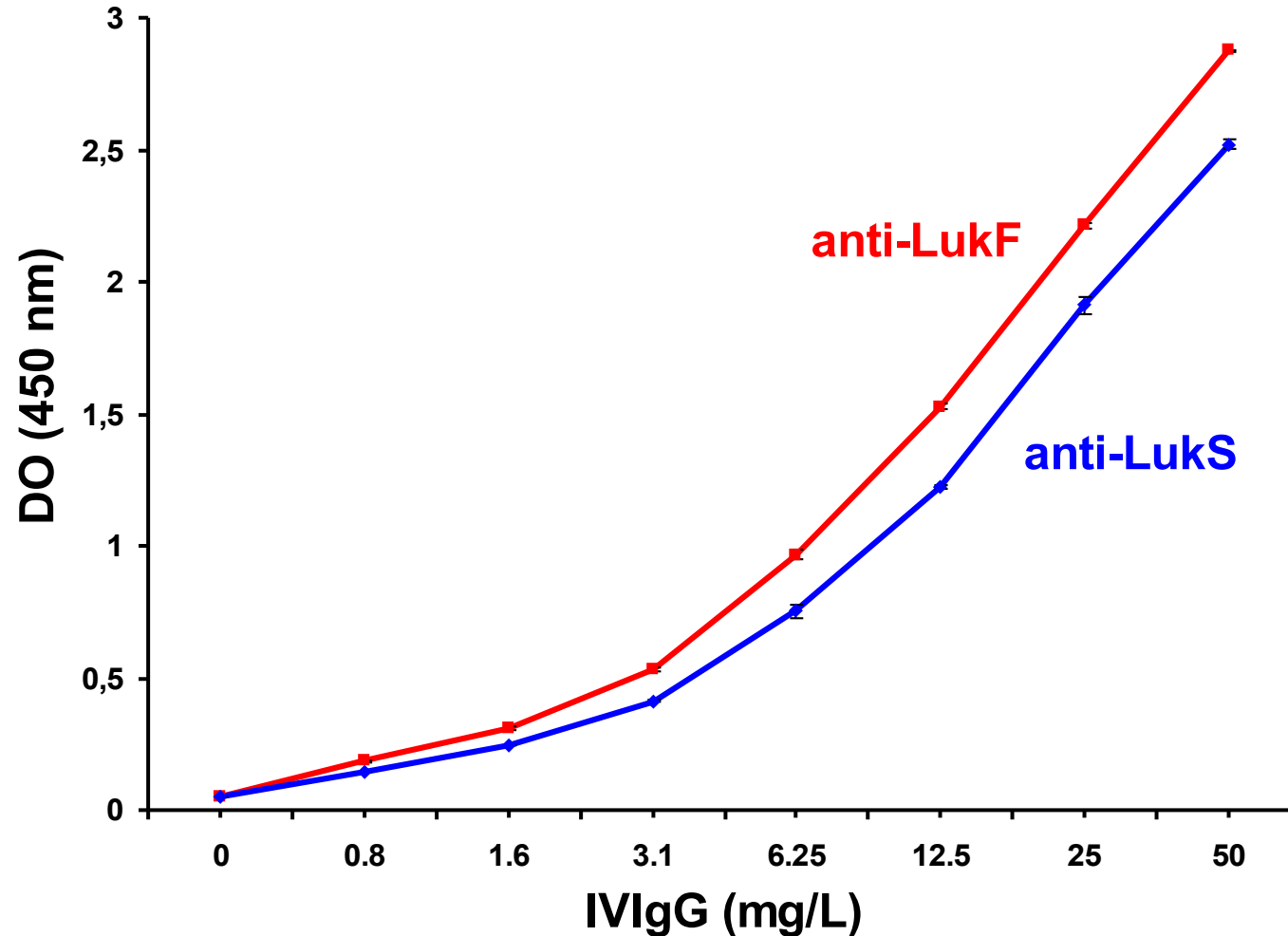
- Magnus Höök,
- Gabriela Bowden,
- Vanessa Vazquez
- Maria-Labandeira Rey



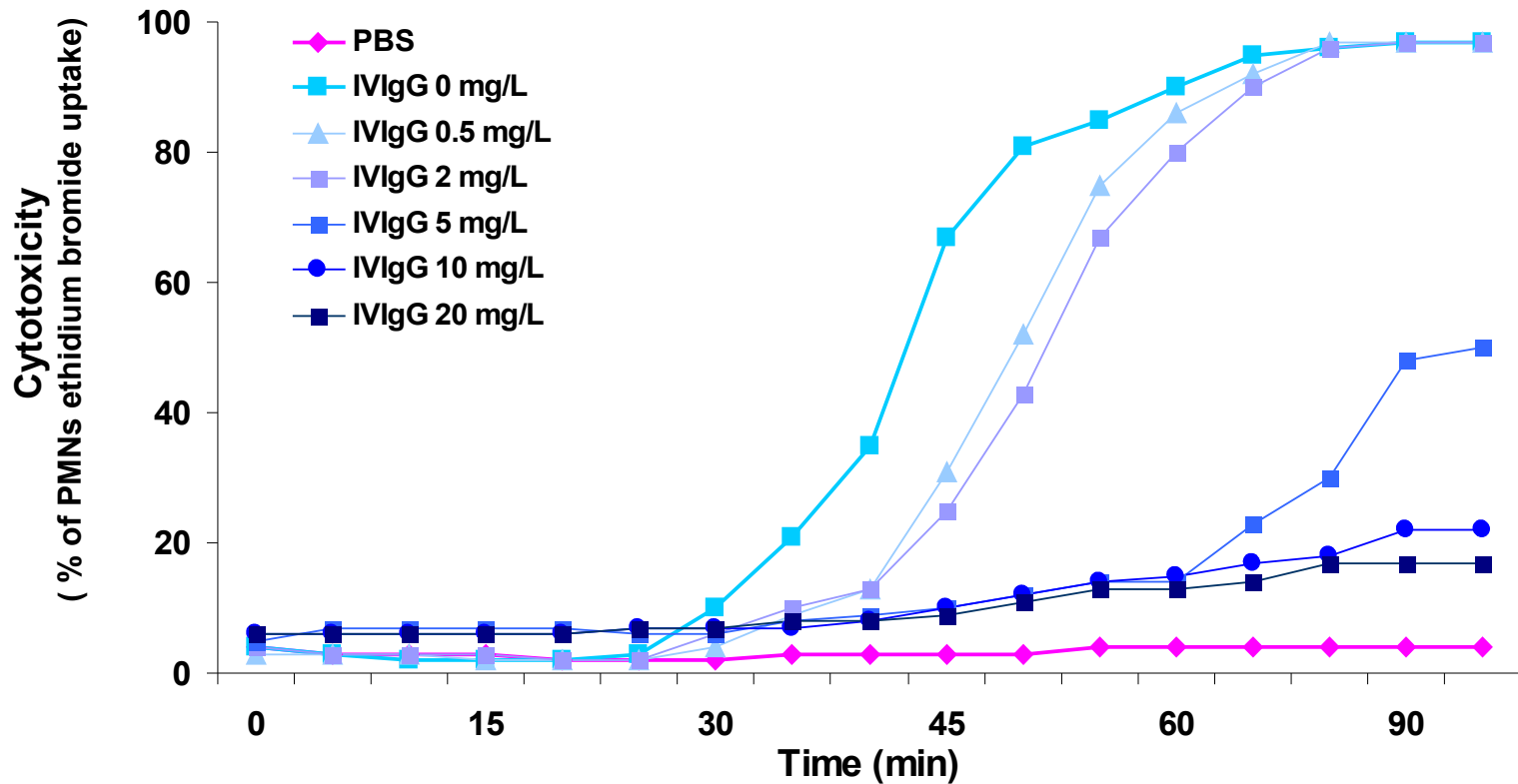
Thérapeutiques alternatives

- Neutralisation de la toxine par des anticorps anti-LPV
- Phage thérapie

Commercial intravenous immunoglobulins (IVIg) contains PVL-specific antibodies



IVIg inhibition of PVL-induced ethidium bromide uptake by PMNs



Preincubation of 200 nM of recombinant PVL with increasing amount of IVIgG inhibited PVL-cytotoxicity in an IVIgG concentration-dependent manner.

Thérapeutiques alternatives

- Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice.
Antimicrob Agents Chemother. 2007
May 21