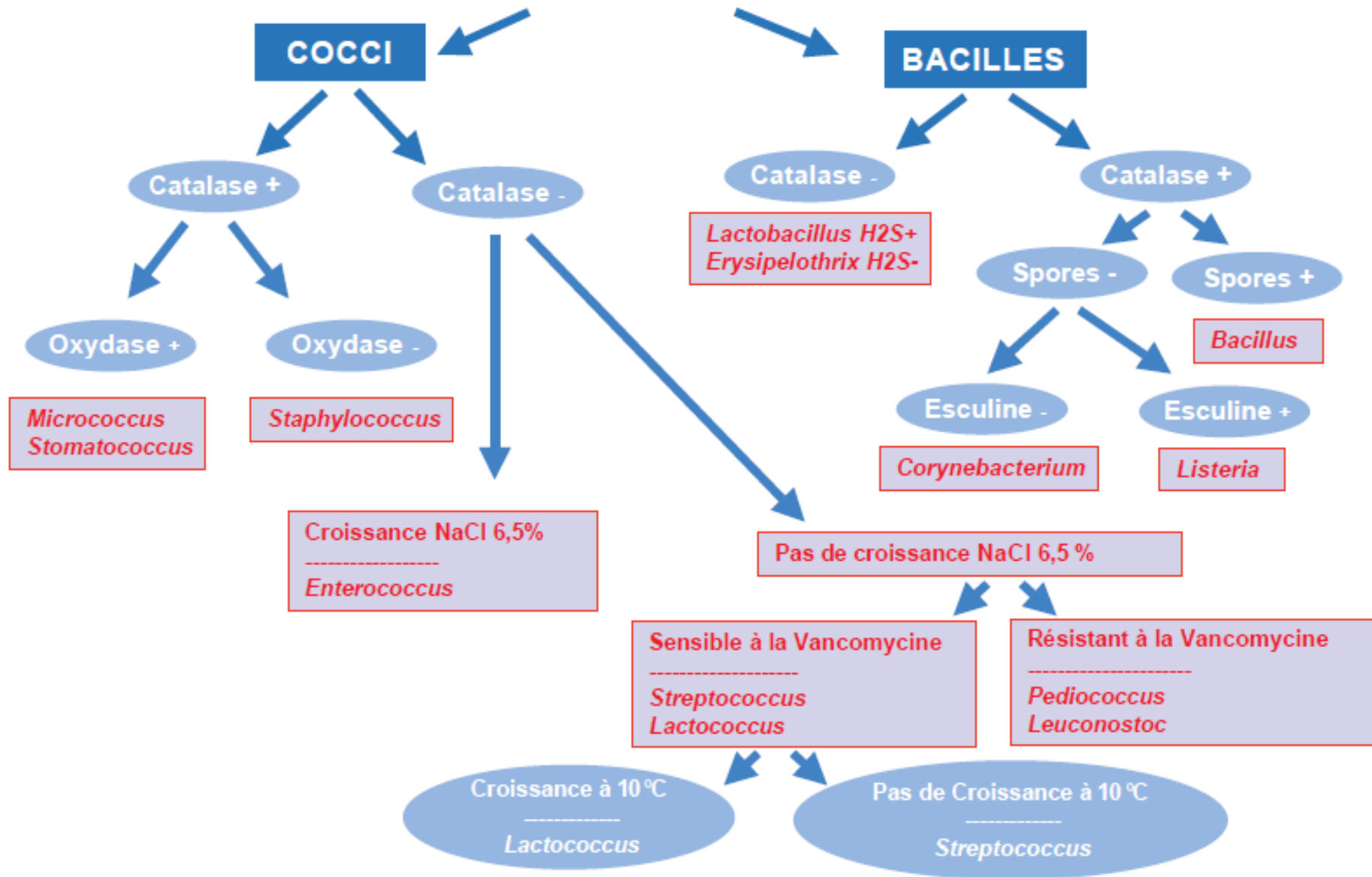


Staphylococcus

Généralités

- Les cocci à Gram positif font partie des flores commensales de la peau et des muqueuses chez l'homme.
- De nombreuses espèces sont maintenant bien définies ; elles peuvent être aérobies, anaérobies strictes, anaérobies-aérotolérantes ou bien aérobies-anaérobies facultatives.

BACTÉRIES À GRAM POSITIF (HORS ANAÉROBIES ET BAAR)



Genre *Staphylococcus*

- L'analyse des séquences d'ADNr/ARNr 16S en 1997, la famille des ***Micrococcaceae***, composée autrefois des genres *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus*, a été complètement restructurée.
 - Le genre *Staphylococcus* est rattaché à la famille des ***Staphylococcaceae*** (classe des Bacilli, ordre des Bacillales), avec les genres *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* et *Salinicoccus*.
 - En 2015, le genre *Staphylococcus* comptait 50 espèces, dont une vingtaine sont isolées chez l'homme.
- Cocci à Gram +, en amas
 - GC% faible (30-39%)
 - Immobiles
 - Très résistants dans le milieu extérieur
 - Peu exigeants en culture
 - **Catalase +**
 - **Oxydase –**

Domaine *bacteria*

Phylum *firmicute*

Classe *bacilli*

Ordre *bacillales*

Famille

Staphylococcaceae

Genre

Staphylococcus

- **Habitat et pouvoir pathogène**

Les staphylocoques sont pour la plupart des commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, et sont potentiellement pathogènes à la faveur de la rupture de la barrière cutaneo-muqueuse.

S. epidermidis est l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée de la peau de l'homme sain.

Il existe pour quelques espèces une niche écologique préférentielle par exemple, les plis cutanés et la muqueuse nasale pour *S. epidermidis*, ou le cuir chevelu de l'adulte pour *S. capitis*.

- *S. aureus* colonise préférentiellement la **muqueuse nasale**, où il est présent chez environ 30 % des individus en dehors de tout contact hospitalier. Le portage de *S. aureus* peut être intermittent ou persistant selon les individus.
- 1. Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est lié à sa capacité de **survie et à ses nombreux facteurs de virulence**. Parmi eux, on retrouve des protéines de surface qui initient la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la phagocytose, des toxines et enzymes qui lèsent les cellules et tissus.
- *S. aureus* est à l'origine de 2 types de syndromes : les infections suppuratives et les toxi-infections.

- **Infections suppuratives**
- *S. aureus* est responsable d'infections suppuratives impliquant une prolifération bactérienne, une invasion, une destruction des tissus de l'hôte et une réponse inflammatoire locale et systémique. On retrouve notamment :
 - des infections de la peau et des tissus mous. Il s'agit le plus souvent d'auto-infections à partir de la flore endogène.
 - Ces infections peuvent être bénignes (folliculite, furoncle, onyxis) ou sévères avec extension loco-régionales (anthrax voire cellulite) ;
 - des infections respiratoires. souvent communautaires et dues à des souches productrices de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL)



abcès

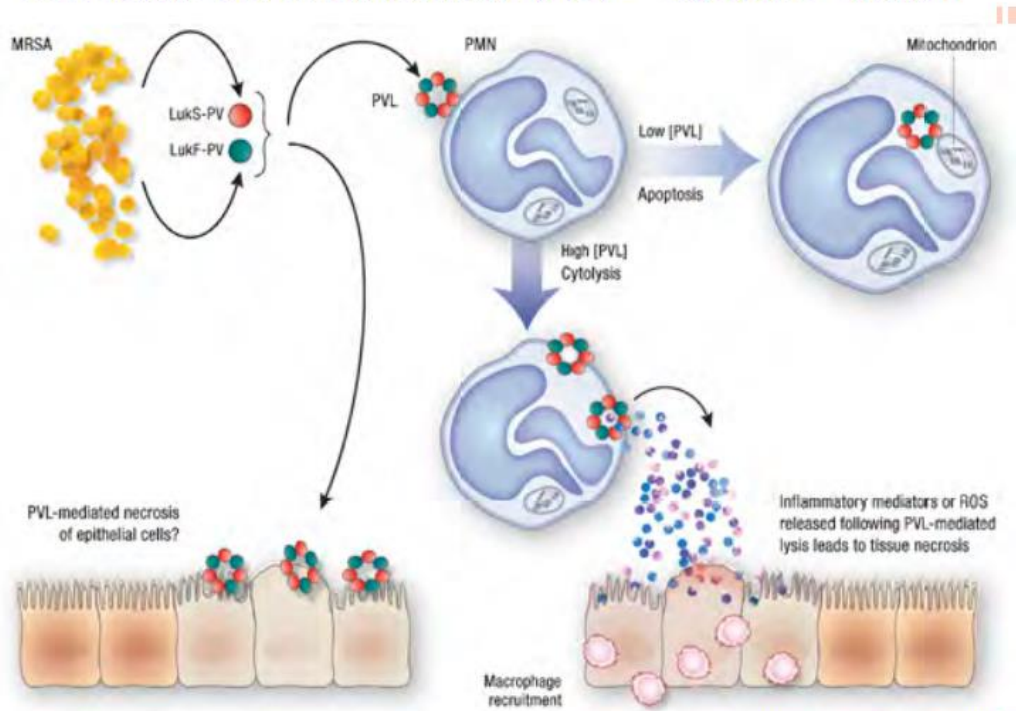


impétigo



panaris

Leucocidine de Panton-Valentine (PVL) = 'Signature' SARMco



Boyle-Vavra, Lab Invest 2007



- ■ des sépticémies
- Les infections nosocomiales à *S. aureus* ne sont pas exceptionnelles: infections du site opératoire, ostéoarticulaires, pulmonaires, neurochirurgicales ou endophtalmiques.

- **Toxémies**

Les toxémies staphylococciques, ou toxi-infections, sont associées à la production de toxines:

- la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1),
- la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) au cours des pneumonies nécrosantes ;
- les exfoliatines A et B lors du syndrome d'exfoliation généralisée (ou syndrome de la peau ébouillantée),
- les entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires, 2 à 6 heures après ingestion de l'aliment contaminé.

- Les staphylocoques à coagulase négative (SCN), notamment les espèces *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus*.
- Les SCN peuvent être responsables de conjonctivites, d'endophtalmies, d'infections cutanées, d'infections urinaires (essentiellement *S. saprophyticus*), d'endocardites, de péritonites, d'infections osseuses et articulaires, de méningites postneurochirurgicales, d'infections sur matériel ou sur valves (endocardites et méningites), ainsi que de septicémies dont le point de départ peut être un cathéter.

Diagnostic direct en routine

- **Prélèvements et transport**
- Les staphylocoques sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement.
- Les staphylocoques et notamment *S. aureus* peuvent cultiver à partir de n'importe quel prélèvement. Mais les bonnes procédures de prélèvements doivent être strictement appliquées, notamment en ce qui concerne l'asepsie.
- il faut tenir compte des risques de contamination des échantillons du fait de la présence, au niveau de la peau et des muqueuses, de flores hébergeant de nombreux staphylocoques.

- **Examen direct**
- **coloration de Gram**, cocci à Gram positif de 0,8 à 1 μm de diamètre, **isolés, ou en diplocoques, en courtes chainettes ou plus classiquement en amas.**
- L'aspect en en grappe de raisin correspond à la disposition la plus caractéristique (du grec *staphylê*, grappe de raisin et *kokkos*, grain).

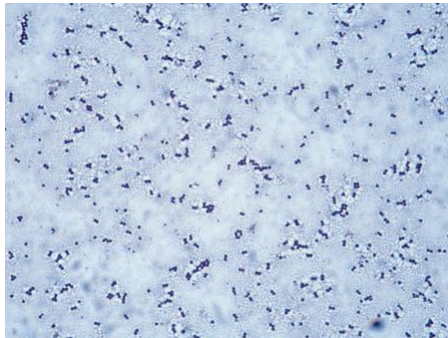


Fig 3. A. Gram de *S. aureus*. B. Staphylocoques en microscopie à balayage.

- **Culture**
- Les staphylocoques sont des bactéries **peu exigeantes** et peuvent être isolés en **bouillon ou sur milieux solides simples** tels que géloses ordinaires ou géloses au sang à 35–37 °C en aérobiose.
- Sur les milieux usuels, les colonies de staphylocoques, de taille variable (1 à 3 mm après 24 heures d'incubation) sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties (Fig. 4).

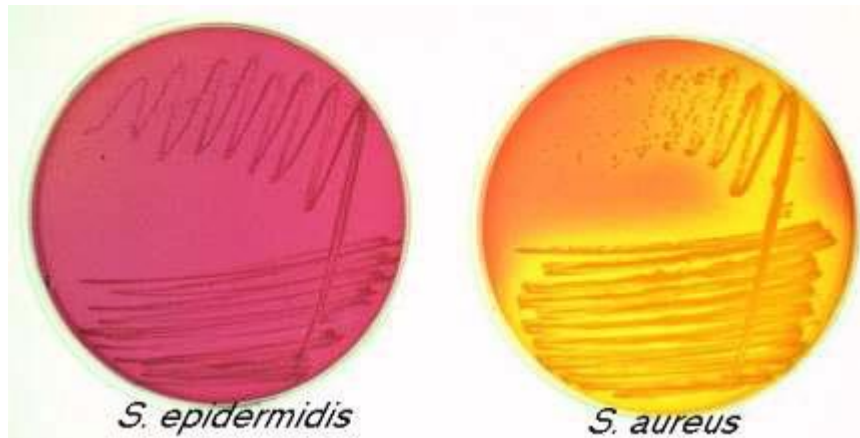


Fig. 4 Isolement sur gélose Columbia à 5 % de sang de mouton.

A. *Micrococcus luteus*. **B.** *Staphylococcus aureus*. **C.** *Staphylococcus epidermidis*.

- Sur gélose au sang, les souches « typiques » de *S. aureus* peuvent produire des colonies de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse β .
- Certains milieux de culture peuvent être utilisés soit dans un but sélectif, soit dans un but d'identification directe. On retrouve notamment :
 - **les milieux gélosés sélectifs Columbia** additionnés d'antibiotiques **CNA** (colistine et acide nalidixique) ou **CAP** (colistine et aztreonam) qui permettent d'inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, et ainsi de sélectionner les bactéries à Gram positif dans un prélèvement polymicrobien ;

■ le milieu sélectif de Chapman, milieu gélosé hypersalé (NaCl 75g/l) contenant du **mannitol**, destiné à identifier les colonies de *S. aureus* par présence d'un halo jaune;



les milieux chromogènes : différents milieux chromogènes proposent l'identification directe de *S. aureus* (plus ou moins associé à la détection de la résistance à la meticilline) en fonction de la couleur des colonies obtenues (Fig. 6).

Sont actuellement commercialisés :

- – Brilliance Staph 24R (Oxoid) ;
- – ChromIDR *S. aureus* (SAID) (bioMérieux) ;
- – CHROMagarR *Staph aureus* (CHROMagar) ;
- – BBL CHROMagarR *Staph aureus*

(BD Diagnostics).

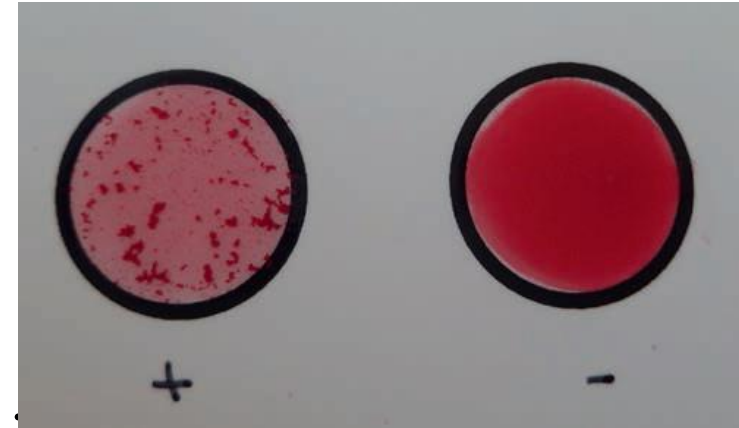


Fig. 6 Culture sur milieu chromogène.

S. aureus (à gauche) et SCN (à droite).

La couleur des colonies de *S. aureus* varie selon les fabricants.

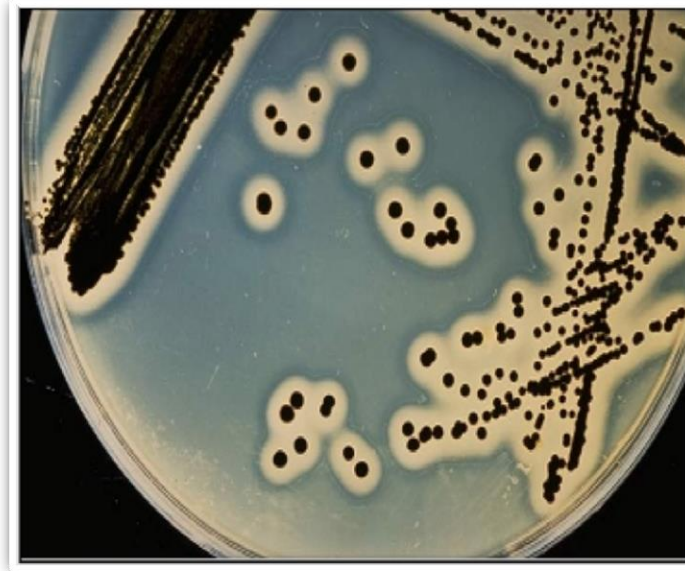
-Gélose MRSA:

Gélose chromogène
contient de la céfoxitine

→SAMR: colorés en vert

→SAMS: ne poussent pas

bactériologie alimentaire pour isoler et caractériser le staphylocoque, le milieu de Baird Parker est utilisé. Il est à base de téllurite comme agent sélecteur, enrichi en glycine, en pyruvate et en jaune d'oeuf.



- **Identification de genre**
- La **catalase** permet de différencier, parmi les cocci à Gram positif, les **staphylocoques des streptocoques**.
- La catalase est un caractère constant chez les staphylocoques, malgré quelques rares cas rapportés de *S. aureus* à catalase négative. $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

Faux + : si prélèvement d'une colonie sur gélose au sang
(activité catalasique érythrocytaire)

Prélever le sommet des colonies

- **Identification de l'espèce**
- Les **tests rapides d'orientation** sont les suivants.
- Recherche de la **coagulase libre** : la coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais peut aussi être produite par *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus* et *S. pseudointermedius*.

Ce test consiste à mettre en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma.

- Dans un tube à hémolyse, on mélange 0,5 ml de plasma de lapin et 0,5 ml d'une culture de 18 heures en bouillon ou 0,5 ml d'une suspension dense de la bactérie à étudier. Le mélange est placé à l'étuve à 37 °C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *S. aureus* provoquent la coagulation du plasma, le plus souvent **lors des 3 premières heures**. La prise en masse est généralement totale (Fig. 7) mais parfois légère et plus tardive, et la réaction doit être considérée comme positive si le phénomène intervient avant la 24e heure.
- La formation d'un précipité fibreux ou flocculeux doit être considérée comme un résultat négatif. Le mélange est observé **d'heure en heure** car le coagulum peut être suivi d'une redissolution du caillot provoquée par la fibrinolyse.

Fig. 7 Recherche de coagulase libre.

A. Négative. B. Positive.



Tableau 28.2 Caractères biochimiques distinctifs des principales espèces de *Staphylococcus* isolées chez l'homme.

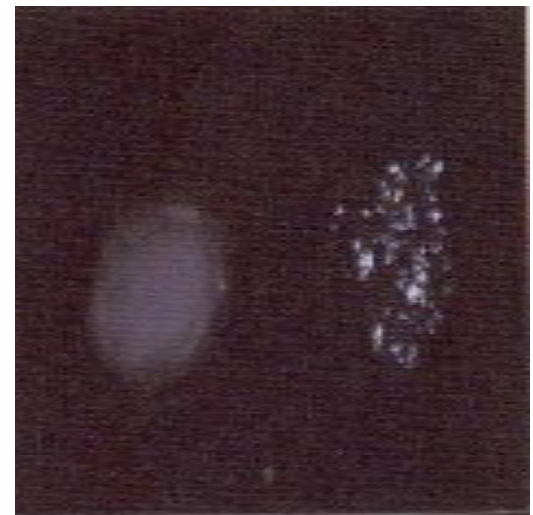
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Autres staphylocoques
Coagulase	+	–	–	–	–
Clumping factor	+	–	–	–	–
Fermentation					
Glucose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	–	V	+	V
Xylitol	–	–	–	+	–
Phosphatase	+	+	–	–	V
Dnase	+	–	–	–	V
Novobiocine (5 µg)*	S	S	S	R	V

V : variable; + : 90 % ou plus de souches positives; – : 90 % ou plus de souches négatives.

* Le disque est déposé sur un milieu Mueller-Hinton ensemencé comme un antibiogramme, S pour sensible si le diamètre ≥ 16 mm et R pour résistant si le diamètre < 16 mm.

S. aureus sont: indole –, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine

- Recherche du facteur d'affinité pour le fibrinogène (**coagulase liée ou *clumping factor***) :
- il est présent chez *S. aureus*, mais peut aussi être retrouvé chez *S. lugdunensis*, *S. intermedius* et *S. schleiferi*.
- Ce test consiste en la mise en évidence du facteur d'affinité pour le fibrinogène présent à la surface de *S. aureus*. Les suspensions de *S. aureus* réagissent avec des constituants du plasma humain dilué au 1/5e en entraînant une agglutination rapide.



- **Recherche d'une DNase**
- La mise en évidence de la production d'une DNase est effectuée sur une gélose contenant de l'ADN. Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose ; la gélose est incubée 18 heures à 37 °C. L'hydrolyse de l'ADN est révélée en ajoutant de l'acide chlorhydrique.
- Lorsque l'ADN a été dégradé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre (Fig. 9).



Fig. 9 Recherche de la production d'une DNase. *Staphylococcus epidermidis* à gauche (DNase négative). *S. aureus* à droite (DNase positive).

■ **Recherche de la protéine A** : cette protéine A peut être retrouvée chez *S. aureus*, mais aussi chez les souches de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, la plupart des souches de *S. hyicus* et de rares souches de *S. intermedius*.

La **protéine A est associée au peptidoglycane de *S. aureus*** et à la propriété de fixer le **fragment Fc** des immunoglobulines (Ig) (Fig. 10) de l'homme et du lapin. Ce test consiste à rechercher l'agglutination sur lame des staphylocoques mis en présence d'hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin anti-hématies de mouton ou de particules de latex recouvertes d'IgG.

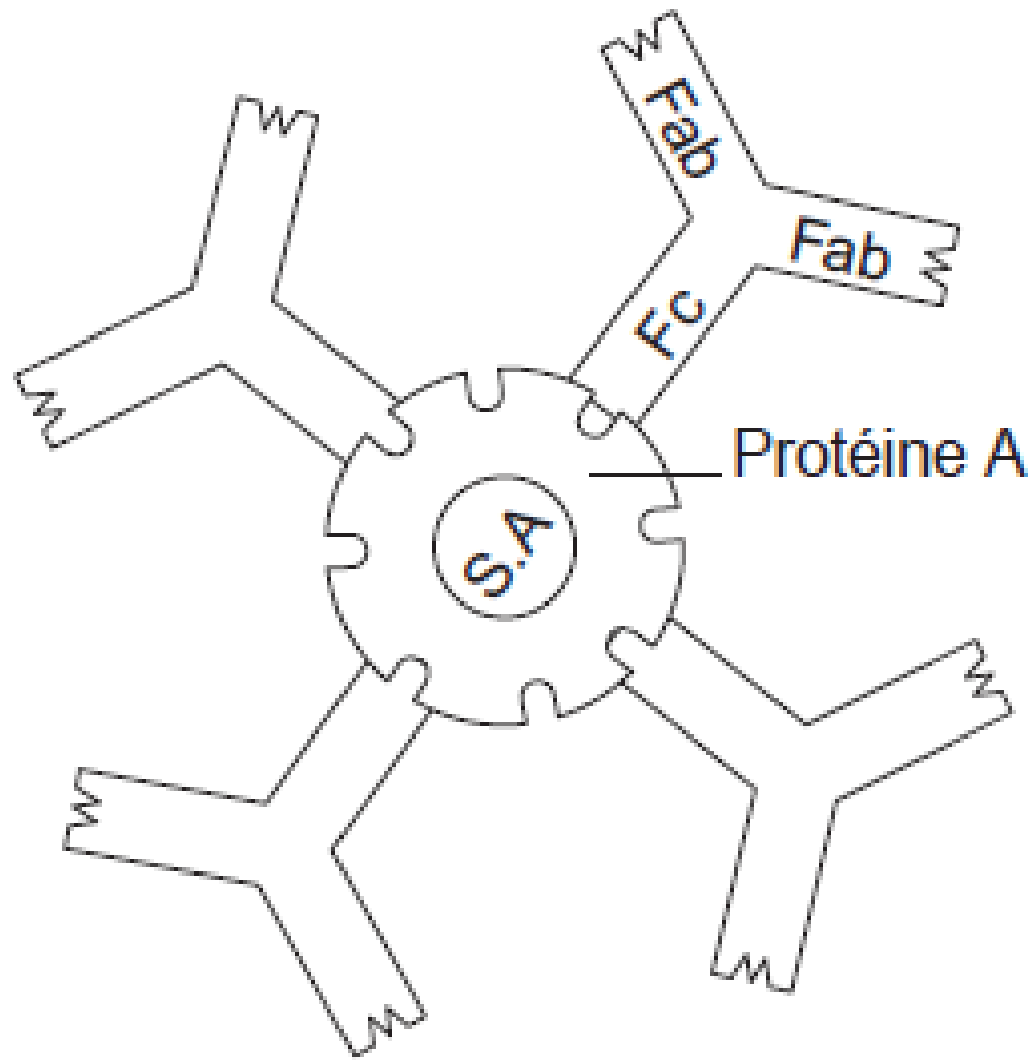
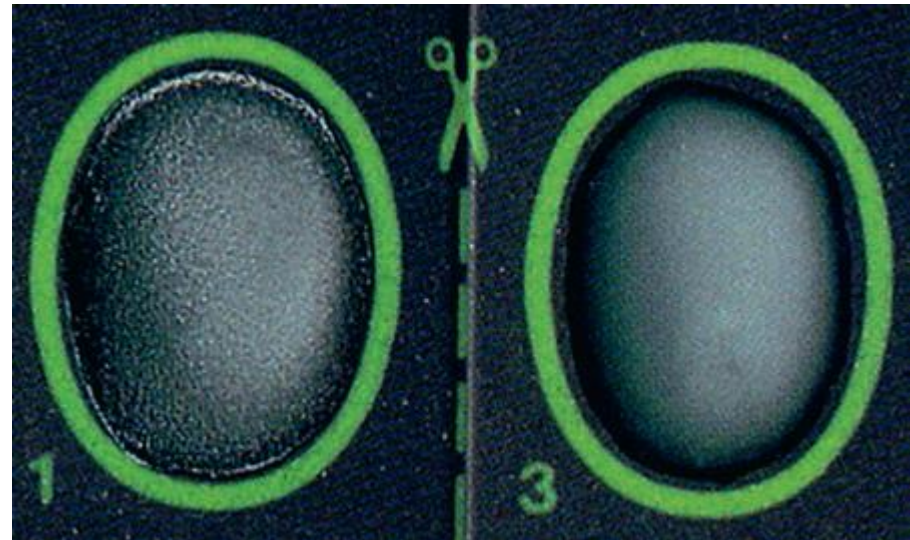


Fig. 10 Représentation schématique de la fixation de la protéine A à la fraction Fc des immunoglobulines. S.A : *Staphylococcus aureus* ; Fc : fraction Fc des immunoglobulines ; A : protéine A, constitutive de la paroi de *S. aureus*.

- Malheureusement, cette recherche peut rester négative, car la synthèse peut être inhibée par le milieu de culture et certaines souches ne sont pas productrices de protéine A.
- ■ **Recherche combinée des différents facteurs.** Devant la sensibilité limitée de chacun de ces tests d'orientation et afin d'améliorer leur praticabilité, différents fabricants ont mis au point des tests d'agglutination permettant une identification présomptive de *S. aureus* par la recherche simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et $\pm$ de polysaccharides capsulaires de *S. aureus* (Fig. 11).



- Ces réactifs sont constitués de billes de latex ou d'hématies sensibilisées avec du fibrinogène, des IgG et des anticorps monoclonaux spécifiques de **polysaccharides capsulaires** de *S. aureus*.