

MECANISMES DE LA RESISTANCE AUX B-LACTAMINES DE SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLEES AU CHU DE DAKAR (SENEGAL)

DIA ML¹, DIONGUE K¹, DIOP A¹, KA R¹, SONKO MA¹, DIAGNE R¹, SOW AI¹, CISSE MF¹

RESUME

Introduction : Au Sénégal, peu de données sont disponibles sur la protéine PLP2a ou son gène (gène *mecA*) chez les souches de *Staphylococcus aureus*. Pour pallier cette insuffisance, nous avons entrepris ce travail dont l'objectif principal était la recherche des mécanismes de la résistance de cette bactérie aux β -lactamines dans deux hôpitaux dakarois

Matériel et Méthodes : Deux cent (200) souches de *S. aureus* ont été collectées entre 2010 à 2012 dans deux Laboratoires de Bactériologie du CHU de Dakar. Leur sensibilité a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé (Mueller Hinton). La recherche de la PLP2a a été réalisée sur toute souche exprimant un bas niveau de sensibilité à l'Oxacilline et/ou à la Céfoxitine. La modification des PLP constitutives a été recherchée grâce à l'Oxacilline, l'Imipénème, le Céfotaxime et la Céfoxitine.

Résultats : Treize souches étaient phénotypiquement résistantes à la Céfoxitine; parmi elles, seules 6 ont été détectées par l'Oxacilline. Sur ces 13 souches méti-R, 11 produisent la PLP2a. Vingt six souches MODSA ont été retrouvées: 2 ont leur PLP4 modifiée et 24 leur PLP2 modifiée. La production d'une pénicillinase a été retrouvée sur 184 isolats.

Conclusion : Le mécanisme de la résistance aux β -lactamines des souches de *S. aureus* à Dakar est varié : production de PLP2a (5,5%), modification d'une PLP (13%) et sécrétion de pénicillinase (92%). Nous conseillons l'usage du disque de Céfoxitine pour la détection en routine des souches méti-R lors de l'antibiogramme.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus* – Mécanismes de résistance - β -lactamines – Sénégal

ABSTRACT

MECHANISMS OF RESISTANCE TO β -LACTAMINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES IN A DAKAR UNIVERSITY HOSPITAL (SENEGAL)

Introduction : This study had for aim to detect resistance bound to PBP2a and other mechanisms of resistance of *S. aureus* to β -lactamins, Aminositides and Vancomycin.

Materials and methods : It is a prospective study led from 2010 and 2012 at the Teaching Hospital of Dakar. Strains were identified according to biochemical Pastorex® Staph-Plus, (Bio-Rad) and antigenic features. Their susceptibility to antibiotic was tested by antibiogram.

Results : Oxacillin and Cefoxitin detected respectively 6 (3 %) and 13 (6,5 %) resistant strains to methicillin. The PBP2a was found on 11 strains (29,7 %) among which 6 were resistant to Oxacillin and all resistant to Cefoxitin. Twenty four (24) strains MODSA were detected by Cefotaxim. Five strains having a KTG profile of resistance to Aminositides were found. Vancomycin was efficient on all the strains.

Conclusion : The mechanisms of resistance of *S. aureus* to β -lactamins are varied: production of PBP2a, modification of a PBP and secretion of penicillinase. We recommend the use of Cefoxitin disk for the detection in routine of resistant strains to methicillin.

Keywords: *Staphylococcus aureus* – Mechanisms of resistance – β -lactamines – Senegal

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est impliqué dans des pathologies variées dont 1 à 5% sont des infections communautaires et 30% des infections nosocomiales (Lowy F, 1998). La prévalence des souches résistantes à la méticilline (SARM) ou souches méti-R dans le monde est hétérogène dans un pays, une région et un hôpital (Forestier et al, 2007). Le support de cette résistance est le gène *mecA* codant pour la Protéine Liant la Pénicilline 2a (PLP2a). A côté du *S. aureus* producteur de la PLP2a, il existe des souches ne possédant pas le gène *mecA*, tout en exprimant un bas niveau de résistance à la méticilline : soit el-

¹ Service de Bactériologie-Virologie, Faculté de Médecine de Dakar, Sénégal

Auteur correspondant : Dr Mouhamadou Lamine Dia, BP 16222 Fann, Dakar, Sénégal, Tél : 00 (221) 77 657 56 34, Email : lamedia2004@yahoo.fr

les sont hyperproductrices de β -lactamase (souches BORSA: Borderline Resistant S. aureus), soit elles expriment des PLP modifiées (souches MODSA: Modified Penicillin-Binding S. aureus) (Dugeon, 2006). En routine, on détecte la résistance à la méticilline grâce à un disque d'Oxacilline ou de Céfoxitine. Mais, de plus en plus, les Laboratoires qui ont des moyens financiers consistants, recherchent directement la PLP2a et/ou le gène mecA. Dans la sous-région ouest africaine, peu de données sont disponibles sur la détection de l'un ou l'autre de ces 2 marqueurs. Ce constat a motivé cette étude dont l'objectif général est la détermination du profil de sensibilité aux β -lactamines de souches de S. aureus isolées à Dakar. Les objectifs spécifiques sont : la détection de la PLP2a, la modification d'une PLP constitutive et la sécrétion de la pénicillinase.

MATERIEL ET METHODES

C'est une étude prospective menée de 2010 à 2012 dans 2 hôpitaux universitaires de Dakar: l'Hôpital d'Enfants Albert Royer (HEAR) et le Centre Hospitalier Universitaire de Fann (CHUF). Elle a porté sur des souches de S. aureus isolées en situation pathogène à partir de produits pathologiques collectés chez des patients hospitalisés ou externes. L'identification a été faite par l'examen à l'état frais, la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de la fermentation du mannitol et le test d'agglutination Pastorex® Staph-Plus (Bio-Rad) mettant en évidence la protéine A et la coagulase. L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion de disques (Bio-Rad) en gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie avec les disques Bio-Rad (SFM, 2011). Neuf antibiotiques ont été testés (Tableau I).

Tableau I: Antibiotiques testés au CHU de Dakar sur 200 isolats de S. aureus

Familles	Antibiotiques	Charge des disques	Diamètres critiques
β -lactamines	Pénicilline G	10 UI	$\geq 29\text{mm} - < 29\text{mm}$
	Oxacilline	5 μg	$\geq 20\text{mm} - < 20\text{mm}$
	Céfoxitine	30 μg	$\geq 27\text{mm} - < 25\text{mm}$
	Céfotaxime	30 μg	$\geq 27\text{mm} - < 23\text{mm}$
	Imipénème	10 μg	$\geq 24\text{mm} - < 17\text{mm}$
Aminosides	Kanamycine	30 μg	$\geq 17\text{mm} - < 15\text{mm}$
	Tobramycine	10 μg	$\geq 20\text{mm} - < 20\text{mm}$
	Gentamicine	10 μg	$\geq 20\text{mm} - < 20\text{mm}$
Glycopeptides	Vancomycine	30 μg	$\geq 17\text{mm} - < 17\text{mm}$

Un inoculum de 106 UFC/ml a été préparé pour chaque souche bactérienne et le milieu MH a été ensemencé par écouvillonnage; après 18-24 heures d'incubation à +36°C en atmosphère aérobie, la lecture et l'interprétation des antibiogrammes ont été faites

grâce aux abaques fournies par le fabricant.

La résistance à la méticilline a été recherchée simultanément à l'aide des disques d'Oxacilline et de Céfoxitine. Le milieu était incubé pendant 24H à +30°C pour le disque d'Oxacilline et à +37°C pour le disque de Céfoxitine. Les critères d'interprétation sont: souche méti-S pour un diamètre d'inhibition égal ou supérieur à 20 mm pour l'Oxacilline, égal ou supérieur à 27mm pour la Céfoxitine; souche méti-R pour un diamètre inférieur à 20 mm (Oxacilline) et inférieur à 25 mm (Céfoxitine). La PLP2a a été recherchée à l'aide du PBP2' Test Oxoid® utilisant un anticorps spécifique anti PLP2a. La modification d'une PLP constitutive (souches MODSA: Modified Staphylococcus aureus) a été recherchée en testant sur gélose MH (méthode de diffusion), l'Impipénème pour la PLP1, la Céfotaxime pour la PLP2, l'Oxacilline pour la PLP3 et la Céfoxitine pour la PLP4. La détection de la pénicillinase a été faite à l'aide du disque de Pénicilline G. Le contrôle de qualité pour l'identification bactérienne et les différents tests de sensibilité a été réalisé à l'aide de la souche de référence Staphylococcus aureus ATCC 29213.

RESULTATS

L'étude a porté sur 200 souches de S. aureus. Elles provenaient du Laboratoire de l'HEAR (125 souches) et de celui du CHUF (75 souches). Ces souches ont été isolées de produits pathologiques collectés chez 111 patients hospitalisés (78 à l'HEAR et 33 au CHUF) et 89 suivis en externe (Tableau II).

Tableau II: Répartition selon le produit pathologique de 200 souches de Staphylococcus aureus isolées au CHU de Dakar

Souches de Staphylococcus aureus	Total		Hôpital	
	Nombre	%	HEAR	CHUF
Produits pathologiques				
Pus d'abcès	59	29,5	46	13
Pus de plaie ouverte	31	15,5	23	8
Pus pleural	30	15	18	12
Sang	25	12,5	11	14
Urines	23	11,5	3	20
Pus d'oreille	15	7,5	12	3
Pus articulaire	4	2	4	0
Pus d'ascite	3	1,5	2	1
Liquide broncho-alvéolaire	3	1,5	0	3
Liquide céphalo-rachidien	2	1	2	0
Sécrétions génitales purulentes	2	1	1	1
Cathéter intraveineux	1	0,5	1	0
Pus oculaire	1	0,5	1	0
Pus ombilical	1	0,5	1	0
Total	200	100	125	75

Légende: HEAR: Hôpital Enfants Albert Royer; CHUF: Centre Hospitalier Universitaire Fann

La pénicillinase staphylococcique était sécrétée par 184 souches (92%). Les disques d'Oxacilline et de Céfoxitine ont détecté 13 souches ayant un profil phénotypique de sensibilité diminuée à la méticilline. Parmi elles, 11 souches produisaient la PLP2a additionnelle ; toutes avaient été détectées par le disque de Céfoxitine et seulement 6 par celui de l'Oxacilline. Deux souches suspectes détectées grâce au disque de Céfoxitine comme étant des SARM ne produisaient pas de PLP2a, mais présentaient une modification de la PLP4. Cinq des 11 souches de SARM proviennent du Laboratoire de l'HEAR ; les six autres de celui du CHUF. Elles ont été isolées 5 fois dans du pus (pleural, oreille, abcès, génital), 4 fois des urines et 2 fois du sang (hémoculture, cathéter veineux). Six des patients sources étaient hospitalisés et 5 étaient des externes. Quatre malades infectés par un SARM ont été dépistés en 2010 contre 7 en 2011.

Des souches MODSA ont été détectées : 24 fois grâce au Céfotaxime (PLP2 modifiée) et 2 fois grâce à la Céfoxitine (PLP4 modifiée). Les 11 souches méti-R produisant la PLP2a présentaient en même temps une modification de la PLP2 constitutive.

Sur les 200 souches testées, seules 5 ont résisté à la Kanamycine, la Tobramycine et la Gentamicine ; elles présentaient ainsi un profil KTG et toutes étaient des SARM productrices de la PLP2a. La Vancomycine a inhibé la totalité des 200 souches de *S. aureus*.

DISCUSSION

Nous n'avons détecté que 13 souches de SARM (6,5%). Ce taux est faible au regard des 21 à 30% rapportés en Afrique et ailleurs dans le Monde (Sow et al, 1993; Pillar et al, 2008). Il est admis que le taux de détection du « phénotype résistant à la Métiline » d'une souche de *S. aureus* est plus élevé avec le disque de Céfoxitine qu'avec celui de l'Oxacilline (Felten et al, 2002). Nous avons en effet détecté 13 SARM avec la Céfoxitine et 6 avec l'Oxacilline. Seules 2 souches sur les 13 ne produisaient pas la PLP2a; elles résistaient à la Céfoxitine par modification de leur PLP2 constitutive. Il y'a donc une bonne corrélation entre le « phénotype résistant à la Céfoxitine » et la production de la PLP2a additionnelle.

Nous avons isolé autant de souches méti-R chez les malades hospitalisés (6 souches) que chez ceux qui sont suivis en externe (5 souches) ; malheureusement, nous n'avons pas pu prouver l'origine communautaire ou hospitalière de ces SARM chez les 11 patients concernés. Actuellement, les SARM qui circulent dans la communauté sont plus sensibles à la plupart des antibiotiques que les SARM responsables d'infections nosocomiales (Zetola et al, 2005; Ho et al, 2007).

La résistance par modification des PLP a été observée chez 26 souches de *S. aureus* ; elle a porté sur 2 (PLP2 et PLP4) des 4 PLP constitutives. La

signification clinique des souches MODSA n'est pas connue (Daurel et al, 2008). Les 11 souches méti-R détectées se sont révélées être à la fois des SARM et des MODSA.

La résistance de *S. aureus* aux pénicillines M est souvent associée à celle aux la Tobramycine et à la Kanamycine; cependant, de telles souches restent en général sensibles à la Gentamicine (Drugeon et al, 2006). Cette situation a prévalu dans notre étude où le phénotype KTG a été rarement rencontré (5%). Ailleurs, des taux de 10% à 77% ont été rapportés (Bertrand et al, 2004; Akoua-Koffi et al, 2004). Le phénotype KT a été observé chez 90% des souches d'origine hospitalière; ce constat a été fait aussi chez les souches d'origine communautaire qui manifestent en plus une résistance à l'acide fusidique et aux Tétracyclines (Vandenesch et al, 2007).

L'émergence et la diffusion de la résistance à la vancomycine de souches de *S. aureus* est un phénomène inquiétant. Ces souches ne sont pas encore détectées dans nos structures. Il faut cependant signaler le fait que nous ne testons cette molécule que par la méthode de diffusion en gélose; or, les performances de cette méthode sont médiocres pour détecter la résistance à la vancomycine (Tenover et al, 1998).

CONCLUSION

L'épidémiologie des résistances du staphylocoque aux antibiotiques évolue en permanence. La méthode de diffusion en gélose des antibiotiques, malgré ses imperfections, est un bon moyen de surveillance de ces résistances. En remplaçant le disque d'Oxacilline par celui de la Céfoxitine d'une part et, d'autre part en systématisant la recherche de production de la PLP2a, nous caractériserons mieux les isolats de *Staphylococcus aureus* circulant au Sénégal. L'actualisation des données locales sur le profil de sensibilité de cette bactérie aux β -lactamines et aux antibiotiques de seconde intention (Aminosides, Macrolides, Tétracyclines) contribuera à la mise en place d'une meilleure stratégie de traitement et de prévention des infections à SARM.

Conflit d'intérêts: Nous auteurs, déclarons qu'il n'y a pas de conflit d'intérêt en relation avec cet article.

REFERENCES

- Lowy F. *Staphylococcus aureus* infections. 1998. N Engl J Med, 339: 520-32.
- Forestier E, Rémy V, Mohseni-Zadeh M, Lesens O, Jauhlac B, Christmann D, Hansmann Y. 2007. Bactériémies à *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline : aspects épidémiologiques et thérapeutiques récents. Rev Med Intern.; 28: 746-55.
- Drugeon H. β -lactamines et staphylocoques. In Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. 2006. Antibiogramme. ESKA

(Eds), Paris. 117-24.

•Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2011. SFM, Paris, France, 2011: <http://www.sfm.asso.fr/>

•Sow AI, Fall MI, Boye CS, Gaye-Diallo A, Diop D, Cissé MF, Mboup S, Samb A. 1993. Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en situation pathogène au CHU de Dakar : sécrétion de pénicillinase, résistance hétérogène. *Méd Afr Noire*, 40: 407-13.

•Pillar CM, Draghi DC, Sheehan DJ, Sahm DF. 2008. Prevalence of multi drug- resistant, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: findings of the stratified analysis of the 2004 to 2005 LEADER Surveillance Programs. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 60: 221-4.

•Felten A, Grandry B, Lagange PH, Casin L. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low level Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*, 40: 2766-71.

•Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL et al. 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*, 5: 275-86.

•Ho PL, Cheung C, Mak GC et al. 2007. Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 57: 145-51.

•Daurel C, Leclercq R. 2008. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Rev Francoph Labo*, 40: 81-90.

•Bertrand X, Mueller A, Thowverez M, Talon D. 2004. Retour vers la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM): relation entre génotype et antibiotype. *Path Biol*, 52 : 480-5

•Akoua-Koffi C, Guessennd N, Gbonon V, Faye-Ketté H, Dosso M. 2004. La méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998-2001): un nouveau problème en milieu hospitalier. *Méd Mal Infect*, 34:132-6

•Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *J Clin Microbiol*, 45:329-32

•Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Stewart CD, Stocker SA, Han Cock A, Ohara CM, Clark NC, Hiramatsu K. 1998. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and others glycopeptides. *J Clin Microbiol*, 36:1020-7