



PERFORMANCES ET COUTS DE TROIS TESTS PHENOTYPIQUES D'IDENTIFICATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A COTONOU, BENIN

AFFOLABI D^{1,2}, ODOUN M², EHOUMI D², FAIHUN F², SOGBO F¹, WACHINOU P²,
BANKOLE H³, MASSOUGBODJI A¹, ANAGONOU S^{1,2}.

1. Service de Microbiologie, Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga, Cotonou
2. Laboratoire Polyvalent de Biologie Clinique, Centre National Hospitalier de Pneumo-Phtisiologie, Cotonou
3. Laboratoire Central du Service des Laboratoires d'Analyses Biomédicales, Cotonou

Auteur correspondant : Dissou AFFOLABI. Laboratoire Polyvalent de Biologie Clinique, Centre National Hospitalier de Pneumo-Phtisiologie, 01 BP 817 Cotonou, Bénin. Téléphone: +229-66-61-48-62. Email: affolabi_dissou@yahoo.fr

RESUME

Objectif. Evaluer les tests phénotypiques d'identification des souches de *Staphylococcus aureus* à Cotonou.

Méthodes. Au total, 302 souches de staphylocoques ont été recueillies de façon consécutive dans quatre laboratoires de bactériologie de Cotonou du 1^{er} décembre 2012 au 31 mars 2013. Ces souches ont été utilisées pour comparer la performance, le coût et le délai d'obtention des résultats de la recherche de la désoxyribonucléase (DNase), de la coagulase libre, et de la coagulase liée par agglutination (Staphylase®). La PCR à la recherche du gène nuc a été considérée comme test de référence.

Résultats. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 97,78% et 92,45% pour la DNase ; 94,44% et 98,11% pour la Coagulase libre; 97,78% et 98% pour la Staphylase®. L'exactitude était de 97,90%, 97,02% et 94,04% respectivement pour la Staphylase®, la recherche de la Coagulase libre et de la DNase. Les différentes combinaisons de deux de ces tests n'ont pas amélioré le résultat final de l'identification de *S. aureus*. L'obtention des résultats était très rapide avec la Staphylase® (environ 5 minutes), alors qu'elle était de 4 à 24 heures pour la Coagulase libre et de 18 à 24 heures pour la DNase. Le test le plus cher était la recherche de la Coagulase libre (1.090 FCFA), suivie de la Staphylase® (770,7 FCFA) et de la DNase (136 francs FCFA).

Conclusion. Les caractéristiques des tests étant variables d'un test à l'autre, leur utilisation dépendra de différents facteurs dont l'urgence diagnostique et/ou les moyens disponibles dans le laboratoire.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, DNase, Coagulase, PCR.

ABSTRACT

Objective. To assess phenotypic tests for the identification of *Staphylococcus aureus* in Cotonou

Method. Three hundred and two strains of *Staphylococcus spp* were consecutively collected in four different bacteriology laboratories in Cotonou from December 1st, 2012 to March 31st, 2013. These strains were used to compare the performance, cost and time to obtain results for DNase, Coagulase in tubes and Staphylase® test (agglutination). PCR for detection of the nuc gene was considered as the reference test.

Results. Sensitivity and specificity were respectively 97.78% and 92.45% for DNase ; 94.44% and 98.11% for Coagulase in tubes; 97.78% and 98.00% for Staphylase® test. Accuracy of the tests was 97.90%, 97.02% and 94.04% respectively for Staphylase® test, Coagulase in tubes and DNase. Combining two of these tests did not improve the final result of *S. aureus* identification. Time to get results was very short for the Staphylase (about 5 minutes), 4-24 hours for Coagulase in tubes and 18 to 24 hours for DNase. The most expensive test was Coagulase in tubes (CFA 1,090) followed by Staphylase® (CFA 770.7) and DNase (CFA 136).

Conclusion. Since characteristics of the tests are different, their use in a define laboratory will depend on the emergency of the clinical situation and/or resources available in the laboratory.

Keywords : *Staphylococcus aureus*, DNase, Coagulase, PCR

INTRODUCTION

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme mais qui sont susceptibles de provoquer une large gamme d'infections allant du simple furoncle à la septicémie [1, 2]. Une quarantaine d'espèces de *Staphylococcus* est actuellement répertoriée. Parmi celles-ci, *Staphylococcus aureus* est l'espèce de loin la plus pathogène [3,4]. Ainsi, la mise en évidence d'une souche de *S. aureus* dans un échantillon est un

argument fort en faveur de sa responsabilité dans la pathologie suspectée. En revanche, l'identification d'une autre espèce de *Staphylococcus* oriente plutôt vers une souillure du prélèvement sauf dans des circonstances bien définies [5,6]. La différenciation entre *S. aureus* et les autres espèces de *Staphylococcus* est donc une nécessité dans les laboratoires.

A cet effet, il existe sur le marché plusieurs tests dont les plus utilisés sont les tests phénotypiques

suivants : la recherche de la coagulase libre, la recherche de la désoxyribonucléase (DNase) et la recherche de la coagulase liée par agglutination [7]. La PCR, considérée comme le test de référence, est coûteuse, contraignante et n'est pas souvent disponible en routine dans les laboratoires, notamment ceux des pays à faible revenu [8]. Seuls les tests phénotypiques sont généralement utilisés dans ces pays. Cependant les performances de ces tests sont variables de façon intrinsèque mais pourraient également l'être selon les génotypes de souches qui circulent dans une région donnée ; soulignant ainsi l'importance pour un pays de ne pas adopter automatiquement les résultats des évaluations faites ailleurs.

Au Bénin, de rares études ont évalué ces tests [9]. Mais ces études ont plutôt comparé les tests phénotypiques entre eux sans recourir à un test de référence comme la PCR. De plus, dans ces études, le délai de rendu des résultats de même que le coût des tests n'ont pas été pris en compte. Or une comparaison globale des tests est nécessaire avant de faire des recommandations sur le ou les tests à utiliser en 1^{ère} intention, de même que sur l'algorithme approprié en présence de plusieurs tests. Nous nous sommes proposés donc dans la présente étude d'évaluer les tests phénotypiques d'identification des souches de *S. aureus* à Cotonou en les comparant à la PCR, utilisée comme test de référence.

MATERIEL ET METHODES

Sites de collecte. Les souches ont été collectées dans les laboratoires de bactériologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM), de l'hôpital Saint Luc, de l'hôpital de zone de Mènonin et au Laboratoire Central du Service des Laboratoires d'Analyses Biomédicales.

Souches. Ont été incluses dans cette étude, les souches de cocci à Gram positif en amas, catalase positive consécutivement isolées sur milieu de Chapman de divers prélèvements cliniques dans les sites de collecte du 1^{er} Décembre 2012 au 31 Mars 2013. Au total, 302 souches ont été incluses dans l'étude.

Tests. Sur chaque souche, les tests phénotypiques suivants ont été réalisés : recherche de la coagulase libre, de la DNase et de la coagulase liée. Un test moléculaire, la PCR pour la détection du gène nuc, spécifique de *S. aureus*, a été utilisé comme test de référence.

Recherche de coagulase libre. La recherche de la production de coagulase libre a été réalisée en utilisant le kit BIORAD (France) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, à partir d'une culture fraîche de chaque souche, une suspension bactérienne dense a été réalisée. En-

suite, 0,5 ml de chaque suspension a été mélangé à 0,5 ml de plasma de lapin reconstitué. Puis, le tube a été incubé à 37 °C pendant 24 heures. Une première lecture a été effectuée après 4 heures d'incubation et en cas de négativité du test à 4 heures, une lecture finale a été effectuée après 24 heures. La positivité de la recherche de la coagulase libre s'exprime par la présence d'un coagulum dans le tube.

Recherche de DNase. La boîte de gélose DNase Test Agar a été ensemencée par stries au centre avec la souche à tester, puis incubée pendant 24 heures en aérobie à 37 °C. La boîte a ensuite été inondée avec 15 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 1 N. La présence d'un halo clair autour de la strie d'ensemencement est le témoin d'une réaction positive.

Recherche d'une coagulase liée (Staphylase®). Elle a été effectuée avec le kit Staphylase® (Oxoid, Grande Bretagne) selon les recommandations du fabricant. Après avoir déposé une à trois colonies sur le cercle test et sur le cercle contrôle de la carte d'agglutination, une goutte de réactif test et une goutte de réactif contrôle ont été respectivement ajoutées sur le cercle test et sur le cercle contrôle. Après mélange, la présence d'une agglutination au niveau du cercle test et non du cercle contrôle traduit une réaction positive. S'il n'y a d'agglutination dans aucun des deux cercles, la réaction est négative. Elle est considérée comme invalide ou ininterprétable lorsqu'une agglutination est notée au niveau du cercle contrôle.

PCR pour la détection du gène nuc. L'extraction de l'ADN des souches a été faite par choc thermique. L'amplification de l'ADN extrait a été faite selon une procédure précédemment décrite [10]. Brièvement, le mélange réactionnel par échantillon est constitué de 34 µl d'eau distillée stérile, 5µl de tampon 10X (Sigma-Aldrich, USA), 4µl de nucléotides 2,5mM (Sigma-Aldrich, USA), 1µl d'amorce nuc1 (20µM, séquence : 5' GCGATTGATGGTGATACGGTT-3'), 1µl d'amorce nuc 2 (20µM, séquence : 5'-AGCCAAGCCTTGACGAAGTAAAGC-3'), 1µl (2,5U/µl) de Go Taq G2 Hot Start Polymerase (Promega, USA) et 5 µl de solution d'ADN extrait.

Le programme de PCR était le suivant : dénatura-tion initiale à 94°C pendant 5 minutes, 37 cycles d'amplification comportant (94°C pendant une minute, 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute et 30 secondes) et enfin une élongation finale de 72°C. La révélation du produit d'amplification a été faite par électrophorèse en gel d'agarose. La taille du produit d'amplification était de 270 pb.

Contrôle de qualité. Dans chaque série de PCR, un contrôle positif (ADN de la souche *S. aureus*

ATCC43300), un contrôle négatif (eau distillée stérile) et un contrôle d'amplification négative (ADN d'une souche d'*Escherichia coli*) ont été inclus. Et la série n'est validée que lorsque les résultats attendus des contrôles sont obtenus.

Coût des réactifs par test. Une évaluation du coût des réactifs qui ont été utilisés pour chacun des tests a été effectuée. Les prix des réactifs ont été

recensés chez trois fournisseurs locaux différents, et le plus bas prix des différents produits a été utilisé pour le calcul du coût des tests. Tous les prix ont été présentés en francs CFA. Seuls les prix des réactifs utilisés ont été considérés pour le calcul.

Délai de disponibilité des résultats. Pour chaque test, ce délai a été noté..

RESULTATS

Description de l'échantillon. Sur les 302 souches incluses dans l'étude, 74,5% provenaient des échantillons d'urines, suivis des pus (14,2%), de divers prélèvements génitaux (8,3%) et du sang (3%).

Performances des tests. Les résultats étaient interprétables pour toutes les souches testées aussi bien pour la recherche de la coagulase libre et de la DNase. En revanche, les résultats étaient ininterprétables pour 12 souches testées par la Staphylase®, soit 4,0%.

Les performances individuelles des tests sont résumées dans le tableau I.

Tableau I. Performances des tests.

Tests	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	Exactitude
DNase	97,78%	92,45%	84,62%	98,99%	94,04%
Coagulase libre	94,44%	98,11%	95,51%	97,65%	97,02%.
Staphylase®	97,78%	98,00%	95,65%	98,99%	97,90%

VPP= valeur prédictive positive ; VPN= valeur prédictive négative

La recherche de la coagulase liée par le test d'agglutination Staphylase® est le plus performant des tests phénotypiques évalués. Ce test est suivi par la recherche de la coagulase libre et enfin la DNase.

En combinant les différents tests phénotypiques et en considérant le résultat final comme positif lorsque l'un au moins des deux tests est positif, les performances des tests phénotypiques se présentent comme suit (tableau II):

Tableau II: Performances des combinaisons des tests phénotypiques

Combinaisons de tests	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	Exactitude
Coagulase libre-DNase	98,89%	91,98%	83,96%	99,49%	94,04%
Coagulase libre-Staphylase®	98,89%	97,17%	93,68%	99,52%	97,68%
DNase-Staphylase®	98,89%	92,45%	84,76%	99,49%	94,37%

VPP= valeur prédictive positive ; VPN= valeur prédictive négative

La meilleure combinaison est celle associant la recherche de la coagulase libre et le test d'agglutination Staphylase®. Cependant, l'exactitude des combinaisons de tests n'est pas supérieure à celle des tests pris isolément.

Coût des réactifs par test. Le coût du réactif pour un test, pour chacun des tests phénotypiques évalués est représenté dans le tableau III.

Tableau III : Evaluation du coût des réactifs des tests phénotypiques

Coût Réactifs (CFA)	Coagulase libre	Staphylase®	DNase
Une souche	1090	770,7	136

Le test le plus cher est la coagulase libre suivie de la Staphylase® et de la DNase.

Délai de disponibilité des résultats. Il est résumé dans le tableau IV.

Les résultats sont disponibles immédiatement pour la Staphylase. Il peut être disponible dès 4 heures pour la coagulase libre mais uniquement le lendemain pour la DNase.

Tableau IV : Délai d'obtention des résultats des tests phénotypiques

Paramètres	DNase	Coagulase	Staphylase®
Délai	18 à 24 heures	4 à 24 heures	5 minutes

DISCUSSION

Le test d'agglutination Staphylase® est le test le plus performant parmi les tests phénotypiques évalués. Il a une sensibilité et une spécificité très élevées de même que la meilleure exactitude. De plus, le temps de réalisation et d'obtention des résultats avec le test Staphylase® est court (les résultats d'une souche sont obtenus en 5 minutes environ). Cependant, ce test n'est fiable que s'il est effectué sur des colonies.

Par ailleurs, certaines souches donnent des résultats ininterprétables avec ce test. En effet, certains auteurs ont signalé que certaines espèces de staphylocoques, notamment *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* et *S. warneri* pourraient donner une réaction non interprétable [11, 12]. Enfin, le test Staphylase® est relativement onéreux (770,7 francs CFA par souche).

La recherche de la coagulase libre a également une bonne exactitude. De plus, il n'est pas nécessaire de faire une culture préalable de la souche à analyser sur gélose avant la réalisation de ce test. Par ailleurs, les résultats peuvent s'obtenir assez rapidement, dès la 4^{ème} heure en cas de positivité ou sinon, un résultat définitif doit être rendu le lendemain. Cependant, la recherche de la coagulase libre est la plus onéreuse des tests que nous avons évalués (1.090 francs CFA par souche). Pour amoindrir le coût de ce test, il est possible d'utiliser du plasma humain à la place du plasma de lapin. Cependant l'utilisation en routine dans un laboratoire, d'un produit humain comme un

réactif pose notamment des problèmes de bioéthique et de risque infectieux accru chez le personnel de laboratoire [7].

La recherche de la DNase quant à elle, est un test peu onéreux (136 francs CFA par souche). Il est également très sensible. Néanmoins, la recherche de la DNase est le moins fiable avec l'exactitude la plus faible. En effet des résultats faussement positifs peuvent s'observer en présence d'espèces telles que *S. intermedius*, *S. caprae*, *S. hyicus*, *S. chromogens*, *S. schleiferi* [13, 14]. Le temps de manipulation est court, cependant ce test requiert une préparation préalable d'un milieu de culture DNase, et les résultats ne peuvent s'obtenir qu'après 18 à 24 heures.

En combinant les différents tests deux à deux, la meilleure exactitude a été obtenue avec la combinaison Coagulase-Staphylase® (97,68%). Cependant, non seulement les combinaisons augmentent le coût de revient de l'identification de *S. aureus*, mais elles n'améliorent pas l'exactitude des tests pris isolément.

De la même façon, la combinaison de ces tests avec la fermentation du mannitol n'augmente pas la fiabilité de l'identification de *S. aureus* (données non présentées). La combinaison systématique des tests paraît donc peu utile en routine dans les laboratoires.

Sur la base de ces résultats, l'algorithme suivant peut être utilisé pour l'identification au laboratoire de *S. aureus* (figure 1).

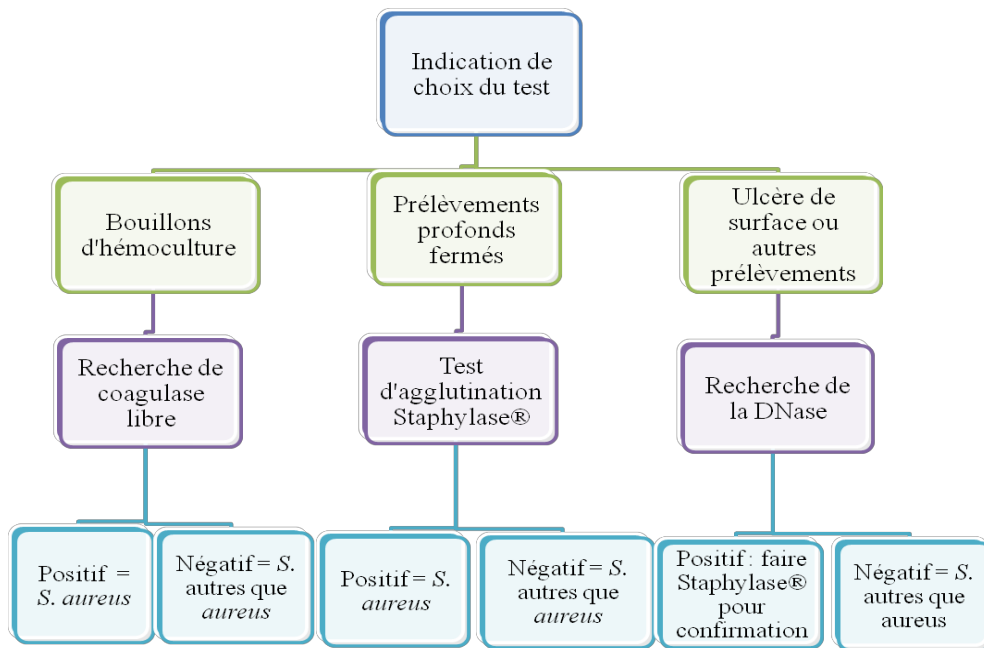


Figure 1 : Algorithme proposé pour l'identification de *S. aureus* dans les laboratoires de bactériologie

En effet, dans les bouillons d'hémoculture (suspicion de sepsis sévère), la recherche de la coagulase libre est proposée, car ce test dont les résultats peuvent être disponibles dès 4 heures ou même avant, peut aussi être effectué à partir d'une culture sur milieu liquide. En cas de positivité, une réponse rapide peut être donnée au clinicien pour une prescription d'une antibiothérapie appropriée. En revanche, en cas de négativité, on pourra attendre le lendemain pour une réponse définitive.

En cas de prélèvements profonds fermés, compte tenu de la relative urgence du tableau clinique, la Staphylase® pourrait être proposée en 1^{ère} intention lorsque des colonies sont isolées à partir de l'échantillon initial.

Pour les autres prélèvements (plaies, prélèvements génitaux), étant donné que l'obtention des résultats n'est pas très urgent, et que la DNase est un test peu onéreux, elle peut être proposée

en 1^{ère} intention. Néanmoins, compte tenu de la faible spécificité de la DNase, il serait indiqué de confirmer les résultats positifs à la DNase par l'un des autres tests phénotypiques, notamment par la Staphylase® car cette dernière est relativement moins chère, rapide et donne de meilleurs résultats. Cependant, le fait d'ajouter la Staphylase® entraîne nécessairement une hausse du coût de l'identification du germe. Ainsi en fonction de la prévalence de *S. aureus* dans la population étudiée, on peut discuter de l'intérêt ou non de réaliser cette identification en deux étapes ou de passer directement à la Staphylase® en 1^{ère} intention.

CONCLUSION

Bien qu'aucun des tests ne soit parfait, ils ont des caractéristiques variables et leur utilisation en routine dans les laboratoires devrait tenir compte de plusieurs facteurs dont l'urgence diagnostique et/ou les ressources disponibles dans le laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States, National Nosocomial Infections. Surveillance System. Crit Care Med. 1999; 27:887–892.
2. Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J; EARSS Spain spa-typing Group. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type 067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant (4)-Ia* and the efflux genes *msrA/msrB*. J Antimicrob Chemother. 2009; 63:21–31.
3. Franklin D, Lowy MD. *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med. 1998; 339: 520-32.
4. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004; 39:309–17.

5. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *VetMicrobiol.* 2009; 134:45-54.
6. Huebner J, Goldman DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *AnnuRev Med.* 1999; 50:223-36.
7. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2010 ; 9: 23.
8. Herrmann M, Abdullah S, Alabi A, Alonso P, Friedrich AW, Fuhr G, Germann A, Kern WV, Kremsner PG, Mandomando I, Mellmann AC, Pluschke G, Rieg S, Ruffing U, Schaumburg F, Tanner M, Peters G, von Briesen H, von Eiff C, von Müller L, Grobusch MP. Staphylococcal disease in Africa: another neglected 'tropical' disease. *Future Microbiol.* 2013; 8:17-26.
9. Agon IA, Olowo PP. Détermination des espèces et profils de résistance aux antibiotiques des souches de staphylocoques isolées d'échantillons pathologiques au CNHU-HKM de Cotonou. Mémoire de fin de formation en Licence Professionnelle ; EPAC; Abomey-Calavi, 2012, 53p.
10. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. *J Clin Microbiol.* 1992; 30 : 1654-60.
11. Weist K, Cimbal AK, Lecke C, Kampf G, Rüden H, Vonberg RP. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *J Med Microbiol.* 2006 ; 55 : 283-90.
12. Rossney AS, English LF, Keane CT. Coagulase testing compared with commercial kits for routinely identifying *Staphylococcus aureus*. *J ClinPathol.* 1990; 43: 246-52.
13. Kloos WE, Bannerman TL. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin MicrobiolRev.* 1994 ; 7 : 117-40.
14. Brun Y, Bes M. Méthodes diagnostiques des staphylocoques coagulase négatifs. *Méd Mal Infect.* 1990 ; 20 :16-23.