

Identification de *Staphylococcus aureus* : est-il possible de réduire le volume de plasma de lapin sans influencer la recherche de la staphylocoagulase libre ?

Bankolé H.S., Dougnon T.V., Fiogbé E.P., Amoussou A.N., Baba-Moussa L

¹Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.

²Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques, Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, 05 BP 1604 Cotonou, Bénin

*Auteur pour la correspondance : Dr Dougnon T. Victorien, Tél. 00 229 97 73 64 46, victorien88@hotmail.com

Original submitted in on 16th November 2013 Published online at www.m.elewa.org on 31st January 2014.

RESUME

Objectif : Le coût élevé du plasma lyophilisé de lapin utilisé dans le cadre de l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* constitue une des raisons d'inadéquation entre les dépenses et les recettes des laboratoires d'analyses biomédicales. Pour contourner cette difficulté, les techniciens de laboratoire ont recours à des méthodes d'identification moins coûteuses. La présente étude a eu pour objectif de déterminer dans un but économique le plus petit volume de plasma de lapin capable de révéler la présence de la staphylocoagulase libre.

Méthodologie et résultat : Pour ce faire, 25 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de différents échantillons biologiques et identifiées sur la base de la présence de la staphylocoagulase libre ont été utilisées. Ces souches ont été soumises à la recherche de la staphylocoagulase libre avec des volumes décroissants de 0,4 ml ; 0,3ml ; 0,2ml et 0,1ml de plasma lyophilisé de lapin. Toutes les souches bactériennes ont montré un résultat positif en 24 heures avec 0,2 ml comme plus petit volume. Le coagulum formé présente la même consistance que celui obtenu avec le volume de 0,5 ml indiqué par le protocole normal.

Conclusion et application de résultats : Au total, le volume de plasma de lapin peut-être donc réduit de 0,5 à 0,2 ml sans aucun impact sur la qualité du résultat. Dans le contexte de pays moins avancé comme le Bénin, cela est un premier jet en vue de l'efficacité des méthodes de diagnostic au laboratoire d'analyses biomédicales.

Mots-clés : staphylocoagulase libre, plasma de lapin, efficacité.

ABSTRACT

Objective: The high cost of lyophilized rabbit's plasma, which is used for the identification of *Staphylococcus aureus*, is one of the reasons of inadequacy between income and expenses of biomedical analysis laboratories. To circumvent this difficulty, laboratory technicians resort to less expensive methods of identification. This work was done to determine the lowest volume of rabbit's plasma that can reveal the presence of free staphylocoagulase.

Methodology and results: To do this, 25 strains of *Staphylococcus* isolated from different biological samples and identified based on the presence of free staphylocoagulase aureus. These strains were subjected to the research of the free staphylocoagulase with decreasing volumes of 0.4 ml, 0.3 ml, 0.2 ml and 0.1 ml of lyophilized rabbit plasma. All the bacterial strains showed a positive result in 24 hours with 0.2 ml as the smallest volume. The coagulum formed has the same consistency as the one obtained with the indicated volume of 0.5 ml by the normal protocol. In total, the volume of rabbit plasma may therefore be reduced from 0.5 to 0.2 ml without any impact on the quality of the result.

Conclusion and application of results: Thus, the volume of rabbit plasma can be reducing from 0.5 to 0.2 ml without any impact on the quality of the result. This is very interesting for the African laboratories which could improve the efficiency of techniques.

Keywords: Free staphylocoagulase, rabbit plasma, efficiency.

INTRODUCTION

Dans le cadre du diagnostic des infections en général et particulièrement des infections bactériennes, le laboratoire joue un rôle très important. En effet, il permet de mettre en évidence l'agent infectieux et de déterminer sa sensibilité aux antimicrobiens (Nounagnonhou et Amadou, 2008). Au nombre des bactéries d'infections les plus isolées, les staphylocoques dont *Staphylococcus aureus* occupe une place de choix (Agon et Olowo, 2012; Ahomontin et Somakpo, 2009). L'identification de *S. aureus* au laboratoire est basée, entre autres, sur la présence de la staphylocoagulase libre. Par rapport à la recherche de cette enzyme, on note, d'une part, une divergence dans la réalisation de la technique.

En effet, certains laboratoires utilisent la suspension de plasma de lapin et le bouillon de 24 heures à volume égal (Carbonnelle et al., 1987; Badédji et Moumouni Moussa, 2008; Ago et Akovi, 2009; Hanane, 2009). D'autres les utilisent dans les proportions respectives de 3/4 et 1/4 (Ganna, 2013). D'autre part, le plasma lyophilisé de lapin, non seulement, revient très cher aux laboratoires, mais il n'est pas toujours disponible sur le marché. C'est ce qui explique en partie, les difficultés d'identification de *S. aureus* observées dans certains laboratoires. Le présent travail vise alors, dans un but économique, à déterminer le volume minimal de plasma de lapin capable de révéler la présence de la staphylocoagulase libre.

MATERIEL ET METHODES

Matériel : Les travaux de laboratoire ont été réalisés au Service des Explorations Diagnostiques (S.E.D) du Bénin, sis au Ministère de la Santé. Le matériel biologique utilisé dans le cadre de cette étude est composé de 25 souches bactériennes provenant de divers échantillons biologiques. La présence de la staphylocoagulase libre a été recherchée chez ces souches bactériennes afin de confirmer l'espèce *S. aureus*. Du plasma lyophilisé de lapin, du bouillon cœur cerveau, etc. ont été entre autres utilisés.

Méthodes : La méthodologie, conformément à celle adoptée par Alidjinou (2008) s'est déroulée en trois étapes :

- La première étape a consisté à la préparation des milieux de culture suivant les consignes des fabricants et au réisolement des souches bactériennes sur milieu Chapman afin d'obtenir des souches jeunes,

- à la deuxième étape, le contrôle des souches bactériennes a été réalisé avec, entre autres :
 - o l'examen microscopique après la coloration de Gram qui a permis d'observer des cocci Gram positif en amas,
 - o la recherche de la catalase dont la positivité se traduit par une effervescence,
 - o la recherche de la DNase qui se fait après 18 à 24 heures d'incubation de la gélose DNase. La présence d'une zone claire autour des stries traduit la présence de DNase,
 - o la recherche de la staphylocoagulase libre où le réactif utilisé est le plasma lyophilisé de lapin en dehors du bouillon Cœur Cerveau de 24 heures

ensemencé. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon au plasma lyophilisé de lapin. Ce témoin n'est pas ensemencé.

La lecture a été faite toutes les 2 heures pendant les 6 premières heures et 24 heures après.

La réaction positive se traduit par la prise en masse du mélange au point où le tube peut être retourné. Toutes les 25 souches de *S. aureus* possèdent la staphylocoagulase libre.

- La troisième étape a consisté à la recherche du plus petit volume de plasma de lapin utilisable. Pour chacune des souches bactériennes, les volumes de 0,4 ml ; 0,3 ml ; 0,2 ml et 0,1 ml de plasma lyophilisé de lapin ont été utilisés. Pour ce faire, 4 tubes à hémolyse numérotés de 1 à 4 et contenant chacun 0,5 ml de bouillon de 24 heures ont été utilisés. Les différents volumes de plasma lyophilisé de lapin ont été introduits dans les différents tubes (figure 1) :

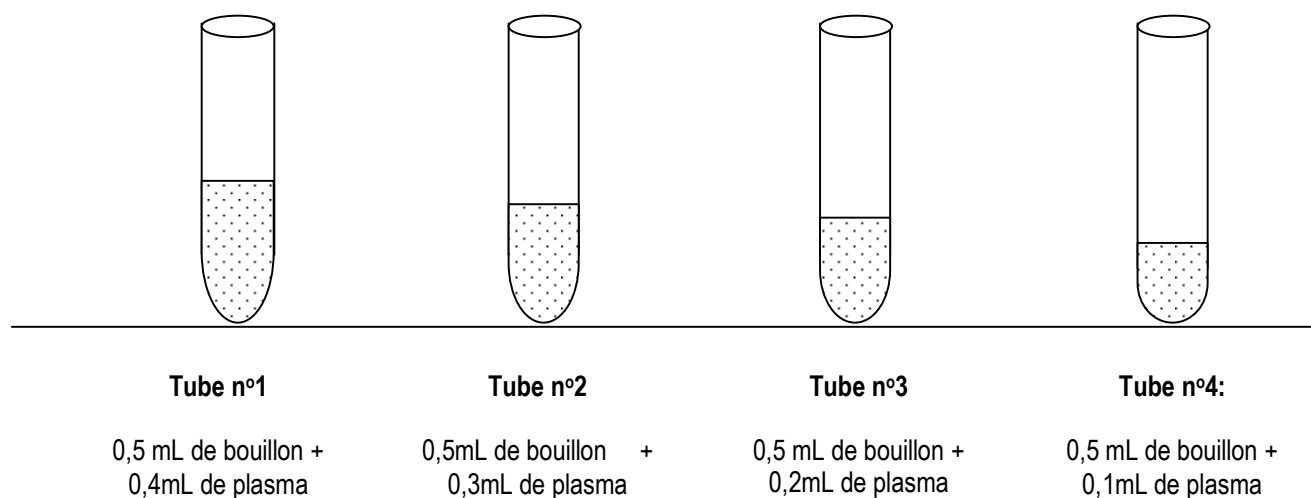


Figure 1 : Répartition du plasma lyophilisé de lapin dans les 4 tubes contenant chacun 0,5 mL de bouillon de 24 heures.

Les tubes ont été incubés à l'étuve à 37°C et la lecture effectuée toutes les 2 heures pendant les 6 premières

heures et 24 heures après pour observer la formation éventuelle de coagulum.

RESULTATS ET DISCUSSION

Plus de la moitié (64%) des souches de *S. aureus* provient des échantillons de pus (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des souches bactériennes en fonction de la nature des échantillons biologiques

Nature	Effectifs	Pourcentage (%)
Pus	16	64
Urines	08	32
Prélèvement de gorge	01	04
Total	25	100

Une souche bactérienne (4%) sur les 25 souches de *S. aureus* identifiées sur la base de la staphylocoagulase libre ne dispose pas de DNase (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des souches bactériennes en fonction des résultats de la DNase

DNase	Effectifs	Pourcentage(%)
Positif	24	96
Négatif	01	04
Total	25	100

Le plus petit volume de plasma lyophilisé de lapin qui a permis de mettre en évidence la staphylocoagulase libre chez toutes les 25 souches bactériennes est de 0,2ml (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la répartition des souches bactériennes en fonction des résultats de la recherche de la staphylocoagulase libre avec des volumes variés de plasma lyophilisé de lapin.

	Volume de plasma lyophilisé de lapin (ml)			
	0,4	0,3	0,2	0,1
Positif	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)	24 (96%)
Négatif	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (04%)
Total	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)

En 6 heures d'incubation, la majorité (68%) des souches bactériennes n'avait pas encore montré un résultat positif à la mise en évidence de la staphylocoagulase libre (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de la répartition des souches bactériennes en fonction du temps d'incubation pour la mise en évidence de la staphylocoagulase libre.

	Temps (heures)			
	0 à 2	0 à 4	0 à 6	0 à 24
Positif	01 (04%)	05 (20%)	08 (32%)	25 (100%)
Négatif	24 (96%)	20 (80%)	17 (68%)	00 (00%)
Total	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)	25 (100%)

Le présent travail a eu pour objectif général de déterminer, dans un but économique, le volume minimal de plasma de lapin capable de révéler la présence de la staphylocoagulase libre. Sur les 25 souches de *S. aureus* utilisées, 64% (16/25) provenaient des échantillons de pus. Ce chiffre corrobore les 62% obtenus par Hanane qui lui, a réalisé une étude sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* en 2009 en Algérie (Hanane, 2009). Ces pourcentages élevés s'expliqueraient par le fait que *S. aureus* est une bactérie pyogène par excellence (Alidjinou, 2008). La recherche de la DNase a révélé que 4% (1/25) des souches bactériennes étaient dépourvues de cette

enzyme. Ce résultat montre qu'il serait erroné d'asseoir l'identification de *Staphylococcus aureus* sur uniquement la recherche de la DNase. Il en est d'ailleurs de même avec la staphylocoagulase libre. Selon les travaux d'Alidjinou (2008), la recherche de la DNase est beaucoup plus utilisée dans les laboratoires parce qu'elle est de réalisation facile ; tandis que celle de la staphylocoagulase libre considérée comme la référence, est difficile. Menziès (1977), après une étude sur 1035 isolats de *S. aureus* a montré que la recherche de la DNase ne présente pas une bonne corrélation avec la recherche de la staphylocoagulase libre. Il convient alors, pour une bonne identification de *S. aureus*, d'utiliser nécessairement les deux tests. La

staphylocoagulase libre recherchée chez les 25 souches de *S. aureus* avec des volumes décroissants de plasma commercialisé de lapin, a montré que le volume de 0,2ml est le plus bas qui ait donné des résultats positifs avec la totalité des souches bactériennes utilisées. Avec un volume plus bas de 0,1ml de plasma commercialisé de lapin, les résultats n'étaient pas aussi loin des précédents. En effet, une seule souche sur les 25 (4%) avait donné une réponse contradictoire. Cette situation pourrait être due au fait que toutes les souches bactériennes n'auraient pas produit la même quantité de staphylocoagulase libre en

24 heures. Toutes les souches bactériennes utilisées, dans le cadre de cette étude, ont donné un résultat positif au test de la staphylocoagulase libre avec 0,2ml de plasma commercialisé de lapin. De plus, le coagulum formé a eu la même consistance que celui obtenu avec le volume de 0,5ml recommandé. Le volume de 0,2ml a donc été retenu comme le volume minimal de plasma commercialisé de lapin capable de révéler la présence de la staphylocoagulase libre. Par rapport au temps d'obtention du coagulum, 32% (08/25) des souches bactériennes ont répondu en 6 heures d'incubation.

CONCLUSION

Au terme de ce travail, il peut être déduit que le protocole technique de la recherche de la staphylocoagulase libre peut toujours être modifié. La diminution du volume recommandé de plasma de lapin, par le protocole habituel de cette recherche, n'a pas influencé le résultat à obtenir. La staphylocoagulase libre peut donc être mise en évidence chez *S. aureus*

en utilisant 0,2 ml de plasma de lapin commercialisé ou frais et le volume de bouillon de 24 heures toujours maintenu à 0,5 ml. Cela est très intéressant car la présente peut servir de base à une étude d'envergure nationale afin de sortir des conclusions sur des souches plus nombreuses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ago M. E., Akovi C. A., 2009. Problématique de la recherche de la coagulase libre. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin. 39p.
- Agon S. I. A., Olowo P. P. 2012. Détermination des espèces et profils de résistances aux antibiotiques des souches de Staphylocoques isolées d'échantillons pathologiques au CNHU-HKM. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin. 53p.
- Ahomontin H. L., Somakpo F. A., 2009. Utilisation du mannitol et production de la DNase chez les Staphylocoques. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin. 32p.
- Alidjinou E. K., 2008. Caractérisation des souches de *Staphylococcus* isolées dans les infections cutanées de l'enfant à Abidjan. Mémoire en vue de l'obtention du Certificat d'Études Spéciales de Bactériologie-Virologie. Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire/ UFR des Sciences médicales, Université de Cocody, Abidjan. Côte d'Ivoire. 52p.
- Badedji T., Moumouni Moussa R., 2008. Portage de bactéries responsables de toxi-infections alimentaires chez les manipulateurs d'aliments dans les cantines scolaires : cas des 8^e, 9^e, et 13^e arrondissement de la commune de Cotonou. Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur des Travaux (DIT). École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin. 68p.
- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues R., 1987. Les cocci Gram positif in Bactériologie médicale : techniques usuelles, édition SIMEP. France, 113 p.
- Ganna S. Y. A., 2013. Qualité microbiologique de la viande de porc vendue dans les gargotes de Cotonou. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. Haute école de commerce et de management (HECM). Bénin. 66p.
- Hanane A., 2009. Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline : Étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire pour

- l'obtention du diplôme de magister en microbiologie appliqué et biotechnologie microbienne. Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine. Algérie.94p.
- Menzies R. E., 1977."Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease test for identification of *Staphylococcus aureus*", *Journal of Clinical Pathology*, 30: 606-608.
- Nounagnonhou M., Amadou P. E. 2008. Problématique des colonies d'entérobactérie à reflet métallique sur la gélose EMB. Mémoire de fin de formation pour l'obtention du diplôme de licence professionnelle. École Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC). Bénin.24p.