

Article original

Caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la ville de Yaoundé (Cameroun)

Hortense Gonsu Kamga,^{1,4} Michel Toukam,¹ Zacharie Sando,³ Jean Marie Ndifo Ngamba,² Calixte Didier Mbakop,¹ and Dieudonné Adiogo¹

¹Département de Microbiologie, Hématologie et Maladies Infectieuses, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun

²Département de Microbiologie, École des Sciences de la Santé, Université Catholique d'Afrique Centrale, Yaoundé, Cameroun

³Département de Sciences Morphologiques et d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun

⁴Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé, Yaoundé, Cameroun

Adresser correspondances à Hortense Gonsu Kamga, hgonsu@gmail.com

Reçu le 14 février 2015 ; révisé le 14 avril 2015 ; accepté le 19 avril 2015

Droits d'auteur © 2015 Hortense Gonsu Kamga et coll. Ceci est un article en accès libre distribué sous les termes de la licence Creative Commons Attribution, ce qui permet une utilisation sans restriction, la distribution et la reproduction sur tout support, à condition que le travail original est correctement cité.

Résumé *Introduction.* L'objectif était de déterminer la proportion de souches de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) exprimant des mécanismes de résistance dans la ville de Yaoundé. *Méthode.* Il s'agissait d'une étude prospective et descriptive réalisée du 02 janvier au 30 juin 2012. Des souches de *P. aeruginosa* provenant de divers produits pathologiques de patients ont été identifiées à l'aide de la galerie API 20NE (Biomérieux). Pour les prélèvements urinaires, une cytologie était faite pour vérifier l'absence de cancer. La lecture interprétative de l'antibiogramme a été faite par diffusion sur gélose Mueller-Hinton selon CA-SFM 2011. *Résultats.* Au total 34 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées dont 85,3 % chez patients hospitalisés. Parmi ces souches, 41,2 % étaient isolées des urines, 23,5 % des hémocultures et 17,6 % des suppurations. Les urines montraient à l'examen cytologique des modifications inflammatoires aigües et l'absence de cancer. Le profil de résistance aux antibiotiques a montré une résistance élevée préférentielle des β -lactamines notamment à la ticarcilline (35,29 %). Concernant les β -lactamines, les phénotypes les plus observés ont été pour les 2/3 sauvages et 26,5 % pour les pénicillinases ; quant aux aminosides 94,1 % étaient de phénotype sauvage, tandis que 2/3 étaient de type sauvage pour les fluoroquinolones. *Conclusion.* Une association β -lactamines/aminosides ou β -lactamines/fluoroquinolones pourrait être préconisée afin de lutter contre toute infection à *P. aeruginosa*.

Mots Clés *Pseudomonas aeruginosa* ; phénotypes de résistance ; lecture interprétative

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est un bacille à gram-négatif non fermentaire ubiquitaire. Ce germe occupe la troisième place tous sites confondus dans la survenue des infections nosocomiales après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ainsi que de différentes lésions tissulaires conséquentes [1]. Ce germe produit naturellement une céphalosporinase inductible (AmpC), exprime constitutivement un système d'efflux (MexAB-OprM) et a une mauvaise perméabilité membranaire conférant une résistance naturelle

à de nombreux antibiotiques [2]. Les études de Cholley et coll. en 2010 [3] ont fait mention de la fréquence de plus en plus croissante des souches multirésistantes de *P. aeruginosa* à la quasi-totalité des antibiotiques excepté la colistine. Par ailleurs, il existe une relation possible entre la résistance bactérienne aux antibiotiques et le cancer dont on devrait tenir compte lors des études [4,5]. De ce fait, la détection de la résistance permettrait de prévenir ou de ralentir la diffusion des souches multirésistantes, de prévenir des lésions tissulaires importantes et d'optimiser le choix de l'antibiothérapie. Cette étude a eu pour but de déterminer la proportion de souches exprimant des mécanismes de résistance aux β -lactamines, aminosides et fluoroquinolones dans quelques institutions sanitaires de la ville de Yaoundé.

2. Méthodologie

Une étude descriptive et prospective a été réalisée du 02 janvier au 30 juin 2012 dans les laboratoires de bactériologie médicale de quelques institutions sanitaires (Centre Hospitalier et Universitaire ; Hôpital Général ; laboratoires privés) de la ville de Yaoundé. Un échantillonnage non probabiliste par quota a été effectué, et les souches ont été isolées de produits pathologiques de patients. L'identification biochimique a été réalisée à l'aide de la galerie API 20NE (BioMérieux SA, Lyon, France) et l'activité de 17 antibiotiques a été déterminée par la technique de diffusion des disques en milieu gélosé de Kirby Baur. La cytologie pour les prélèvements urinaires était pratiquée sur frottis après coloration selon la méthode de Papanicolaou, pour exclure la présence de cellules cancéreuses. Un contrôle de qualité des antibiotiques testés et des milieux de culture

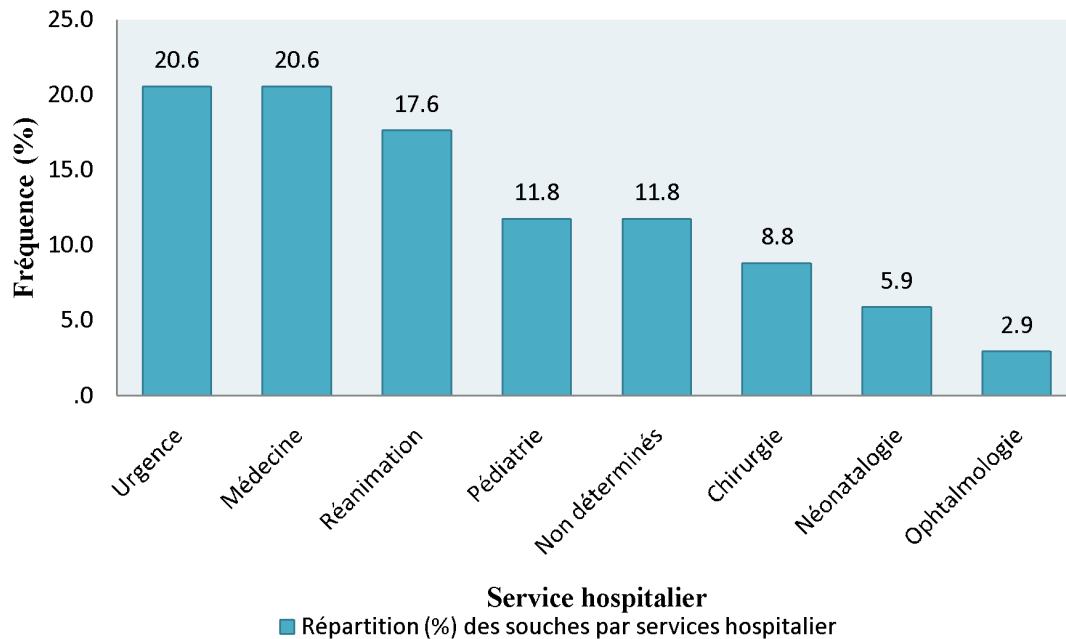


Figure 1 : Fréquence des souches de *P. aeruginosa* isolées par service hospitalier.

utilisés a été réalisé à partir de la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les critères d'interprétation ont été ceux recommandés par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2011) [6] et la lecture interprétative de l'antibiogramme a permis de ressortir les différents phénotypes exprimés par *P. aeruginosa* chez les β -lactamines (aztréonam (ATM, 30 μ g), céfépime (FEP, 30 μ g), cefsulodine (CFS, 30 μ g), ceftazidime (CAZ, 30 μ g), imipénème (IMP, 10 μ g), pipéracilline (PIP, 75 μ g), pipéracilline/tazobactam (PTZ, 75/10 μ g), ticarcilline (TIC, 75 μ g), ticarcilline/acide clavulanique (TCC, 75/10 μ g)), les aminosides (amikacine (AN, 30 μ g), gentamicine (GN, 15 μ g), nétilmicine (NET, 30 μ g), tobramycine (TOB, 10 μ g)) et les fluoroquinolones (ciprofloxacine (CIP, 5 μ g), lévofloxacine (LEV, 5 μ g), norfloxacine (NOR, 5 μ g)) [7, 8]. La détection des β -lactamases à spectre élargi a été facilitée sur l'antibiogramme par le rapprochement des disques d'acide clavulanique, de ceftazidime, d'aztréonam ou de céfépime [8]. Les autorisations de recherche du Président du comité national d'éthique et des Directeurs des différents hôpitaux et laboratoires ont permis de réaliser cette étude, et en retour les résultats des analyses leur ont été communiqués. Les logiciels utilisés ont été Microsoft Office 2007 et CSpPro 4.0. Le test de proportion a été effectué par le test de Chi carré à l'aide du logiciel SPSS 17.0. L'intervalle de confiance était de 95 %, la différence entre les variables données était statistiquement significative si $P < ,05$.

3. Résultats

Au total 34 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées de produits pathologiques de patients, dont l'urine 14 (41,2 %),

le sang 8 (23,5 %), les pus 6 (17,6 %), le liquide céphalo-rachidien 3 (8,8 %) et les liquides de ponction 2 (5,9 %). La cytologie des 14 produits urinaires montraient à la microscopie d'importantes modifications inflammatoires, avec des cellules transitionnelles réactives, les polynucléaires neutrophiles et l'absence de cellules cancéreuses. La majorité des isolats 23,0 (67,7 %) provenaient des formations sanitaires publiques. Les services des urgences médicales, de médecine générale et de réanimation médicale ont été les plus représentés comme l'indique la figure 1 avec des fréquences d'isolement respectives de 7 (20,6 %), 7 (20,6 %) et de 6 (17,6 %), suivis des services de pédiatrie 4 (11,8 %), de chirurgie 3 (8,8 %), de néonatalogie 2 (5,9 %) et d'ophtalmologie 1 (2,9 %).

Au regard de la figure 2, les souches *P. aeruginosa* ont présenté au moins une résistance pour la majorité des antibiotiques testés à l'exception de l'amikacine, de la céfépime et de la colistine. Des résistances ont été observées pour la ticarcilline 12,07 (35,5 %), la norfloxacine 11 (32,3 %), la cefsulodine 9 (26,5 %), la pipéracilline 8 (23,5 %) et la ticarcilline/acide clavulanique 6 (17,6 %).

La lecture interprétative de l'antibiogramme a permis de ressortir différents phénotypes de résistance (tableau 1). Le tableau 1 montre que la majorité des souches de *P. aeruginosa* ont été de phénotype sauvage dans chaque famille d'antibiotiques testée : β -lactamines : 21 (61,8 %) ; aminosides : 32 (94,1 %) ; fluoroquinolones : 23 (67,6 %). Les phénotypes de résistance acquise exprimés pour les β -lactamines ont été la production de pénicillinase 9 (26,5 %), l'hyperproduction de céphalosporinase 2 (5,9 %) et le déficit en porine D₂ 2 (5,9 %). En ce qui concerne les aminosides,

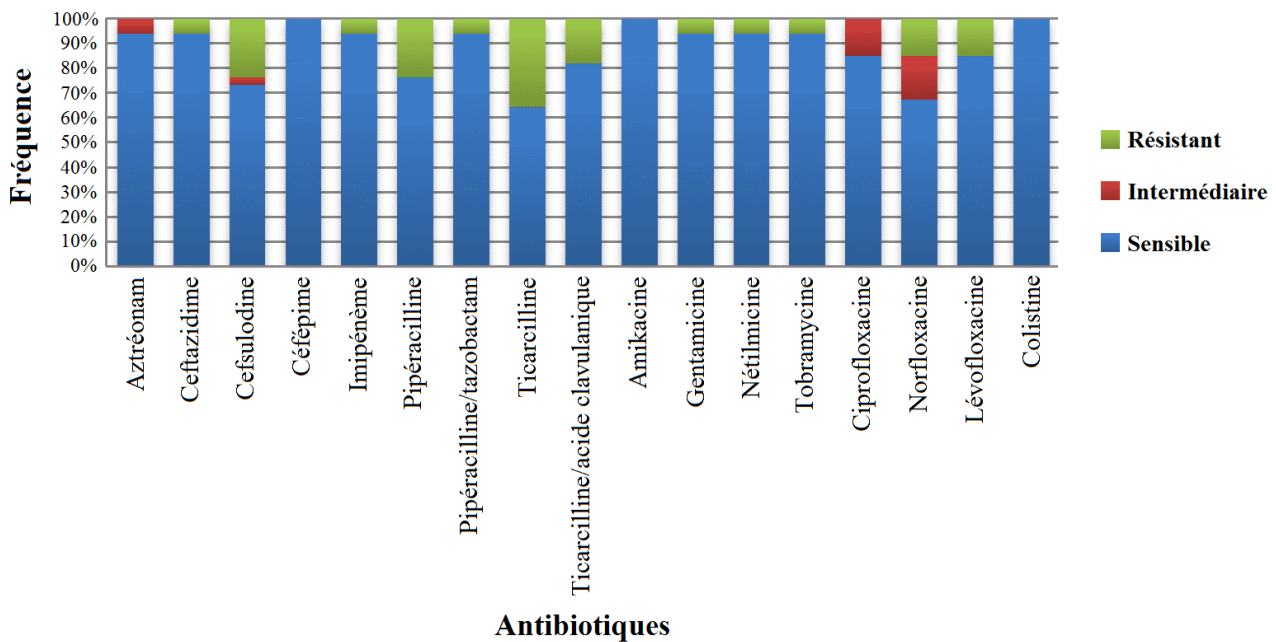


Figure 2 : Profil de sensibilité aux antibiotiques de *P. aeruginosa*.

Tableau 1 : Phénotypes de résistance des souches de *P. aeruginosa*.

| Souches de <i>P. aeruginosa</i> | Phénotypes de résistance aux β -lactamines | | | | | Phénotypes de résistance aux aminosides | | Phénotypes de résistance aux fluoroquinolones | | |
|---------------------------------|--|------|------|------|-------------------------------|---|------|---|-------------|---------------------------|
| | SAUV | PBN | PHN | Case | Déficit en Opr D ₂ | SAUV | GTNt | SAUV | <i>GyrA</i> | <i>GyrA</i> + <i>ParC</i> |
| Effectifs | 21 | 5 | 4 | 2 | 2 | 32 | 2 | 23 | 6 | 5 |
| Pourcentage (%) | 61,8 | 14,7 | 11,8 | 5,9 | 5,9 | 94,1 | 5,9 | 67,6 | 17,6 | 14,7 |

SAUV : phénotype sauvage ; PBN : pénicillinase bas niveau ; PHN : pénicillinase haut niveau ; Case : céphalosporinase hyperproduite ; GTNt : gentamicine-tobramycine-nétilmicine résistant.

le phénotype gentamicine-tobramycine-nétilmicine résistant a été observé 2 (5,9 %). Pour ce qui est des fluoroquinolones, les phénotypes par modification de la cible affectant la *GyrA* seule 6 (17,6 %) ou associée à la *ParC* 5 (14,7 %) ont été observés.

4. Discussion

P. aeruginosa est un pathogène responsable d'infections nosocomiales [1]. Étant donné la possibilité d'une relation entre le cancer et la résistance bactérienne aux antibiotiques [4,5], nous avons par des examens cytologiques exclu les patients souffrant de cancer. Au Cameroun, quelques études ont montré que *P. aeruginosa* représente un taux de prévalence de 25,5 % [9,10]. Ce agent pathogène possède une très grande plasticité génétique, facilitant l'acquisition d'éléments mobiles codant pour des mécanismes de résistance provenant d'autres bactéries [11]. Ainsi le taux élevé de résistance observé pour la ticarcilline, la cefsulodine, la pipéracilline, la ticarcilline/acide clavulanique et la norfloxacine pourrait se justifier par la formation de réservoir de gènes de résistance à ces antibiotiques par ces souches. De plus

en appréciant les données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne [12], il s'est avéré que nos résultats étaient comparables pour les antibiotiques tels que la ticarcilline (40 %), la ciprofloxacine (20 %–35 %), la pipéracilline (20 %), les aminosides (10 %–20 %), et l'imipénème (5 %–15 %). Le taux de résistance aux antibiotiques a été proportionnel aux phénotypes de résistance observés.

Phénotype pénicillinase : la production de cette enzyme entraîne une résistance fréquente aux carboxypénicillines, pouvant être associée aux uréidopénicillines et à la cefsulodine, lorsqu'elle est de bas niveau. En cas de production de haut niveau, la résistance s'étendrait jusqu'à l'acide clavulanique, tandis que les autres β -lactamines conservent leur activité. Il convient donc de signaler que la résistance à la ticarcilline seule est un bon indicateur de la présence de phénotype « pénicillinase ». La cefsulodine permet d'indiquer la production de bas niveau, la production de haut niveau étant matérialisée par la restauration de l'activité de la ticarcilline par l'acide clavulanique [2].

Phénotype céphalosporinase hyperproduite : cette enzyme inhibe l'activité de la plupart des β -lactamines

à l'exception de l'imipénème [2]. Dans ce profil, la ceftazidime est toujours moins active que l'aztréonam. L'activité de la céfépime n'a pas été inhibée par cette enzyme, ce qui s'explique par le fait que l'hyperproduction de la céphalosporinase a été établie avec un effet antagoniste léger entre l'imipénème et les autres β -lactamines.

Phénotype déficit en Opr D₂ : c'est une résistance non enzymatique caractérisée par une résistance sélective à l'imipénème. L'utilisation parfois abusive d'antibiotiques à large spectre, comportant des carbapénèmes, constitue un facteur de risque pour la sélection de ce mécanisme de résistance [1].

Phénotype GTNt résistant : il se caractérise par la production d'enzymes N-acétyltransférases, AAC (6')-II, qui catalysent l'acétylation de la fonction $-NH_2$. La modification d'AAC participe à la résistance de cette espèce pour la plupart des aminosides utilisés en thérapeutique [3]. Les deux mécanismes de résistance les plus fréquemment impliqués sont l'imperméabilité à tous les aminosides et la synthèse d'AAC (6')-II.

Mutations des gènes GyrA seuls ou associés à ParC : c'est un mécanisme de résistance par altération de la cible. Les mutations dans les *Quinolones Resistance-Determining Region* (QRDR) des régions des gènes *gyrA* et *gyrB* (ADN gyrase) et des gènes *ParE* et *ParC* (topoisomérase IV) affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles. Chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous-gènes *gyrB* et *ParC*, *gyrB* et *ParE*, et *ParC* est peut fréquente. Par contre les mutations dans le gène *gyrA* seul sont plus fréquentes, et lorsqu'il est associé au gène *ParC*, cela conduit à de très hauts niveaux de résistance [3]. Malgré tous les résultats obtenus in vitro, la ciprofloxacine est la peine d'induire un haut niveau de résistance [7].

5. Conclusion

Des antibiotiques tels que la céfépime, l'imipénème, la ticarcilline/acide clavulanique, la pipéracilline/tazobactam, l'amikacine et la ciprofloxacine peuvent être recommandés lors d'une infection à *P. aeruginosa*, mais une association β -lactamines/aminosides ou β -lactamines/fluoroquinolones serait plus efficace. Les phénotypes bactériens les plus résistants, souvent méconnus, font partis intégrante de notre contexte en pratique de bactériologie clinique, de ce fait il serait essentiel de caractériser systématiquement les résistances exprimées par des isolats vis-à-vis des antibiotiques.

Conflit d'intérêt Les auteurs déclarent l'absence de tout conflit d'intérêt.

Bibliographie

[1] I. Lahlou Amine, H. Salord, Y. Gille, C. Roure, S. Tigaud, T. Bajou, et al., *Pseudomonas aeruginosa* et résistance isolée à l'imipénème : clone émergent en milieu hospitalier ?, Les Technologies de Laboratoire, 3 (2008), 4–9.

[2] G. Vedel, *Simple method to determine beta-lactam resistance phenotypes in Pseudomonas aeruginosa using the disc agar diffusion test*, J Antimicrob Chemother, 56 (2005), 657–664.

[3] P. Cholley, *Analyse génétique des souches multi-résistantes de Pseudomonas aeruginosa dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux*, PhD thesis, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 2010. Consulté le 04 février 2012, tiré de <http://indexation.univ-fcomte.fr/nuxeo/site/esupversions/f1f7d6cc-0378-4092-81b4-dbe512b48e4f>.

[4] J. Klustersky and A. Georgala, *Strategies for the empirical management of infection in cancer patients with emphasis on the emergence of resistant gram-negative bacteria*, Crit Rev Oncol Hematol, 92 (2014), 268–278.

[5] C. Gudiol and J. Carratalà, *Antibiotic resistance in cancer patients*, Expert Rev Anti Infect Ther, 12 (2014), 1003–1016.

[6] CA-SFM, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2012.

[7] M. Weber, *L'antibiogramme en pratique courante*, in Précis de bactériologie clinique, J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, and P. Riegel, eds., Editions Eska, Paris, 2nd ed., 2007, 609–634.

[8] P. Nordmann, *β -lactamines et Pseudomonas aeruginosa*, in Antibiogramme, P. Courvalin, R. Leclercq, and E. Bingen, eds., Editions Eska, Paris, 2nd ed., 2006, 163–177.

[9] R. N. Ndip, H. M. Dilonga, L. M. Ndip, J. F. Akoachere, and T. Nkuo Akenji, *Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram*, Trop Med Int Health, 10 (2005), 74–81.

[10] J.-P. Assam Assam, *Etude de la fréquence de Pseudomonas aeruginosa dans les infections nosocomiales et profil de résistance aux antibiotiques : cas de HGY et HGOPY*, mémoire de master 2, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun, 2008.

[11] N. Mesaros, P. Nordmann, P. Plésiat, M. Roussel-Delvallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, et al., *Pseudomonas aeruginosa : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire*, Antibiotiques, 9 (2007), 189–198.

[12] ONERBA, Rapport d'activité 2007. Consulté le 21 juin 2012, tiré de http://www.onerba.org/IMG/pdf/onerba_rapport2007.pdf.