

# ***Staphylococcus aureus* chez le lapin de chair en France : étude sur 355 souches, virulence (méthode Hermans), antibiorésistance et SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline)**

B. LE NORMAND<sup>1</sup>, S. BOUCHER<sup>2</sup>

1. SCP Fouqué-Gounot-Le Normand-Le Page-Donon, Clinique Vétérinaire des Marches de Bretagne, 35460 St Brice en Coglès
2. Labovet Conseil (Réseau Cristal) – BP 539 – 85505 les Herbiers cedex.

**Résumé :** Une étude rétrospective portant sur 355 souches de *Staphylococcus aureus* du lapin isolées sur animaux ou semences apportées à l'analyse a permis de mettre en évidence une très large majorité de souches de basse virulence (LV). L'étude des diamètres d'inhibition sur gélose pour la céfoxitine montre qu'une des 212 souches testées est résistante à cet antibiotique (un critère permettant d'identifier les SARM), quatre autres étant de statut intermédiaire ; des analyses complémentaires (recherche de gène *mecA*) sont nécessaires avant de les qualifier plus précisément. Les diamètres d'inhibition pour 4 antibiotiques montrent que les niveaux de sensibilité sont les suivants : 93,7% des souches sont sensibles à la tiamuline, 88,8% à l'enrofloxacin, 49% à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole et 32,9% à la tulathromycine. Enfin, les souches LV semblent en général plus résistantes que les souches de haute virulence (HV).

**Abstract: *Staphylococcus aureus* in French rabbitries: survey on 355 strains, virulence type (Herman's method), antimicrobial resistance and MRSA.**

A retrospective survey dealing with 355 *Staphylococcus aureus* strains isolated on animals or semen provided for analysis allowed to highlight a very large majority of low virulence strains (LV). The study of inhibition zone on agar for cefoxitin shows that one strain is resistant to this antimicrobial (criteria for MRSA strains), four others strains has to be further analyzed to know if they are MRSA (gene *mecA*). Inhibition zones for 4 antimicrobials exhibit following antimicrobial susceptibilities : 93,7% for tiamulin, 88,8% for enrofloxacin, 49% for trimethoprim-sulfaethoxazole and 32,9% for tulathromycin ; LV strains seem to be in general more resistant than HV strains.

**Mots clés :** *Staphylococcus aureus*, staphylocoque doré, SARM, *Oryctolagus cuniculus*, lapin, céfoxitine, méticilline

## **Introduction**

La staphylococcie est une maladie majeure du lapin (Boucher et al 2009, Boucher et Nouaille 2013) ; les travaux de Hermans et col. (2001) puis de Vancraeynest et col. (2006 et 2007) ont permis de démontrer l'existence d'un clone pathogène de *Staphylococcus aureus* qui détermine deux formes épidémiologiques de la maladie :

- souches de Haute virulence (HV) (Devriese et al. 1996) : ces souches diffusent rapidement dans un élevage contaminé (forme épizootique), sont bien adaptées au lapin et entraînent des pertes importantes, notamment parmi le troupeau de lapines de renouvellement sur les premiers cycles de production ;

- souches de Basse Virulence (LV) : ces souches ont un pouvoir de contamination individuel à la faveur d'un affaiblissement de l'animal ou de voies de contamination facilitées (maux de pattes par exemple).

Nous avons souhaité faire un travail de synthèse *a posteriori* sur les souches isolées en élevage entre 2012 et début 2015 afin d'objectiver le nombre de souches HV rencontrées sur le terrain, leur niveau de résistance aux principales familles d'antibiotiques et la possible existence de *Staphylococcus aureus*

résistant à la méticilline (SARM) chez le lapin. Les souches de SARM sont d'une importance particulière en santé publique : la méticilline est utilisée à partir de 1959 et dès 1961, des souches résistantes sont décrites au Royaume-Uni (Enright *et al.*, 2002). Ces SARM sont résistants aux  $\beta$ -lactamines, famille d'antibiotiques qui inclut les pénicillines et les céphalosporines, largement utilisées en médecine humaine pour de nombreuses infections. Ces SARM sont responsables de maladies nosocomiales et des souches « communautaires » circulent depuis une dizaine d'années. Ils colonisent sporadiquement les animaux de compagnie, les chevaux et parfois les animaux d'élevage (porc, bovins, volailles), souvent à partir d'une contamination humaine. Ces SARM sont donc une menace potentielle réelle tant pour l'homme que pour les animaux et leur présence est surveillée.

F. Agnoletti *et al* (2014) ont décrit des souches de SARM isolées dans un élevage de lapins en 2013 ; le typage moléculaire des souches isolées semble orienter vers une origine porcine, espèce dans laquelle ces souches circulent de façon asymptomatique.

Enfin, nous avons étendu notre étude sur l'antibiorésistance des staphylocoques dorés du lapin à 4 antibiotiques représentant 4 familles différentes,

afin de visualiser le niveau de sensibilité et de comparer les souches LV et HV sur ce critère.

## 1. Matériel et méthodes

L'étude est réalisée avec les fichiers d'analyses effectuées depuis 2012, sur des animaux issus de maternité, sur des animaux en phase de croissance, ou encore sur des lots de semence pure avant dilution.

Les animaux sont principalement des lapins de chair issus des Pays de Loire, de Bretagne, de Normandie, de la région Nord Pas de Calais et d'Auvergne.

### 1.1. Matériel

Nous avons retenu pour cette étude uniquement les souches isolées de prélèvements qui ne pouvaient pas avoir été lourdement contaminés par des germes d'environnement : nous avons ainsi éliminé tous les prélèvements effectués sur les lésions cutanées du type pododermatite par exemple.

Les examens bactériologiques, les antibiogrammes et les PCR multiplexes ont été réalisés par les laboratoires Labovet Analyses (Les Herbiers) sur 294 souches (toutes les souches isolées ont été retenues) et Labofarm (Loudéac) sur 61 souches sélectionnées (les souches ont été choisies au hasard chaque année afin de limiter le coût des tests vis-à-vis de la céfoxitine). Ces laboratoires sont adhérents du Resapath. Les fichiers ont fait l'objet d'une exploitation commune sans distinction géographique.

Le typage des souches est réalisé par PCR multiplexe selon la méthode décrite par Hermans et al. (2000). Les souches LV portent uniquement le gène *femA*, caractéristique de *Staphylococcus aureus*. Les souches HV sont positives pour les gènes *femA*, *flank*, *selm* et *bbp*, gènes ou cluster de virulence des staphylocoques du lapin. Un certain nombre de souches sont dites atypiques (AT) car elles portent le gène *femA* et au plus deux autres gènes parmi les trois restants.

### 1.2. Antibiorésistance

L'étude des antibiogrammes réalisés en routine a porté sur les antibiotiques suivants :

- ceftiofur (céphalosporine-βlactamine)
- céfoxitine (céphalosporine-βlactamine)
- tiamuline (pleuromutiline)
- triméthoprime-sulfaméthoxazole (tmp-sulfa) (sulfamide)
- enrofloxacin (fluoroquinolone)
- tulathromycine (macrolide)

Les antibiogrammes sont réalisés suivant les bonnes pratiques édictées par le groupe vétérinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) selon la norme AFNOR NF U147-107 - 2013. Les géloses, sur lesquelles on déposera au final des buvards imprégnés d'une dose donnée d'antibiotique, sont ensemencées par inondation par un inoculum issu d'une culture âgée de 18/24h dosé à 0,5 McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/ml) en solution saline (0,9 % NaCl). Elles sont incubées

pendant 18/24 heures en atmosphère normale à 35/37°C.

La résistance à la céfoxitine (céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération) est considérée comme un critère de dépistage déterminant la résistance à toutes les βlactamines ; ainsi, la résistance à la céfoxitine (disque chargé à 30 µg) est reconnue comme critère de dépistage des souches de SARM (complété souvent par la recherche du gène *mecA*) .

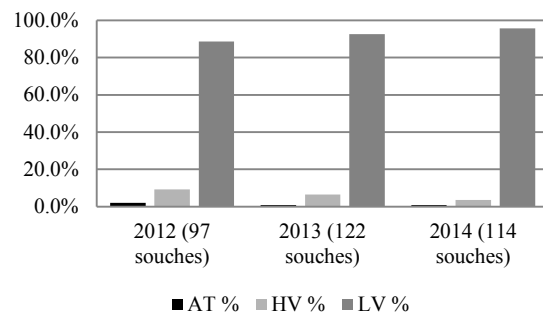
## 2. Résultats

### 2.1. Types de souches et organes

L'étude porte sur 355 souches isolées entre 2012 et 2015 dont 343 typées par PCR multiplexe : 316 sont LV (92,1%) et ne portent pas de gène de virulence spécifique, 23 sont HV (6,7%) et ont un génotype comportant les 3 gènes ou cluster de virulences spécifiques des souches virulentes chez le lapin, et 4 sont AT (1,2%) soit porteuses de moins de 3 gènes ou cluster de virulence spécifiques.

Sur les trois années complètes 2012, 2013 et 2014 (voir figure 1), la tendance des isolements est baissière sur les staphylocoques HV et haussière sur les staphylocoques LV (en 2015, le nombre de souches est trop faible pour pouvoir l'exploiter correctement).

**Figure 1. Typage par PCR multiplexe de la virulence de *S. aureus* isolé en 2012, 2013 et 2014 sur semence ou animaux apportés à l'analyse.**



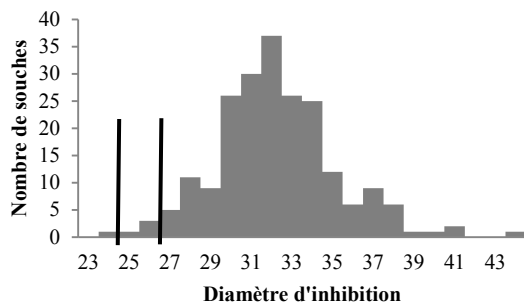
Les principaux isolements sont effectués à partir des abcès, des cornes utérines et des poumons ; 10% des souches isolées d'abcès sont HV, alors que 3 et 4% sont HV quand les prélèvements sont faits respectivement dans les cornes utérines et les poumons.

### 2.2. Diamètres d'inhibition sur gélose

Le diamètre d'inhibition d'une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à la céfoxitine a été fixé à un minimum de 25 mm. Dans l'édition 2015 du guide des recommandations du CASFM vétérinaire, les diamètres critiques d'inhibition de la céfoxitine pour *Staphylococcus aureus* sont de 25 et 27 mm. Les souches dont la croissance est inhibée sur un diamètre inférieur à 25 mm sont résistantes. Dans notre étude, 1 des 212 souches testées est résistante à la céfoxitine (figure 2).

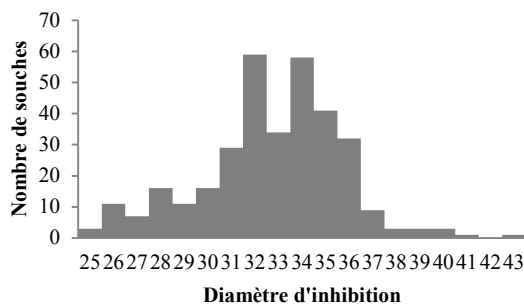
Elle n'est pas forcément classée parmi les SARM. Cependant, elle mériterait une étude complémentaire comme une recherche du gène *mecA* par PCR (principale cause de résistance chez *S. aureus*). 207 souches ont un diamètre d'inhibition au moins égal à 27 mm, et sont donc sensibles à la céfoxitine et 4 souches ont un diamètre compris entre 25 et 27 mm et sont considérées comme intermédiaires à la céfoxitine.

**Figure 2. Diamètres d'inhibition de la céfoxitine pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



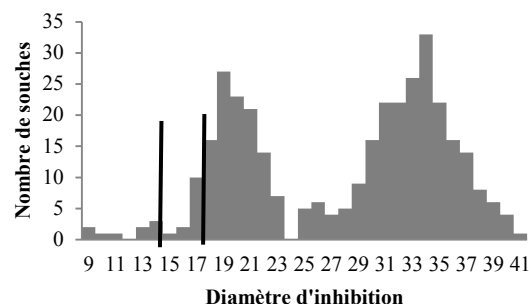
Le ceftiofur n'est pas une molécule de référence pour la résistance aux  $\beta$ -lactamines ; cependant, les 337 souches de staphylocoques dorés testées sont sensibles à cet antibiotique (figure 3) dont le diamètre critique supérieur est de 21 mm.

**Figure 3. Diamètres d'inhibition du ceftiofur pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



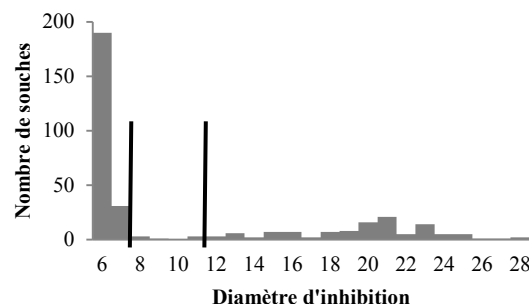
La même étude (349 souches testées) sur la tiamuline (figure 4) fait ressortir trois populations de souches, l'une bien sensible, l'autre moins sensible et la troisième résistante à l'antibiotique. Globalement, 327 souches (93,7%) sont sensibles à la tiamuline, 13 (3,7%) sont considérées comme intermédiaires (diamètre d'inhibition d'au moins 15 mais inférieur à 18 mm) et 9 (2,6%) sont résistantes.

**Figure 4. Diamètres d'inhibition de la tiamuline pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



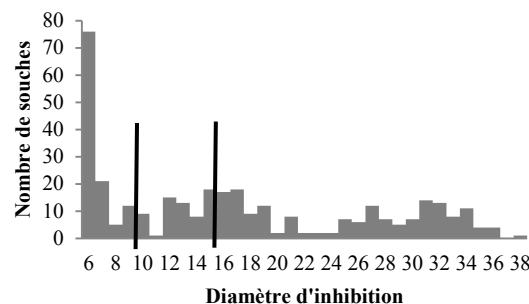
Les diamètres d'inhibition pour la tulathromycine (représentant récent de la famille des macrolides) montrent une population importante de souches « résistantes contact » (souches poussant au contact du disque) : parmi les 221 souches résistantes (65%) 190 sont résistantes contact (diamètre de 6 mm) ; 112 souches (32,9%) de staphylocoques seulement sont sensibles à cet antibiotique (diamètre  $\geq 12$  mm, figure 5) ; de ce fait, il est déconseillé d'utiliser cette molécule en première intention en cuniculture.

**Figure 5. Diamètres d'inhibition de la tulathromycine pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



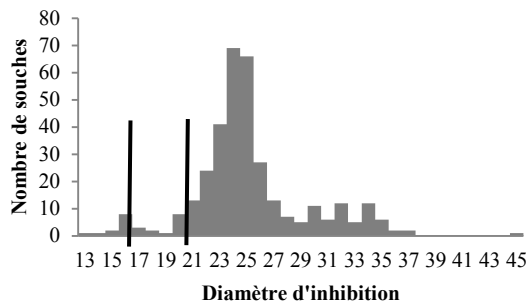
Pour l'association tmp-sulfaméthoxazole (figure 6), les souches semblent s'étaler sur des diamètres d'inhibition variables, mais trois populations semblent se distinguer : un groupe de souches résistantes contact, une population de souches plutôt résistantes ou à faible sensibilité, et une population de souches sensibles (171 souches, soit 49%) (diamètre  $\geq 16$  mm).

**Figure 6. Diamètre d'inhibition de l'association tmp-sulfa pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



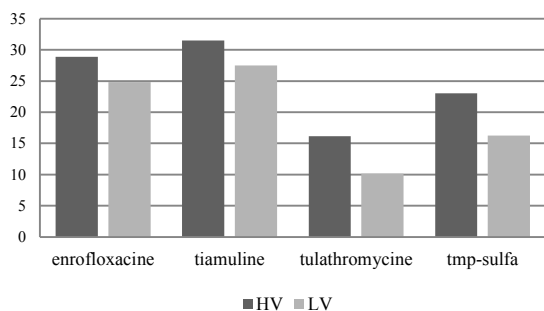
Enfin, l'enrofloxacin montre également trois sous-populations (figure 7), avec 309 souches sensibles (88,8%), 27 de souches intermédiaires (diamètre  $\geq 17$  et  $< 22$  mm, 7,8%) et 12 souches résistantes (3,4%).

**Figure 7. Diamètre d'inhibition de l'enrofloxacin pour *S. aureus* isolé chez le lapin.**



**2.3. Diamètres d'inhibition et virulence des souches**  
La comparaison des diamètres d'inhibition entre les souches HV et les souches LV ne montre aucune différence significative pour les céphalosporines. La figure 8 compare les diamètres d'inhibition des souches HV (28 souches) et LV (305 à 313 souches suivant les molécules) : ces dernières (même si la comparaison est difficile du fait du faible nombre de souches HV) présentent globalement des diamètres d'inhibition plus faibles et donc une plus grande résistance.

**Figure 8. Diamètres d'inhibition des souches de staphylocoques dorés de lapins HV et LV pour 4 antibiotiques.**



Pour la céfoxitine, la souche résistante est de type LV et, parmi les 4 souches intermédiaires, 3 sont LV et 1 est HV.

### 3. Discussion

Notre travail a porté sur les staphylocoques invasifs qui ont gagné les organes internes du lapin. Il apparaît ici que les abcès et les organes fermés sont les prélèvements de choix pour isoler un staphylocoque réputé pathogène en élevage en dehors du simple portage. La bactérie a une capacité d'invasion de l'organisme. Les facteurs de sensibilité doivent ensuite être recherchés pour les lapins d'élevages touchés de façon récurrente par des staphylococcies provoquées par des souches LV.

Le conseil de ne pas refaire de typage tous les ans pour les élevages contaminés par une souche HV, mais de privilégier la réalisation d'antibiogrammes réguliers, explique probablement le pourcentage assez restreint de souches HV (par ailleurs en diminution ces dernières années). Il est en effet judicieux de typer la souche de staphylocoque lorsque les sensibilités aux antibiotiques changent.

Nous avons mis en évidence une souche de staphylocoque doré résistante à la céfoxitine selon les dernières recommandations du CASFM vétérinaire. Il serait alors utile de rechercher les gènes de résistance à la méticilline pour savoir si ce staphylocoque est classé ou non parmi les SARM. Quatre des 212 souches testées nécessitent des investigations supplémentaires car elles ont un diamètre d'inhibition inférieur à 27 mm et supérieur ou égal à 25 mm (souches dites intermédiaires). En particulier, nous comptons – afin d'appuyer nos résultats – tester la présence ou non du gène *mec A* sur toutes ces souches (critère moléculaire complémentaire à l'antibiogramme pour le classement des SARM).

Enfin, les souches de *Staphylococcus aureus* LV prises en compte dans notre étude semblent montrer plus de résistances que les souches HV. Certes, le nombre de souches n'est pas comparable mais on peut aussi supposer que les souches LV sont plus souvent des souches commensales ou d'environnement (ce que ne sont pas les souches HV ayant acquis des gènes de virulences propres à l'espèce lapin) et que de ce fait elles sont plus fréquemment en contact avec un nombre varié de bactéries pouvant leur transmettre des gènes de résistance à des antibiotiques parfois non utilisés en cuniculture.

### Conclusion

Notre étude a montré l'existence de souches résistantes à la céfoxitine dans la population de staphylocoques de lapins français étudiée. Il reste à étudier ces souches pour savoir si elles sont ou non classées parmi les SARM. S'il s'avère que ce sont des SARM, il sera intéressant de faire une enquête épidémiologique pour connaître leur provenance. La sensibilité des staphylocoques de notre étude à différents antibiotiques est assez variable et montre clairement qu'il n'est pas raisonnable d'utiliser la tulathromycine en première intention sur des cas de staphylococcie alors que la tiamuline est un bon candidat. Dans un élevage au passé bactériologique mal ou non connu, un antibiogramme doit être réalisé impérativement avant la prescription étant donné les degrés de résistances variés des différentes souches étudiées. Les souches HV paraissent plus sensibles aux antibiotiques étudiés que les souches LV (mais ceci reste à confirmer sur des effectifs plus importants).

## Remerciements

Le Dr Jean-Yves Madec et Marisa Haenni (Anses) pour leur relecture attentive et leurs conseils avisés.  
Marie-André Briffaud (et toute son équipe), responsable du laboratoire Labovet Analyses pour son travail, ses conseils et son écoute constants.  
L'ensemble du personnel du laboratoire Labofarm pour leur souci permanent de répondre aux problématiques pratiques des élevages et de leur encadrement sanitaire.

## Références

- AFNOR NF U147-107 Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé Décembre 2012
- AGNOLETTI F., MAZZOLINI E., BACCHIN C., BANO L., BERTO G., RIGOLI R., MUFFATO G., COATO P., 2014. First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Vet. Microbiol.* 170:172-77.
- BOUCHER S., 2009. « examens complémentaires en bactériologie chez les petits mammifères p 75 - 76. *In* Examens complémentaires chez les NAC. Editions du Point Vétérinaire, Rueil Malmaison.
- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2013. Maladies des lapins, édition France Agricole Paris 3<sup>e</sup> édition, p 84 – 91.
- DEVRIESE, L.A., HENDRICKX, W., GODARD, C., OKERMAN, L., HAESBROUCK, F., 1996. A new pathogenic *Staphylococcus aureus* type in commercial rabbits. *Zentralbl Veterinarmed B* 43(5):313–5.
- ENRIGHT M.C., ROBINSON D.A., RANDLE G., FEIL E.J., GRUNDMANN H., SPRATT B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, 99 :7687-92.
- HERMANS, K., DE HERDT, P., BAELE, M., DEVRIESE, L.A., 2001. Secreted antigens as virulence-associated markers in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet. Microbiol.*, 81(4):345-52.
- Hermans, K., Haesebrouck, F., Vaneechoutte, M., Devriese, L.A., Godard, C., De Herdt, P., 2000. Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 72, 311–319.
- LE NORMAND B., LIPINSKA U., WILDEMAUVE C., FRANÇOIS P., AGNOLETTI F., LE GUENNEC J., 2009. Etude de la staphylococcie en élevage de lapins : persistance clinique au sein de l'élevage et génotypage des souches isolées. 13<sup>èmes</sup> Jour. Rech. Cunicole, Le Mans, 213-234, ITAVI Ed., PARIS.
- VANCRAYNEST D., 2006. Phenotypic and genotypic characterization of *staphylococcus aureus* strains from rabbits. Thèse de doctorat Vétérinaire University of Gent. 172 pages.
- VANCRAYNEST D., HAESBROUCK F., HERMANS K., 2007. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Vet. Microbiol.* 121:368-72.