



## CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BETA-LACTAMASES DE SOUCHES D'ENTEROBACTERIES MULTIRESSISTANTES ISOLEES DE DIVERS PRODUITS PATHOLOGIQUES.

SARR Habibou.<sup>1,2</sup>, KA Roughyatou<sup>1,3</sup>, NIANG Ahmet Aissatou<sup>1,2</sup>, DIA Mouhamadou Lamine<sup>1,2</sup>, DIEYE Baidy<sup>2</sup>, DIOP Amadou<sup>2</sup>, DIAGNE Rokhaya<sup>3</sup>, DIALLO Fatoumata<sup>2</sup>, SOW Ahmad Iyane<sup>1,2</sup>

(1) Laboratoire de Bactériologie – Virologie du CHNU de FANN Dakar – Sénégal

(2) Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontologie, Dakar, Sénégal

(3) UFR des Sciences de la Santé, Université de Thiès

**Auteur correspondant :** Habibou SARR / +221 77 903 11 94 / [habibou10@live.fr](mailto:habibou10@live.fr)

### RESUME

**Introduction :** Les entérobactéries constituent les principales causes d'infections bactériennes. Ce sont des Bactéries Multirésistantes (BMR) fréquentes par production de BLSE (Bêtalactamases à spectre élargi). Ceci constitue un problème de santé publique majeur car cette résistance est à l'origine d'une impasse thérapeutique et conduit à une prescription d'antibiotiques à large spectre (carbapénèmes).

Notre étude prospective allant du 01 janvier au 31 décembre 2017 a porté sur 50 souches d'entérobactéries isolées au laboratoire et a pour but de caractériser les types de bêtalactamases. **Méthodologie :** Les souches ont été ré-isolées d'abord sur milieu Mueller Hinton, ensuite identifiées par la morphologie et les caractères biochimiques des entérobactéries. Les méthodes suivantes ont été réalisées pour la mise en évidence des classes de BLSE.

- Méthode de rapprochement des disques (synergie entre un disque Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC) et les disques de Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> (C3G) : BLSE de classe A.

- Méthode de Dongeon Yong et al. utilisant l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique) 0,5 M, PH 7 (Inhibition du zinc présent sur le site actif de l'enzyme par l'EDTA): BLSE de classe B.

**Résultat :** Les souches d'entérobactéries étaient réparties ainsi : *Enterobacter spp* : 40%, *Escherichia coli* : 32%, *Klebsiella pneumoniae* : 24% et *Klebsiella oxytoca* : 4%. Cinquante-six pour cent 56% des souches produisaient une BLSE de classe A (image « bouchon de champagne ») et 14% une BLSE de classe B avec restauration de l'activité de l'imipénème après association de l'EDTA. *Enterobacter spp* était la souche la plus représentée avec 12 souches sécrétrices d'une BLSE de classe A et 5 souches de classe B, suivie d'*E. coli* avec 08 souches sécrétrices d'une BLSE de classe A et 01 souche de classe B. *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* comptaient respectivement 06 et 02 souches sécrétrices de BLSE de classe A. **Conclusion :** L'acquisition par les entérobactéries et la transmission de résistance, par production de BLSE de classe A ou B est un problème majeur de santé publique causant une véritable impasse thérapeutique. Aujourd'hui, la prévalence de la résistance par production de Métallo-bêtalactamase (MBL) est faible comparée à celle de BLSE de classe A. Ainsi, des stratégies de diagnostic et de maîtrise de la diffusion doivent être appliquées rigoureusement.

**Mots clés :** Entérobactéries, multirésistance, bêtalactamase classe A et B.

### ABSTRACT

**Introduction:** Enterobacteriaceae are the main causes of bacterial infections. These are Multiresistant Bacteria (BMR) by ESBL production (broad spectrum beta-lactamases). This is a major public health problem, this resistance is at a therapeutic stalemate and leads to a prescription of broad-spectrum antibiotics (carbapenems). Our prospective study on January 1st to December 31st, 2017 focused on 50 strains of isolates in the laboratory and for the purpose of characterization of the types of beta - lactamases. **Methods:** The strains were re-isolated from Mueller Hinton medium, then identified by the morphology and biochemical characters of enterobacteria. The following methods have been used for highlighting ESBL classes.

- Method of approximation of disks (AMC) and disks of cephalosporin of 3<sup>rd</sup> (C3G): BLSE of class A.

- Method of Dongeon Yong et al. using 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic), pH 7 (Inhibition of zinc present at the active site of the enzyme by EDTA): Class B ESBL.

**Result:** The enterobacterial strains were distributed as follows: *Enterobacter spp*: 40%, *Escherichia coli*: 32%, *Klebsiella pneumoniae*: 24% and *Klebsiella oxytoca*: 4%. Fifty-six percent 56% of strains produced class A ESBL ("champagne cork" image) and 14% class B ESBL with restoration of imipenem activity after EDTA combination. *Enterobacter spp* was the most represented strain with 12 strains secreting a class A ESBL and 5 class B strains, followed by *E. coli* with 08 strains secreting a class A ESBL and 01 class B strain. *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* respectively had 06 and 02 class A ESBL secretory strains. **Conclusion:** Acquisition of enterobacteriaceae and resistance transmission by ESBL class A or B production is a major public health problem causing a real therapeutic impasse. Today, the prevalence of resistance by production of metallo-beta-lactamase (MBL) is low compared to that of class-A ESBL. Thus, strategies for diagnosis and control of diffusion must be rigorously applied.

**Key words:** Enterobacteriaceae, multiresistance, betalactamase class A and B.

## INTRODUCTION

L'acquisition par les bactéries de résistances aux antibiotiques représente un défi majeur pour la médecine du XXI<sup>e</sup> siècle. L'augmentation croissante de l'incidence des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE), est à l'origine d'infections graves et responsable d'une prescription accrue d'antibiotiques à large spectre. L'émergence et la dissémination de nouvelles bêta-lactamases, sont concomitantes à la consommation des bêta-lactamines. Ainsi, l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) au début des années 1980, contre les infections à germes producteurs de pénicillinasés, a été suivie, dès 1983, de la description de la première bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) chez *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne [1]. Plus de 200 BLSE ont maintenant été décrites [2]. Jusqu'à la fin des années 1990, les entérobactéries productrices de BLSE étaient principalement des espèces dites « hospitalières », *Klebsiella pneumoniae* ou *Enterobacter spp* [3,4].

Le défi majeur est aujourd'hui de limiter la propagation des entérobactéries productrices de BLSE en milieu communautaire et surtout hospitalier.

Notre étude a été réalisée au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHNU de FANN et repose sur la caractérisation phénotypique des BLSE de classe A (pénicillinasés) inhibées par l'acide clavulanique et les BLSE de classe B (métallo-bêta-lactamases) inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) chez les entérobactéries.

L'objectif général était de caractériser les types de bêta-lactamases chez les entérobactéries multirésistantes avec comme objectifs spécifiques l'identification des principales Entérobactéries Productrices de Carbapénémases (EPC) et la mise en place d'une technique de routine pour détecter les BLSE de classe B.

## MATERIELS ET METHODE

Il s'agissait d'une étude prospective de janvier à décembre 2017 portant sur 50 souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de divers produits pathologiques reçus et traités au laboratoire afin de caractériser phénotypiquement les bêta-lactamases. Les souches ont été ré-isolées sur gélose Mueller Hinton puis coloration de Gram pour confirmer la morphologie des Bacilles Gram Négatif (BGN).

L'identification a été réalisée grâce à la galerie classique : Kligler Hajna (KH), Manitol-mobilité

(MM), Citrate de Simmons (CS), Urée-tryptophane et l'eau peptonnée simple (EPS).

Pour l'antibiogramme les disques d'antibiotique testés étaient disposés ainsi :

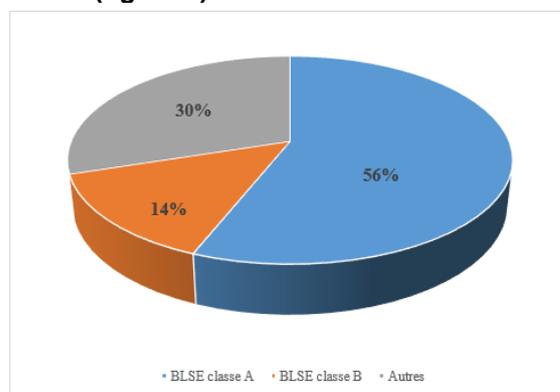
- Recherche de BLSE de classe A : disque d'AMC déposé au centre de la boîte entouré des disques de C3G (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime) à une distance de 20 mm du disque central (AMC).

La technique de rapprochement des disques (RDD) permet de mettre en évidence une synergie entre un inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique) et une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (C3G). Ainsi une inhibition de l'enzyme par l'acide clavulanique entraîne une inhibition de la croissance bactérienne par les disques de C3G traduisant l'image de synergie en forme de « bouchon de champagne ».

- Recherche de BLSE de classe B : deux disques d'imipénème ont été déposés suffisamment distants (+ de 30mm) sur la même boîte de pétri, l'un comme témoin et sur l'autre, un volume de 10µl d'une solution d'EDTA est ajouté. La détection de BLSE de classe B (métallo-enzymes) est réalisée selon la méthode de Dongeun Yong et al. en utilisant une solution d'EDTA à 0,5 M pH 7 [5]. Les BLSE de classe B sont des métallo-enzymes, dont le site actif contient un ion zinc essentiel à leur activité, d'où l'effet inhibiteur d'agents chélateurs de cations divalents comme l'EDTA. Ainsi une inhibition de l'enzyme par l'EDTA permet de restaurer l'activité bactéricide de l'imipénème.

## RESULTATS

Selon l'espèce bactérienne, l'essentiel des souches d'entérobactéries était représenté par *Enterobacter spp* soit 40% (N=20) suivi d'*Escherichia coli* 32% (N=16), de *Klebsiella pneumoniae* 24% (N=12) et *Klebsiella oxytoca* représentait le plus faible pourcentage 4% (N=2). Les BLSE de classe A étaient produites par 56% (N=28) avec l'image de « bouchon de champagne » et 14% (N=8) une BLSE de classe B (figure 2).



**Figure 1** : Répartition des souches selon la classe de bêta-lactamases.

*Enterobacter spp* était l'espèce la plus représentée avec 12 souches qui produisaient une BLSE de classe A et 5 souches une BLSE de classe B.

Les isolats isolés chez les patients reçus à titre externes montraient : 6 souches sécrétrices de BLSE de classe A et 2 souches sécrétrices de BLSE de classe B.

**Tableau I :** Répartition des classes de bêta-lactamases selon la provenance.

Service	Classe de BLSE			Total
	A	B	Autres	
Externe	6	2	7	15
Service des Maladies Infectieuses	9	0	2	11
Neurologie	5	2	3	10
Chirurgie Thoracique et Cardio Vasculaire	5	0	1	6
Neurochirurgie	1	2	2	5
Chirurgie Cardiopédiatrique	2	0	0	2
Oto-Rhino-Laryngologie	0	1	0	1
<b>Total</b>				<b>50</b>

Au Service des Maladies Infectieuses et Tropicales (SMIT), 9 souches étaient sécrétrices de BLSE de classe A et aucune souche ne sécrétait une BLSE de classe B.

#### DISCUSSION

Dans notre étude la caractérisation phénotypique des BLSE chez les entérobactéries par la méthode de RDD avait révélé que 56% des BLSE étaient de classe A et 14% de classe B (MBL) correspondant à des carbapénèmes. Ces carbapénèmes ont été retrouvées aussi chez 5 souches (soit 10%) isolées de patients hospitalisés.

*Enterobacter spp* produisait 10% des BLSE de classe B (carbapénèmes) et 24% de BLSE des classe A. Les BLSE de classe A étaient surtout isolées chez les patients hospitalisés (Service des Maladies Infectieuses et Tropicales : 18%, Neurologie : 10% et au Service de Chirurgie Thoracique Cardio-vasculaire : 10%). Les souches productrices de carbapénèmes étaient isolées de produits pathologiques provenant des services de Neurologie et de Neurochirurgie avec 4% dans chacun des services. En France, au niveau communautaire, la proportion d'infections à EBLSE est moins importante ; en 2006 la fréquence des EBLSE isolées

de prélèvements à visée diagnostique au niveau communautaire était de 1,1 %. Parmi elles, 34 % étaient productrices de BLSE de classe A type CTX-M-15 [6].

Aujourd'hui la plupart des entérobactéries sont sensibles aux carbapénèmes (Imipénème, ertapénème..) mais l'inquiétude à l'heure actuelle est représentée par l'émergence des BLSE de classe B entraînant une inefficacité des carbapénèmes.

Dans notre étude, la majorité des souches productrices de carbapénèmes étaient retrouvées chez les patients de services où l'usage des antibiotiques était intensif (Réanimation et SMIT).

#### CONCLUSION

Notre étude a montré, hormis la production de BLSE de classe A par les entérobactéries, la production de MBL qui, pour la plupart, sont des carbapénèmes. Aujourd'hui, la prévalence de la résistance enzymatique aux carbapénèmes chez les entérobactéries apparaît mais reste faible au Sénégal, bien que la disponibilité des carbapénèmes notamment de l'imipénème soit relativement récente. Il convient évidemment de tout mettre en œuvre pour que cette situation reste la plus stable que possible.

#### REFERENCES :

1. **Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.** Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and ceftazidime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983 ; 11:315 - 7.
2. **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 ; 18: 657 - 86.
3. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al.** CTX-M changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007 ; 59:165 - 74.
4. **Canton R, Coque TM.** The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:466 - 75.
5. **Yong D Lee K, Yum JH, Rossolini GM, Chong Y.** Imipenem EDTA disk method for differentiation of metallo-  $\beta$ -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas spp*. *J Clin Microbiol*. 2002; 40 :3798 - 801.
6. **Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al.** Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(6):1205 - 14.