

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli* productrices de β - lactamases à spectre étendu à l'Hôpital Militaire de Tunis

MS. ASLI,
T. JAOUADI,
A. AGREBI,
F. BARGUELLIL

Résumé : La résistance aux lactamines due aux BLSE est en augmentation sur toute la planète en particulier chez les entérobactéries. Les nouvelles enzymes fréquemment communautaires telles que CTX-M sont responsables d'une «pandémie» mondiale et parallèlement la part d'*E. coli* croit parmi les espèces représentées.

Notre étude rétrospective s'est intéressée à 64 souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE isolées au laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Militaire de Tunis, entre octobre 2009 à décembre 2010. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé et complétée par la mesure des CMI par bandelettes E-test. Les bêtalactamases ont été recherchés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes TEM, SHV, CTX-M et CTX-M du groupe 1.

Les souches sont isolées à partir du service de néonatalogie de l'hôpital Militaire de Tunis (17%), de réanimation (16%), suivis des services de pédiatrie (14%), des urgences (9%) et (23%) des souches des consultations externe. Les *E. coli* étudiées sont isolées des ECBU (73%), suivi des hémocultures (11%), pus et prélèvements rectaux (6%). Vingt souches ont été isolées en 2009 et 44 en 2010. La résistance des souches étudiées était de 61% à l'amoxicilline+acide clavulanique, de 53% à l'acide nalidixique, de 48% à l'ofloxacine, de 45% à la ciprofloxacine, 81% à la gentamicine, de 31% au chloramphénicol, une faible résistance à la céfoxitine 3% et aucune résistance pour l'imipénème. Toutes les souches étudiées présentaient un test de double synergie positif. Les CMI obtenues pour les différents antibiotiques sont élevées sauf pour l'imipénème. Le gène *bla*CTX-M a été détectée dans 95% des souches étudiées, 87% étaient positifs pour les gènes *bla*CTX-M du groupe 1. Les gènes *bla*TEM (9%) et *bla*SHV (4%) ne sont pas significatifs dans les souches d'*Escherichia coli* étudiées. Nous avons noté la présence de souches multirésistantes qui hébergent deux ou trois gènes de résistance *bla*TEM, *bla*SHV et *bla*CTXM-1, cette association peut être trouvée au sein d'une même région de multirésistance souvent observée avec les souches productrices de CTX-M-15. Notre étude confirme les résultats constatés par d'autres auteurs à savoir la prédominance des BLSE de type CTX-M (probablement M-15) La résistance aux β - lactamines s'accompagne d'une corésistance à d'autres antibiotiques ce qui rend souvent les schémas thérapeutiques traditionnellement utilisées pour le traitement inefficaces. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la résistance permettra d'améliorer la prise

Service de Microbiologie-
Hôpital Militaire de Tunis

en charge thérapeutique des patients tout en réduisant la prescription d'antibiotiques à large spectre.

Mots clés : *Escherichia coli* - BLSE - Epidémiologie-CTX-M.

Phenotypic and molecular characteristics of *Escherichia coli* strains producing ESBLs isolated in the Military Hospital of Tunis

Summary : Betalactam resistance due to ESBL is increasing all over the world especially in *Enterobacteriaceae*. The new frequently community enzymes such as CTX-M are responsible for a global "pandemic" and at the same time the part of *E. coli* increase among the species represented.

Our retrospective study concern a 64 strains of *Escherichia coli* producing ESBLs isolated in the laboratory of Microbiology of the Military Hospital of Tunis, from October 2009 to December 2010. The study of antibiotic sensitivity was done by the method of diffusion in agar and supplemented by measuring the MIC by E-test strips. Betalactamases were detected by PCR using primers specific genes TEM, SHV, CTX-M and CTX-M group 1.

The strains were isolated from the neonatal unit of the Military Hospital of Tunis (17%), intensive care (16%), followed by pediatric service (14%), emergency (9%) and 23% of strains in external consultations. The *E. coli* studied were isolated from urine cultures (73%), followed by blood cultures (11%), pus and rectal swabs (6%). Twenty strains were isolated in 2009 and 44 in 2010. The resistance of the strains studied was 61% with amoxicillin + clavulanic acid, 53% to nalidixic acid, 48% to ofloxacin, 45% to ciprofloxacin, 81% to gentamicin, 31% to chloramphenicol, low resistance to cefoxitin 3% and no resistance to imipenem. All the strains studied had a double positive synergy test. MICs obtained for the different antibiotics are high except for imipenem. The *bla*CTX-M gene was detected in 95% of the strains studied, 87% were positive for *bla*CTX-M genes in group 1. *Bla*TEM genes (9%) and *bla*SHV (4%) are not significant in *Escherichia coli* strains studied. We noted the presence of multidrug-resistant strains that harbor two or three resistance genes *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTXM-1, this association can be found in the same region of multidrug resistance often observed with strains producing CTX-M-15. Our study confirms the results found by other authors, namely the prevalence of ESBL CTX-M (probably M-15) Resistance to β -lactam antibiotics is associated with co-resistance to other antibiotics which often makes regimens traditionally used for the treatment ineffective. A better understanding of the epidemiology of resistance will improve the therapeutic management of patients while reducing the prescription of broad spectrum antibiotics.

Keywords : *Escherichia coli* ESBL - Epidemiology - CTX-M.

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

Introduction

Les taux de résistance bactérienne aux antibiotiques sont en augmentation à travers le monde [1]. Les bactéries peuvent acquérir cette résistance par des mécanismes génétiques qui permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la résistance et les facteurs responsables de la sélection des souches résistantes. Les bêta-lactamases sont la principale cause de la résistance aux β -lactamines chez toutes les bactéries à Gram-négatives. Ces deux dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'augmentation, de part le monde, des infections à entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE).

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes qui hydrolysent aussi bien les pénicillines que les oxyimino- céphalosporines (céfotaxime, céftazidime, céftriaxone...) et les monobactams (aztréonam). Les céphamycines (céfotétan, latamoxef) et les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème) restent actifs alors que les activités des fluoroquinolones de deuxième génération (ciprofloxacine), des céphalosporines de quatrième génération (céfépime, céfpirome) et celles des associations bêta-lactamines/inhibiteurs de bêta-lactamases sont variables [2]. Ces enzymes sont codées soit par les chromosomes et sont spécifiques d'une espèce bactérienne soit par des plasmides, des transposons, et les intégrons, qui facilitent leur propagation dans le monde bactérien. L'augmentation de la fréquence relative des entérobactéries productrices de BLSE a été observée aussi bien dans les centres de soins qu'en dehors. Parmi ces entérobactéries, *Escherichia coli* (*E. coli*) est un germe très important. Son habitat est le colon humain où il est le plus abondant germe aérobie-anaérobie facultatif. Sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement. Il est responsable de 90% des infections urinaires communautaires et il est l'un des germes majeurs des infections urinaires nosocomiales. D'autre part cette bactérie a connu ces dernières années une fulgurante augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques. De plus, l'implication des souches d'*E. coli* BLSE dans les infections humaines et animales est croissante [3,4].

A l'hôpital militaire de Tunis, établissement de 615 lits, dont 50 lits en USI la maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes, demeure difficile à contrôler comme dans beaucoup d'autres structures sanitaires.

Cette étude a pour objectifs :

- d'étudier la résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* producteurs de β - lactamases à spectre étendu
- de caractériser les différents types de Bêta-lactamases produites par les souches d'*Escherichia coli* isolées

Matériels et méthodes

Cette étude porte sur 64 souches d'*E. coli* BLSE isolées de prélèvements à visée diagnostique, entre octobre 2009 et décembre 2010 (Tableau I). Les données des patients étudiés (âge, sexe, durée et antécédents d'hospitalisation, provenance, site anatomique d'isolement) ont été recueillies en prospectif dans le cadre du programme de surveillance de l'incidence des BMR à partir du laboratoire de bactériologie. Une seule souche a été retenue par patient.

1- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'identification des souches a été réalisée avec les cartes GN et l'automate VITEK® 2 compact (Bio-Mérieux®) ou par les galeries API 20 E (Bio-Mérieux®). Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton (Biorad®) avec les disques d'antibiotiques (Biorad®). L'étude de la sensibilité aux Antibiotique est réalisée selon les normes préconisées par le CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

- **Antibiogramme par diffusion au milieu gélosé :** réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton(MH), avec un inoculum de 10^6 UFC /ml (0,5 McFarland). Les disques d'antibiotiques testés étaient : amoxicilline (25 μ g), amoxicilline + acide clavulanique (20+10 μ g), ticarcilline (75 μ g), pipéracilline (75 μ g), ticarcilline + acide clavulanique (75+10 μ g), Pipéracilline + tazobactam (75+10 μ g), céfalotine (30 μ g), céfoxitine (30 μ g), céfotaxime (30 μ g), céftazidime (30 μ g), céfépime (30 μ g), céfpirome (30 μ g), aztréo-

article original

Tableau I : caractéristiques des souches isolées d'*Escherichia coli*

Prélèvements Services	ECBU	Hémocultures	Prélèvement rectal	Prélèvement Trachéal	Pus	Prélèvement auriculaire	Prélèvement gastrique	Total
Externe	20	1			-			21
Néonatalogie	1	4	3	1	-	1	1	11
Réanimation	6	3	-	1	-	-	-	10
Pédiatrie	9	-	-	-	-	-	-	9
UGO	3	-	-	-	-	-	-	3
Cardiologie	3	-	-	-	-	-	-	3
Endocrinologie	2	-	-	-	-	-	-	2
Gynécologie	1	-	-	-	1	-	-	2
Gastroentérologie	1	-	-	-	-	-	-	1
Chirurgie viscérale		-	-	-	2	-	-	2
Total	46	8	3	2	3	1	1	64

nam (30 µg), imipénème (10 µg), gentamicine (10 µg), tobramycine (10 µg), nétilmicine (30 µg), amikacine (30 µg), ofloxacine (5µg), acide nalidixique (30µg), péfloxacin (5µg), ciprofloxacine (5µg), tétracycline (30µg), chloramphénicol (30 µg), colistine (50 µg) et nitrofurantoïne (300µg), nitroxoline (20 µg), triméthoprime-Sulfaméthoxazole (1,25+23,75µg).

Chaque disque est distant de l'autre de 3 cm.

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 18 h. L'activité anti- bactérienne de chaque antibiotique est interprétée après mesure des diamètres d'inhibition.

- Test de synergie en milieu gélosé avec les disques contenant l'acide clavulanique

Ce test est réalisé pour la détection de la production des BLSE en déposant des disques contenant différents types de bêta-lactamines (céfotaxime, céftriaxone, céftazidime et aztréonam) placés à l'opposé du disque contenant une association d'amoxicilline + acide clavulanique (20+10 µg). Après incubation à 37 °C pendant une nuit, la présence de BLSE serait mise en évidence par l'extension de la zone d'inhibition de la céphalosporine par l'acide clavulanique qui est matérialisée par un aspect dit de «bouchon de champagne» [5].

- Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale d'antibiotiques inhibant la croissance bactérienne (CMI), est déterminée par le système E- test (Bio-Mérieux). Ce dernier utilise une bandelette d'un même antibiotique qui est appliquée sur milieu Mueller-Hinton inoculé avec une suspension bactérienne de 0,5 McFarland et incubé à 37°C pendant une nuit.

3- Extraction de l'ADN bactérien :

Des colonies isolées à partir d'une culture sur une gélose nutritive sont resuspendues dans 200 µl de tampon de prélyse. L'addition de 66µl de NaCl5M permet la lyse de la membrane bactérienne. La suspension est centrifugée (4°C ; 10 000 rpm ; 15 min) et le surnageant est récupéré. Les protéines sont extraites par addition de chloroforme et centrifugation (4°C ; 10 000 rpm ; 5min). A la phase aqueuse, soigneusement récupérée, 2 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés, afin de précipiter l'ADN. Après incubation une nuit dans la glace (-20°C) la suspension est centrifugée (4°C ; 14 000 rpm ; 5min). Après élimination de l'éthanol absolu le culot d'ADN est lavé avec l'éthanol (70%) et centrifugé (4°C ; 14000 rpm ; 5min). Après avoir séché, le culot est resuspendu

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

dans 200 µl de TE (10mM Tris-Hcl à pH 7,5, 1mM EDTA) enfin 8µl de ribonucléase (RNase) sont ajoutés afin d'éliminer l'ARN [6].

4- Amplification par PCR :

La PCR a été utilisée pour caractériser les enzymes de type TEM, SHV et CTX-M à l'aide d'amorces en utilisant l'ADN génomique et plasmidique comme matrice (Tableau II). Pour les souches positives pour le gène bla CTX-M, une recherche des gènes bla CTX du groupe 1 à été faite. Le milieu réactionnel comprend dans un

5- Electrophorèse sur gel d'agarose : les acides nucléiques ont été séparés sur gel d'agarose et grâce à un tampon de migration (TBE 1%) pendant 30 min à un voltage de 105 volts. Après électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) 25 min puis rincé avec une solution de décoloration pendant 15 min L'ADN est visualisé sous lumière ultraviolette. La taille et la quantité des fragments sont estimées par comparaison avec le marqueur de taille.

Tableau II : Amorces utilisées dans les techniques PCR

PCR cible	Amorces	Séquences	Taille du fragment (bp)	Référence
bla TEM	TemA1 TemB1	5'-ATA AAA TTC TTG AAG AC-3' 5'-TTA CCA ATG CTT AAT CA-3'	1075	[15]
bla SHV	SHV-F SHV-R	5'-CAC TCA AGG ATG TAT TGT G-3' 5'-TTA GCG TTG CCA GTG CTC G-3'	822	[15]
bla CTX-M	CTX-C1 CTX-C2	5'-ATG TGC AGC ACC AGT AAA GT-3' 5'-ACC GCG ATA TCG TTG GTG G-3'	545	[15]
bla CTX-M-1	CTX-1F CTX-1R	5'-ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGTC-3' 5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3'	864	[16]

volume final de 50µl : 2µl de l'ADN total, 0,5µl de chaque amorce (15 pmol pour les amorces CTX-M, CTX-M-1 et SHV et 100 pmol pour l'amorce TEM), 1µl de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) avec une concentration 0,5mM (Invitrogen), 2,5µl de MgCl₂ (1,25 mM), 1 unit / µl de Taq polymérase et 5µl de son tampon 10X (Promega). Le mélange de PCR est soumis à une étape de dénaturation (10 min à 94 °C), suivie par 40 cycles d'amplification (1min de dénaturation à 94 °C, 1min d'hybridation à 48 °C, 1 min d'élongation à 72 °C) et 10 min à 72 °C pour la dernière étape. Une fois les cycles de la réaction de polymérisation sont achevés, 7µl des produits de PCR sont analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%.

Résultats

1- Origine des souches

La répartition des soixante quatre souches d'*Escherichia coli* selon les services montre qu'elles étaient isolées principalement à partir du service de néonatalogie de l'hôpital Militaire de Tunis (17%), de réanimation (16%), suivis des services de pédiatrie (14%), des urgences (9%) et (23%) des souches des consultations externe. La répartition des souches en fonction du type de prélèvement pathologique montre que les souches ont été isolées essentiellement à partir des ECBU (73%), suivi des hémocultures (11%), puis des prélèvements rectaux (6%). Vingt souches ont été isolées en 2009 et 44 en 2010.

article original

2-Etudes des phénotypes de résistance

2-1-Antibiogramme

Vingt- six antibiotiques de différentes familles ont été testés sur soixante quatre souches, selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Toutes les souches présentent le même profil de résistance aux β -lactamines d'après le test de sensibilité et de synergie entre l'acide-clavulanique et les céphalosporines de troisième génération ainsi que l'aztréonam. La résistance des souches étudiées était de 61% (n = 39) à l'AMC, de 53% à l'acide nalidixique, de 48% à l'ofloxacine, de 45% à la ciprofloxacine, 81% à la gentamicine, de 31% au chloramphénicol, une faible résistance à la céfoxitine 3% et aucune résistance pour l'imipénème. Toutes les souches étudiées présentaient un test de double synergie positif.

2-2-Concentration minimales inhibitrices

Grâce aux concentrations minimales inhibitrices par les méthodes E-Test, on peut déterminer le niveau de résistance des souches étudiées. Les résultats des CMI sont interprétés selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, 2006).

Toutes les souches présentent une résistance très élevée aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline), les CMI sont supérieures à 240 $\mu\text{g/ml}$. De même, elles sont hautement résistantes aux céphalosporines de quatrième génération (céfpirome, céfépime). Les valeurs des CMI pour les autres classes d'antibiotiques outre les bêtalactamines se présentent comme suit : comprises entre 0,1 et > 240 $\mu\text{g/ml}$ pour la tétracycline et la gentamicine, entre 0,004 et > 240 $\mu\text{g/ml}$ pour la ciprofloxacine (Tableau III).

3- Amplification des gènes *bla*CTX-M, *bla*TEM et *bla*SHV

L'analyse des produits d'amplification par PCR sur gel d'agarose 1% montre qu'il ya une amplification des gènes de β -lactamases chez toutes les souches étudiées. Les tailles des fragments amplifiées sont 545 pb, 864pb, 822pb, 1075 pb qui correspondent respectivement aux *bla*CTX-M, *bla*CTX-M-1, *bla*SHV et *bla*TEM (figures 1 à 4). Le gène *bla*CTX-M a été détectée dans 95%des souches étudiées, 87% étaient positifs pour les gènes *bla*CTX-M dans le groupe CTX-M-1. Les pourcentages des gènes *bla*TEM (9%) et *bla*SHV (4%) ne sont pas

Tableau III : CMI moyenne des antibiotiques testés

Antibiotique	CMI50
Amoxicilline	≥ 240
Amoxicilline +acide clavulanique	≥ 240
Ticarcilline	≥ 240
Pipéracilline	≥ 240
Céfotaxime	≥ 240
Céfazidime	≥ 240
Céfpirome	≥ 240
Céfépime	≥ 240
Imipénème	0,2
Gentamicine	> 90
Tobramycine	> 100
Amikacine	40
Ofloxacine	> 64
Ciprofloxacine	> 120
Tétracycline	> 64

Tableau IV : Résultats de la détection des gènes de résistances aux β -lactamines par PCR chez les souches d'*Escherichia coli*.

Service	CTX-M	CTX-M-(groupe 1)	SHV	TEM
Réanimation	9	9	-	2
Pédiatrie	8	6	1	-
Gynécologie	2	2	-	-
Chirurgie	2	2	-	-
Endocrinologie	2	2	1	1
Cardiologie	3	3		
Néonatalogie	10	8	-	2
Gastroentérologie	1	-	-	-
UGO	3	3	-	1
Externe	21	20	1	1

significatifs dans les souches d'*Escherichia coli* étudiées. En fonction des services il existe une prédominance de CTX-M par rapport aux autres β -lactamases qui se répartissent en faibles proportions (Tableau IV).

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

Discussion

Les entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE+) sont toujours d'actualité dans les structures de soins, malgré les mesures de prévention bien codifiées destinées à limiter leur dissémination. On observe plutôt une augmentation de leur fréquence chez plusieurs espèces, en particulier chez *Escherichia coli*, avec des BLSE de type CTX-M plutôt que des TEM ou des SHV observées au départ lors des premières descriptions de ces enzymes. Dans ce cadre, il est important de suivre de près l'évolution du nombre d'isolats, de déterminer l'enzyme en cause et de chercher à savoir si les souches sont reliées afin d'agir de manière ciblée et de pouvoir ajuster au plus vite les politiques de prévention et de lutte contre les bactéries multirésistantes (BMR) aussi bien au niveau local que national.

A l'hôpital militaire de Tunis, les E-BLSE+ sont suivies depuis 1990 et font l'objet d'une alerte systématique dès leur dépistage. Sur la période étudiée dans ce travail, 64 souches d'*E. coli* -BLSE+ ont été isolées chez nos patients.

La majorité des souches sont isolées des ECBU ce qui illustre également la spécificité d'*Escherichia coli* qui constitue la principale espèce bactérienne impliquée dans l'infection urinaire [7].

Les profils de sensibilité aux antibiotiques ont montré que les *E. coli* BLSE sont hautement résistantes aux pénicillines, ceci est observé en France avec un maximum de 30 à 50% des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux aminopénicillines, aux céphalosporines à large spectre et à l'association amoxicilline + acide clavulanique isolées, aussi bien dans les hôpitaux qu'en milieu communautaire. Cette résistance élevée aux β -lactamines est associée aussi à des fréquences élevées aux aminosides, aux fluoroquinolones et aux autres antibiotiques. Ce phénomène de multirésistance bactérienne est décrit aussi dans les hôpitaux européens, américains et asiatiques [8].

Toutes les souches étudiées sont sensibles aux céphamycines, incluant principalement la céfoxitine, excepté deux souches qui sont résistantes, cette résistance peut être due à la perte des porines ou à l'expression de la

céphalosporinase plasmidique AmpC. Seul l'imipénème de la classe des β -lactamines conserve une activité puissante contre les souches d'*Escherichia coli* étudiées, d'ailleurs les carbapénèmes sont extrêmement stables à la dégradation par les β -lactamases et sont considérés comme le traitement de choix contre les infections graves associées aux *E. coli* productrices de BLSE.

L'utilisation massive de cet antibiotique a entraîné l'apparition de souches productrices carbapénémases qui deviennent depuis leur première apparition en 1996 aux Etats-Unis un problème majeur émergent à cause de leur résistance à la plupart des antibiotiques disponibles laissant ainsi peu d'options thérapeutiques [9,10].

Le profil de sensibilité aux antibiotiques montre que la majorité des souches étudiées présentent des niveaux de résistance plus élevés pour le céfotaxime par rapport à la céftazidime ce qui suggère qu'ils sont producteurs de CTX-M du fait que l'enzyme CTX-M est beaucoup plus active contre le céfotaxime et l'aztréonam que contre la céftazidime. Ces résultats sont confirmés par la biologie moléculaire.

Dans notre étude nous avons utilisée des amorces spécifiques pour la détection du gène du groupe bla CTX-M-1 vu la prévalence de ce groupe chez *Escherichia coli*. Les résultats montrent la prédominance de CTX-M du groupe 1 au sein des souches productrices de CTX-M ce qui est comparable aux autres études européennes qui suggèrent que les enzymes CTX-M du groupe 1 tel que CTX-M-3 et CTX-M-15 sont majoritaires en Europe, Asie, Afrique, Amérique du nord, Amérique du Sud et en Australie grâce à la diversification de ce groupe (26 variantes) entraînant une diffusion rapide dans le monde [11].

La première CTX-M-1 a été isolée en Allemagne en 1989, par la suite, les enzymes CTX-M se sont propagées rapidement au niveau de différentes espèces bactériennes et dans divers pays [12].

En Tunisie, depuis le premier isolement de BLSE produite par la souche de *Klebsiella pneumoniae* à l'hôpital Charles Nicolle en 1984, un nombre croissant d'enzymes BLSE chez les entérobactéries a été détecté; 60% des isolats étaient des *Klebsiella spp.* et 12,5%

article original

étaient des *E. coli* [13]. La première CTX-M (CTX-M-3) identifiée en Tunisie a été isolée d'une souche de *Salmonella enterica* sérovar Wien en 2001 à l'hôpital militaire de Tunis [13]. Plus tard, une souche de *Salmonella enterica* Livingstone productrice de CTX-M-27 a provoqué une épidémie nosocomiale dans un service de néonatalogie à Sousse en 2002 [14].

Les enzymes autres que CTX-M sont détectées chez quelques souches étudiées, trois souches productrices de SHV, le gène bla TEM est identifiée chez six souches ce qui est compatible avec les constatations qui confirment que l'avènement des CTX-M a brouillé les certitudes épidémiologiques acquises sous l'ère des BLSE de type TEM et SHV, du fait que ce type d'enzyme diffuse rapidement aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. En France la fréquence des BLSE retrouvées en milieu communautaire est passée de 0,3% en 1999 à 1,1% en 2006, à la suite de la diffusion des CTX-M [11]. Nos résultats mettent en évidence la présence de souches multirésistantes qui hébergent deux ou trois gènes de résistance à la fois : association des gènes bla TEM, bla SHV et bla CTXM-1. Cette association

peut être retrouvée au sein d'une même région de multi-résistance souvent observée avec les souches d'*E. coli* productrices de CTX-M-15, comme le clone international décrit par plusieurs auteurs [15].

Conclusion

Dans la présente étude nous avons démontré la corrélation entre la production de BLSE par les souches d'*Escherichia coli* et la résistance enzymatique aux différentes classes d'antibiotiques. En effet ces souches productrices de BLSE possèdent un profil de résistance particulier caractérisé par une haute résistance aux céphalosporines à spectre étendu avec une sensibilité aux carbapénèmes. En se basant sur les tests génotypiques, nous avons caractérisé les différents types de gènes. Les BLSE rencontrées appartiennent essentiellement à la famille des CTX-M du groupe 1, cette prévalence est due au gène bla CTX-M-1 qui est porté le plus souvent par un plasmide ou un autre élément mobile ce qui facilite leur diffusion dans le milieu communautaire et hospitalier. La résistance aux β -lactamines est associée à

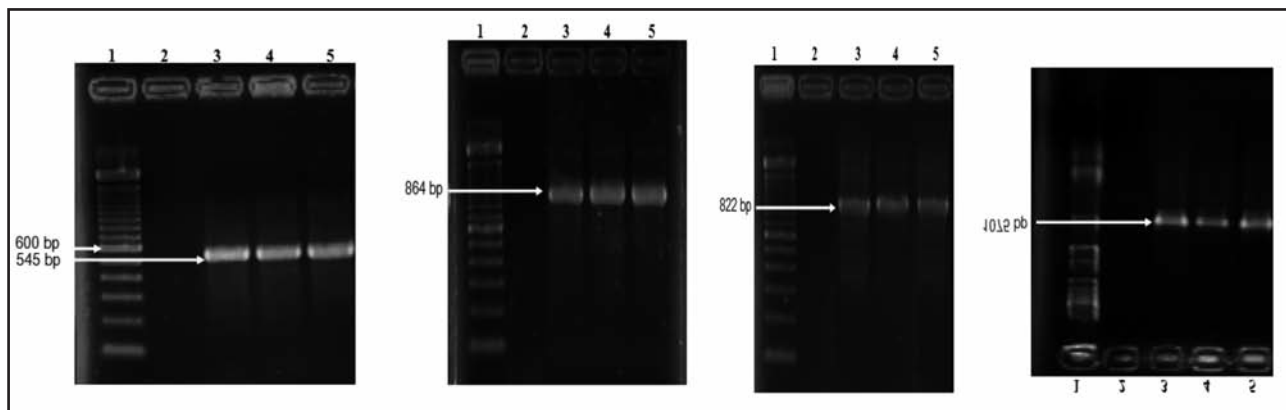


Figure 1 : amplification du gène bla CTX-M à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3,4 et 5 : souches positives au gène CTX-M

Figure 2 : amplification du gène bla CTX-M-gpe 1 à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 :4 et 5 : souches positives au gène CTX-M-gpe 1

Figure 3 : amplification du gène bla SHV à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 : 4 et 5 : souches positives au gène SHV

Figure 4 : amplification du gène blaTEM à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 :4 et 5 : souches positives au gène TEM

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

une résistance élevée aux autres familles d'antibiotiques. Il serait intéressant à l'avenir d'analyser les différentes séquences des gènes caractérisées afin d'en déterminer l'identité moléculaire, la présence éventuelle de mutations et la localisation génétique (plasmide, transposon, intégrons, séquence d'insertion).

Bibliographie

1. Samaha- Kfoury JN, F Araj G. Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *Brit Med J.* 2003;327.
2. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, John McGowan JM, Tenover FC. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42 : 294-298
3. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, Dermott MC, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42 3483-3489
4. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle swine and poultry. *J Antimicrob Chemotherapy.* 2003;52 : 489-492
5. Livermore DM, Brawn D.F J. Detection of β - lactamase- mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001;48, suppl. SI : 59-64.
6. ChenWKuoT.T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993;21 (9) : 2260.
7. Tagajdid MR, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Med Mal Infect.* 2010;40 : 70-73.
8. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann D. Emergence of Clinical Isolates of *Escherichia coli* Producing TEM-1 Derivatives or an OXA- β -Lactamase Conferring Resistance to β -lactamase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38 : 1085-1089
9. Fraimow H.S Tsigrelis S. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit : Mechanisms Epidemiology and Management of Specific Resistant Pathogens. *Crit Care Clin.* 2011;27 : 163-205.
10. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing Organisms. *Hosp. Infect.* 2009;73 : e 345- e354.
11. Ruppé E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : avènement des CTX-M. *Antibiotiques.* 2010;12 : 3-16.
12. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases : implications for the clinical microbiology laboratory therapy and infection control. *J. of Infect* 2003;47 : 273-295.
13. Armand-Lefèvre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, Barguelli F, Amor A, Pagès JM, Nicolas-Chanoine MH. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47 (3) : 1165-8.
14. Bouallègue-Godet O, Ben Salem Y, Fabre L, Demartin M, Grimont PAD, Mzoughi R, Weill FX. Nosocomial Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Livingstone Producing CTX-M-27 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Neonatal Unit in Sousse, Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2005;43 (3) : 1037-1044.
15. Leflon -Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinase F, Guelfi MC, Duportail F, Heym B, Bingen E, Nicolas-Chanoine MH. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15 producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycoside and tetracycline in a French Geriatric hospital. *Antimicrob Ag and Chemother.* 2004;48 : 3736-3742.
16. Ben Achour N, Mercuri PS, Power P, Belhadj C, Ben Moussa M, Galleni M, Belhadj O. First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathol Biol.* 2009;57 (5) : 343-8