

Résistance aux bêtalactamines de bacilles à gram négatif au CHN-YO de Ouagadougou : identification de souches productrices de bêtalactamases à spectre élargi

R. OUEDRAOGO/TRAORE¹, B. ZEBA², A. MAGGY³
J. M. FRERE³, I. P. GUISSOU¹, A. SAMB⁴

Résumé

Une étude du mécanisme de résistance aux bêtalactamines a été faite sur 75 bacilles à Gram négatif isolés dans le laboratoire de bactériologie du Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo (CHN-YO) à Ouagadougou. Toutes les souches colligées résistent à au moins deux antibiotiques de la famille des bêtalactamines, principalement l'ampicilline et l'amoxicilline + acide clavulanique, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à 32 µg/ml. La recherche de la production de bêtalactamases par la méthode chromogénique utilisant la nitrocéfine de Glaxo (Cefinase BBL, Biomérieux) a été positive chez toutes les souches étudiées. Le test de synergie simple sur milieu gelosé (Müller Hinton), entre les disques de l'amoxicilline + acide clavulanique et de la cefotaxime et/ou de la ceftazidime a permis de mettre en évidence deux souches productrices de bêtalactamase à spectre élargi (BLSE). Des essais de classification de bêtalactamases par les tests colorimétriques utilisant la nitrocéfine ont permis d'identifier pour trois souches étudiées, des enzymes appartenant probablement à des classes A et D selon la classification d'Amblar.

Les présents résultats doivent être approfondis pour contribuer à une meilleure pratique de l'antibiothérapie et de l'hygiène hospitalière.

Mots-clés : *bacilles à gram négatif, bêtalactamines, résistance, bêtalactamase à spectre élargi.*

Introduction

Dans l'arsenal de la chimiothérapie anti-bactérienne, les antibiotiques de la famille des bêtalactamines, particulièrement ceux du groupe des pénicillines, sont les plus largement utilisés, en raison de leur coût peu élevé, leur accessibilité et surtout de l'absence presque totale d'effets indésirables (CISSE M. F. *et al.*, 1993).

1. Faculté des sciences de la santé, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

2. Faculté des sciences et techniques, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

3. Département de biochimie enzymologie, Liège 1, Belgique.

4. Faculté de médecine et de pharmacie, Université Cheik Anta Diop, Dakar, Sénégal.

De nos jours, les bactéries ont développé des mécanismes de résistances efficaces reposant sur différents facteurs génétiquement indépendants (MICHAUT *et al.*, 1999) :

- production d'enzyme spécifique, capable d'inactiver l'antibiotique ;
- imperméabilité membranaire ;
- modification du site protéique cible.

Nous nous intéresserons aux mécanismes de résistance par production d'enzyme : la bêta-lactamase. Elle constitue le mécanisme majeur de résistance des entérobactéries (PHILIPPON *et al.*, 1988 ; PHILIPPON *et al.*, 1986).

Malgré l'indéniable progrès thérapeutique obtenu avec des nouvelles molécules telles les céphalosporines de 3^e génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et les monobactames (aztréonam), on assiste de plus en plus à l'apparition de souches d'entérobactéries résistantes à ces bêta-lactamines (PHILIPPON *et al.*, 1988).

C'est le cas des souches de *Klebsiella pneumoniae* et de *E. coli* isolées en 1983 en Allemagne (KNOTHE *et al.*, 1983 ; PHILIPPON, 1988), en Tunisie en 1984 (BEN HASSEN *et al.*, 1993) et en France en 1985 (BRUN-BUISSON *et al.*, 1987).

La résistance aux C3G comme la céfotaxime, la ceftazidime pouvant être très peu élevée (CMI de 1 à 4 µg/ml), la souche sera rapportée à tort sensible selon les normes internationales d'interprétation (ACAR *et al.*, 1987). Devant de telles situations, il est nécessaire de rechercher la présence ou non d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) par le test de synergie entre une C3G (céfotaxime) et un inhibiteur de bêta-lactamase (acide clavulanique) (LEDRU *et al.*, 1999 ; RAHAL *et al.*, 1994).

Le but de notre travail est, d'une part, de déterminer les souches résistantes par production de bêta-lactamases et parmi elles, celles à spectre élargi ; d'autre part, d'étudier par des tests colorimétriques la classe de ces enzymes. Cette dernière partie ne sera que très peu abordée et nécessitera l'utilisation de techniques plus approfondies.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

De mars à octobre 1999, 75 souches de bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs, résistant chacune à au moins 2 antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, ont été retenues pour l'étude des mécanismes de résistances.

Identification

Toutes les souches ont été identifiées sur la base des caractères biochimiques obtenus par le système Api 20 E et également par le système automatisé GNI VITEK[®] de Biomerieux.

Sensibilité aux antibiotiques

La méthode de diffusion sur milieu gélosé, ou méthode des disques, a été utilisée conjointement avec le système automatisé GNS VITEK[®] qui donne la valeur de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique testé.

Recherche de la bêtalactamase

Elle a été pratiquée sur toutes les souches étudiées selon la méthode chromogénique utilisant la nitrocéfine de Glaxo [commercialisé par Biomerieux sous le nom de « Cefinase » BBL Microbiologie system]. Le principe consiste à écraser la colonie bactérienne suspectée sur le disque de Cefinase test et une révélation positive (en quelques secondes) se traduit par un changement de coloration au rouge-rosée.

Recherche de la bêtalactamase à spectre élargi (BLSE)

Elle a été recherchée sur toutes les souches étudiées sur gélose Müller Hinton (MH) selon le test de synergie positive avec la céfotaxime et/ou la ceftazidime et l'amoxicilline + acide clavulanique par la méthode des disques.

Elle consiste à déposer au centre de la gélose MH, un disque d'amoxicilline + acide clavulanique et à 3 cm de ce disque (centre à centre) tout autour, les disques de ceftaxime, de ceftazidime et de cefepime ; puis on incube la boîte à 37 °C à l'étuve, pendant une nuit. Si la souche produit une BLSE, il y a une augmentation très nette du rayon d'inhibition autour de la bêtalactamine et ce, en regard du disque contenant l'acide clavulanique.

Extraction et caractérisation des bêtalactamases

Extraction des bêtalactamases

La technique de congélation et de décongélation a été utilisée. Elle consiste à partir de colonies isolées de bactéries qu'on repique dans 10 ml de bouillon Luria Bertani (LB) incubé à 37 °C, sous agitation (250 rpm) pendant une nuit. Ensuite, on réalise une culture d'une heure à 37 °C à la dilution de 1/30 (300 µl dans 10 ml de LB). On centrifuge à 800 g pendant 10 à 15 minutes et le culot est repris soigneusement dans du tampon 5 mM HEPES pH = 8, sous glace. Après homogénéisation, on réalise 3 cycles de congélation et décongélation respectivement dans du mélange carboglace/acétone et dans l'eau tiède. Le surnageant de centrifugation obtenu à 1300 rpm pendant 20 minutes renferme les enzymes (bêtalactamases).

Classification des bêta-lactamases

La méthode colorimétrique sur microplaque a été pratiquée. Elle consiste à utiliser la nitrocéfine (CPR PM 555) comme substrat et des inhibiteurs spécifiques des bêta-lactamases comme l'acide clavulanique (200 μ M), la cloxacilline (20 μ M), l'acide dipicolinique (100 mM). La cloxacilline est utilisée également à 5 mM en présence de bleu de bromothymol (BTB) comme substrat.

La présence d'une coloration rouge-rosée est témoin d'une hydrolyse de la CPR dans le cas de la cloxacilline comme substrat, un virage au jaune du BTB est signe d'une hydrolyse de l'antibiotique.

Les enzymes de classe A ne sont ni inhibées par la cloxacilline, ni par l'acide dipicolinique, mais par contre sont inhibées par l'acide clavulanique. Celle de la classe B sont seulement inhibées par l'acide dipicolinique et la classe C par la cloxacilline. La classe D n'est inhibée par aucun des trois inhibiteurs.

Résultats

Fréquence des souches étudiées

Tableau I. Fréquence des différentes espèces étudiées

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>E. Coli</i>	45	60
<i>Salmonella sp.</i>	11	14,67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	10,67
<i>Enterobacter Cloacae</i>	7	9,34
<i>Shigella sp.</i>	2	2,66
<i>Acinetobacter</i>	2	2,66
Total	75	100

Les espèces étudiées sont essentiellement représentées par les entérobactéries (74 soit 97,33 %) contre 2 souches d'Acinetobacter.

E. coli était le plus représenté avec des taux de 60 %, suivi du genre *Salmonella* (14,67 %) *Klebsiella* (10,67 %) puis du genre *Enterobacter* avec des taux de 9,33 %. *Shigella* et *Acinetobacter* ne représentaient chacun que 2,66 % des cas.

Résistances aux bêta-lactamines des souches étudiées

La presque totalité des souches étudiées résistent à l'ampicilline (90 à 100 % de résistance), sauf environ 9 % des souches d'*E. coli*. L'amoxicilline + acide clavulanique a une activité moindre sur l'ensemble des souches testées (17 à 50 % de résistance), à l'exception du genre *Enterobacter*, chez qui on note des taux de résistance supérieurs à 80 % (figure 1).

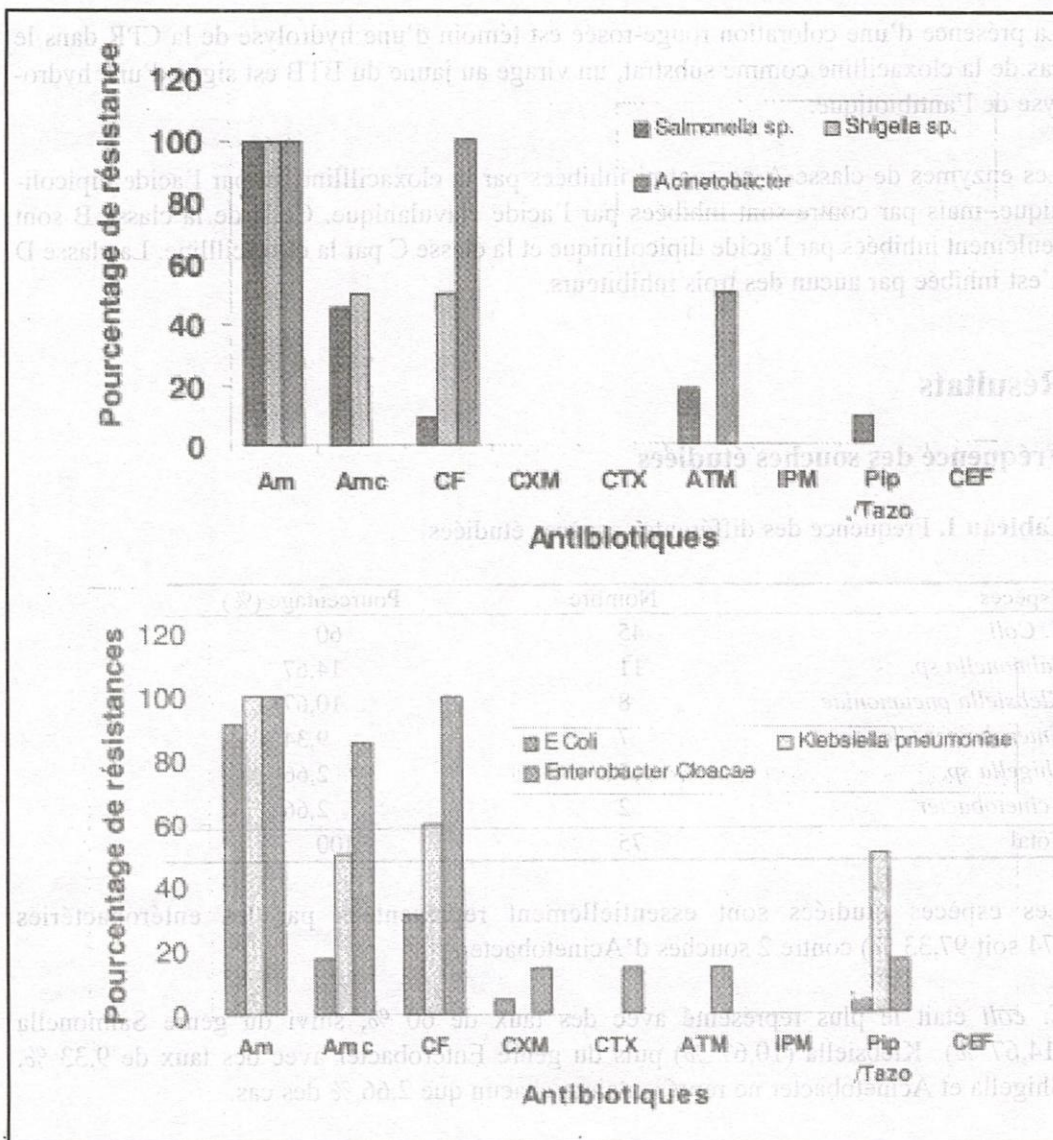


Figure 1. Pourcentage de germes résistant aux bêta-lactamines.

Les céphalosporines de 1^{re} génération (C1G) sont peu actives sur les souches étudiées ; par contre, les C2G, C3G, les céphalosporines dites spécialisées, les carbapénèmes (imipenem) et les monobactams (aztreonam) sont très actifs sur la plupart des souches étudiées. Des taux de résistances allant de 4 à 50 % ont été enregistrés avec la pipéracilline + tazobactam.

Étude des bêtalactamases

La recherche des bêtalactamases par la nitrocéfine chromogène (cefinaise test)

Toutes les souches résistantes aux bêtalactamines testées sont productrices de bêtalactamases.

Détection de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE)

Sur 75 souches étudiées, seules deux ont permis de noter sur gélose MH, une nette synergie entre la cefotaxime, la ceftazidime et le disque d'augmentin[®] espacé de 3 cm. Ces deux souches sont dites productrices de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE +). Les profils de résistances de ces souches étaient respectivement :

- AMR-AMC I-CZR-CTX S-CXMS
- AMR-AMCR-CFR-CTXS-CXMS

Classification des bêtalactamases

L'utilisation de la nitrocéfine et de la cloxacilline, comme substrats avec les inhibiteurs spécifiques des bêtalactamases (ac. clavulanique, ac. dipicolinique, cloxacilline), a permis une identification présomptive des classes A et D d'appartenance des 3 souches étudiées.

Discussions

Il ressort de notre étude, que le mécanisme de résistance des souches isolées au CHN-YO vis-à-vis des bêtalactamines testés est de type enzymatique par production de bêtalactamases hydrolysant la molécule de bêtalactamine, comme le démontrent de nombreux auteurs (ACAR *et al.*, 1987 ; CABIE *et al.*, 1989 ; CISSE *et al.*, 1993). Les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE), rapportées en Allemagne en 1983, en France en 1984, en Tunisie en 1984 et en Algérie en 1989 (BEN HASSEN *et al.*, 1993 ; PHILIPPON *et al.*, 1988), sont d'apparitions récentes et n'avaient jamais fait l'objet d'étude au Burkina Faso.

Les très faibles taux de BLSE enregistrés (2 sur 75 soit 2,66 %) ne doivent pas occulter l'existence et l'importance de ces souches BLSE dans nos pays. La mise en évidence des souches BLSE (+) permet de détecter des souches faussement sensibles en terme de diamètre critique,

comme des résultats l'ont amplement démontré (JARLIER *et al.*, 1988 ; PHILIPPON *et al.*, 1988). Les BLSE chez les entérobactéries posent de gros problèmes de multirésistances. C'est ainsi que pour des CMI, de l'ordre de 4 μ g/ml pour la céfotaxime ou la cefuroxime pourraient être interprétées à tort sensible chez des souches de *Klebsiella* BLSE (+). Plus de 9 espèces d'entérobactéries produisent des BLSE, mais leur distribution en fonction du type d'espèce et du type d'enzyme est très différente (PHILIPPON *et al.*, 1988). Les souches de *Klebsiella pneumoniae*, suivies de *E. coli* paraissent les souches d'entérobactéries chez lesquelles la fréquence des BLSE est importante en milieu hospitalier (BRUN-BUISSON *et al.*, 1987 ; CABIE *et al.*, 1989 ; PHILIPPON *et al.*, 1988 ; SIROT *et al.*, 1988 ; SIROT *et al.*, 1987).

La recherche de ce nouveau mécanisme de résistance doit devenir aussi systématique que celle de la pénicillinase chez *Haemophilus influenzae* (CABIE *et al.*, 1989 ; RICARD *et al.*, 1989).

Les premiers résultats de classification obtenus par tests colorimétriques, permettent de classer les enzymes respectives de *E. coli*, *K. pneumoniae* et d'acinetobacter dans la classe A, D, et A. Les enzymes de la classe A entraînent une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines les plus anciennes et celles de la classe D entraînent des résistances à l'oxacilline ou cloxacilline. Diverses enzymes de la classe A, B ont été surtout décrites chez les entérobactéries comme Enterobacter, Serratia et également chez Acinetobacter (PHILIPPON *et al.*, 1996).

L'identification plus précise des enzymes requiert au moins la détermination du point iso-électrique (PHILIPPON *et al.*, 1988).

Conclusion

Les résultats obtenus sur la recherche des souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont plutôt encourageants pour la majorité des espèces étudiées. En effet, seuls 2,66 % des souches étudiées sont BLSE positives. Une introduction en routine de la recherche de BLSE, particulièrement chez les souches résistant aux C3G, permettrait un meilleur suivi de l'épidémiologie des résistances et des mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries. Ceci permettrait une meilleure contribution à l'amélioration de la pratique de l'antibiothérapie et de l'hygiène hospitalière au Centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo.

Références bibliographiques

ACAR J., BERGOGNE-BEREZIN E., CLUZEL R., COURTIEU A., COURTALIN P., DABERNAT H., DRUGEON H., DUVAL J., FLEURETTE J., MOREL C. L., PHILIPPON A., SIROT J., SOUSSY C. J., THABAUT A., VERON M., 1987. Communiqué 1987 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Path. biol., 35, 1101-1104.

BEN HASSEN A., BEJAOUI M., LAKHOVA M. R., BEN RED-JEB S., 1993. Profil épidémiologique de la résistance de 153 souches de *Salmonella* (*Salmonella typhi* exclus) isolées en milieu pédiatrique-tunisien de 1985 à 1990. *Path., Biol.*, 41 : 706-712.

BEN RED-JEB S., BEN YAGHANE H., BOUJNAH A., PHILIPPON A., LABIA R., 1988. Synergy between clavulanic acid and newer bêta-lactams on 9 clinical isolates of *K. pneumoniae*, *E. coli* and *S. typhimurium* resistant to third generation cephalosporins. *J. antimicrob. chemother.*, 21 : 263-266.

BRUN-BUISSON C., LEGRAND P., PHILIPPON A., MONTRAVERS F., ANSQUER M., DUVAL J., 1987. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, ii, 302-306.

CABIÉ A., JOUNNELLE J., SAINTAIME C., 1989. Bêta-lactamase à spectre élargi (CTX-1) chez *Salmonella panama* à Fort-de-France (Martinique). *Méd. Mal. Inf.*, 19 : 418-420.

CISSÉ M. F., SOW A. Y., DIEYE-SARR E., BOYE C. S., GAYE-DIALLO A., DIOP D., MBOUP S., SAMB A., 1993. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *salmonella* isolées en milieu pédiatrique dakarois ; Recherche de bêta-lactamases et de plasmides. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 86 : 43-47.

CHARLIER P., COYETTE J., DEHARENG D., DIVE G., DUEZ C., DUSART J., FONZE E., FRAIPONT C., FRÈRE J. M., GALLEN M., GOFFIN C., JOSETTE B. J., LAMOTTE-BRASSEUR J., NGUYEN-DISTECHE M., 1998. Résistance bactérienne aux bêta-lactamines. *Médecine/Sciences*, 14 : 544-555.

JARLIER V., NICOLAS M. H., FOURNIER G., PHILIPPON A., 1988. Extended broad spectrum bêta-lactamase conferring transferable resistance to newer bêta-lactams in enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Inf. Dis.*, 10 : 867-878.

KNOTHE H., SHAH P., KRCMER V., ANTAL M., MITSUHASHI S., 1983. Transferable resistance to cefotaxim, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *serratia marcescens*. *Infection*, 6 : 315-317.

LEDRU S., CANONNE J. P., 1999. Suivi de l'épidémiologie des bactéries multirésistantes par le laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Lens. *Med. Mal. Inf.*, 29 : 508-515.

MICHAUT A., SIMAC C., 1999. Évolution de la résistance aux antibiotiques de 1993 à 1997 dans un hôpital de l'île de la Réunion. *Med. Mal. Inf.*, 29 : 451-461.

PHILIPPON A., ARLET G., 1996. État de la résistance aux carbapénèmes. *La lettre de l'infectiologue*, tome XI, N° 9, 235-244.

PHILIPPON A., FOURNIER G., PAUL G., VEDEL G., NEVOT P., 1988. Détection et distribution des bêta-lactamases à spectre élargi chez les entérobactéries. *Med. Mal. Inf.*, 12 : 869-876.

- PHILIPPON A., PAUL G., 1986.** Bêtalactamases : identification rôle-aspects épidémiologiques. *Med. Mal. Inf.*, 16, 11bis : 644-654.
- PHILIPPON A., PAUL G., NEVOT P., 1988.** Résistance plasmidique aux cephalosporines de troisième génération. *Presse Med.*, 17 :1883-1889.
- RAHAL K., REGHAL A., 1994.** Épidémie nosocomiale à salmonella Mbandaka, productrice de différentes bêtalactamases dont une à large spectre : résultats préliminaires. *Med. Trop.*, 54, 227-230.
- RICARD C., PHILIPPON A., M'BOUP S., VIEU J. F., 1989.** Épidémiologie des infections pédiatriques à klebsiella dans deux hôpitaux de Dakar. Production de bêtalactamase à spectre élargi (1987-1988). *Med. Mal. Inf.*, 19,12 : 753-759.
- SIROT J., CHANTAL C., PETIT A., SIROT D., LABIA R., GERBAUD G., 1988.** Klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated bêtalactamases markedly active against third-generation cephalosporins : epidemiologic studies . *Rev. Infect. Dis.*, 10 : 850-859.
- SIROT J., SIROT D., 1987.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1988.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1989.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1990.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1991.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1992.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1993.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1994.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1995.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1996.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1997.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1998.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 1999.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.
- SIROT J., SIROT D., 2000.** Importance et thérapeutique des nouveaux mécanismes de résistance apparus chez Klebsiella pneumoniae. *Lettre Infect.*, 6 : 195-199.