

RECHERCHE DE GÈNES BLSE DE TYPE TEM, SHV, ET OXA-1 SUR DES SOUCHES DE E. COLI-SOLÉES AU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE DE FANN, SÉNÉGAL

DIAGNE R¹, NGOM B², NGOM M³, KA R¹, LO S⁴, DIA ML^{2,5}, SARR A², NIANG A², SOW AI^{2,5}

RESUME

INTRODUCTION : L'émergence de micro-organismes multirésistants aux antimicrobiens comme les entérobactéries productrices de BLSE constitue un important fléau quant à la mise en œuvre de protocoles thérapeutiques appropriés. Dans cette étude nous explorerons les caractéristiques moléculaires des souches de *Escherichia coli* BLSE ainsi que leurs profils de résistance aux antimicrobiens. Cela permettra d'identifier les déterminants épidémiologiques importants ainsi que les facteurs de risque associés à ces infections.

MATERIELS ET METHODES : Trente-deux souches de *E. coli* BLSE sont isolées de patients reçus à l'hôpital Fann. Le test de la sensibilité aux antibiotiques a été effectué par la méthode de diffusion des disques, et la détection des BLSE par la méthode de diffusion par double disque. Les gènes BLSE (TEM, SHV, OXA-1, et CTX-M) ont été identifiés par une réaction de polymérase en chaîne (PCR) puis analysés par électrophorèse sur gel.

RESULTATS : Parmi les 32 souches d'*E. coli* BLSE, 90,62% étaient porteuses du gène CTX-M, 59,37 % portaient le gène OXA-1, 28,12 % portaient le gène TEM, et 3,12 % les gènes CTX-M-9 et SHV. Notre étude a par ailleurs révélé l'existence de souches portant plusieurs gènes à la fois. En effet 59,37 % des souches portaient simultanément les gènes CTX-M-13 et OXA-1, 21,87 % portaient en même temps les gènes CTX-M-13 et TEM alors que 18,75 % portaient 3 gènes en même temps, CTX-M-13, CTX-M-9 et TEM.

CONCLUSION : Notre étude a montré que parmi les souches d'*E. coli* BLSE celles portant le gène CTX-M-15 étaient le plus commun. Cependant, on pouvait constater une large variété de souches responsable d'infections humaines chez les *E. coli* BLSE.

Mots clés : *E. coli* – gènes BLSE – Fann – Sénégal.

ABSTRACT

DETECTION OF TEM, SHV AND OXA-1 ESBL GENES AMONGE. COLISTRANS ISOLATED IN BACTERIOLOGY LABORATORY OF FANN, SENEGAL

INTRODUCTION : The emergence of multidrug-resistant microorganisms such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae has raised considerable concern regarding the appropriate treatment. In this study, we investigated the molecular characteristics of *Escherichia coli* ESBL-producing and its antimicrobial resistance patterns, which can provide useful information about the epidemiology and risk factors associated with these infections.

MATERIALS AND METHODS: Thirty two *E. coli* ESBL-producing strains were collected from patients admitted to the Fann Hospital. Antibiotics susceptibility testing was performed using disk diffusion method. ESBL was detected using a double-disk synergy method. Subsequently polymerase chain reaction (PCR) was performed in order to identify β -lactamase genes (TEM, SHV, OXA-1, and CTX-M). The isolates were also analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

RESULTS: Among the 32 ESBL-producing *E. coli* strains, 90.62% were positive for CTX-M, 59.37 % for OXA-1, 28.12 % for TEM, and 3.12 % for CTX-M-9 and SHV. Our study has also revealed the existence of strains carrying several genes simultaneously. For instance, 59.37 % of our strains were carrying CTX-M-13 and OXA-1, 21.87 % were carrying CTX-M-13 and TEM where 18.75 % were carrying 3 genes at the same time, CTX-M-13, CTX-M-9 and TEM.

CONCLUSION: The present study revealed that in ESBL-producing strains, the most common genotype for *E. coli* was CTX-M-15. However, there was a wide diversity of strains causing human infections among the ESBL-producing *E. coli*.

Keywords: *E. coli* – ESBL genes – Fann – Senegal

1- UFR des sciences de la santé, université de Thies BP 967 Thies, Sénégal ;

2- Centre Hospitalier National Fann BP 5035 Dakar, Sénégal;

3- Laboratoire National de Santé publique BP 967 Thiès, Sénégal;

4- UFR des Sciences de la Santé Université Gaston Berger BP234 Saint Louis, Sénégal

5-Faculté de Médecine, Pharmacie, et Odontologie Université Cheikh Anta Diop BP 22254 Dakar – Ponty Sénégal.

Auteur correspondant : Dr Rokhaya Diagne, UFR des sciences de la santé, université de Thies BP 967 Thies, Sénégal, e mail : rodiagne1@yahoo.fr, Tel : 77 564 58 90

INTRODUCTION

Les entérobactéries sont des bactéries fréquemment retrouvées dans les pathologies humaines telles que les abcès, les pneumonies, les méningites, les septicémies, les entérites, les cystites, etc(1). Elles sont impliquées dans 50% des septicémies, 60 à 70% des entérites, 70% des infections urinaires (2). De par la virulence des infections qu'elles causent et de par leur faculté à devenir résistantes aux antibiotiques, ces bactéries posent aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Les céphalosporines et les carbapénèmes constituent les traitements de choix lors des infections aux entérobactéries (3,4). Cependant l'utilisation excessive et inadaptée de ces antibiotiques a vu l'émergence de nouvelles variantes de souches d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à large spectre élargi (BLSE) résistantes à ces derniers (1). Les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* arborant le gène CTX-M, sont les souches les plus fréquemment retrouvées dans les infections de types communautaires surtout celles urinaires (5,6). Cependant d'autres gènes BLSE tels que TEM, OXA, CTX-M et SHV sont également impliqués dans la sélection des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (1, 4).

Dans cette étude nous nous proposons de rechercher et de caractériser par PCR la présence chez *E. coli* des gènes TEM, OXA, CTX-M et SHV.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches bactériennes

Trente-deux souches d'*E. coli* isolées de produits biologiques (urines, sang, pus, sécrétions vaginales) provenant de patients hospitalisés dans les différents services du centre hospitalier national universitaire (CHNU) de Fann ou reçus en consultations externes sont incluses dans notre étude. Ces souches ont été identifiées suivant leurs caractères biochimiques par galerie Api 20E®.

Test de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé suivant la technique de diffusion en milieu gélosé et selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM). La production de BLSE est détectée sur gélose Mueller Hinton, conformément à la procédure du test du double disque, par la présence de synergie en bouchon de champagne entre un disque d'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) et un disque de céphalosporine de troisième génération (C3G).

La technique de remplacement des disques et le test de rapprochement des disques ont été utilisés pour mettre en évidence une synergie révélatrice de la sécrétion de BLSE par les souches étudiées.

Détection des gènes BLSE

Détection des gènes par PCR classique

L'ADN génomique a été extrait des différentes souches bactériennes en utilisant le kit Qiagen selon le protocole fourni par le fabricant.

Pour la détection par PCR des gènes TEM, SHV, CTX-M-13, CTX-M-9, CTX-M-25 et OXA-1, une solution réactionnelle finale de 50 µl a été réalisée en additionnant 2µl d'ADN génomique à un mélange de 48 µl composé de 5 µl de tampon taq 10X Buffer, de 5 µl de dNTP 2mM, de 0,5µl d'amorce «Forward»(F) et 0,5µl d'amorce «reverse»(R) pour chaque gène, de 0,2µl de la Taq polymérase et de 36,8 µl de H₂O. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau I. Ces gènes sont amplifiés en utilisant le thermocycleur Applied Bio systems 9700 selon un programme PCR qui comprend un cycle de dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 mn; 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 40s, un cycle d'hybridation à 55 °C pendant 40s et un cycle d'élongation à 72 °C pendant 1mn puis à 72 °C pendant 5mn.

Pour la révélation, 15µl du produit PCR résultant de l'amplification de chaque gène ont été mixés avec 2µl de bleu de bromophénol et déposés sur un gel d'agarose 3% à raison de 15 µl par puits en prenant soin de déposer au préalable le marqueur de taille 100pb sur le premier puits. La taille des gènes recherchés est de 850 pb pour TEM, CTX-M-13, CTX-M-9 et CTX-M-25 et 800 pb pour SHV et OXA-1. Le gel a par la suite été migré à 100 Volts pendant 40 mn.

Détection de la séquence répétitive extragénique palindromique par REP-PCR

Pour révéler l'existence de différentes souches d'*E. coli* appartenant à un même clone, des amorces consensus qui reconnaissent la séquence répétitive extragénique palindromique (REP), ont été utilisées pour la PCR.

Ainsi une solution réactionnelle de volume finale 100 µl est réalisée en mélangeant 5µl de l'extrait d'ADN génomique et 95µl d'un mix composé de 10µl de dNTP (2mM), 10µl de Tampon Taq 10X, 10µl de DMSO, 1µl d'amorce REP1R, 1µl amorce REP2T, 0,6µl de la Taq polymérase et 62,4µl de H₂O.

La réaction de REP-PCR a été conduite selon un programme PCR composé d'un cycle de dénaturation initiale à 95°C pendant 3mn ; 40 cycles de dénaturation à 92°C pendant 30s, un cycle d'hybridation à 40°C pendant 1mn et un cycle d'élongation à 65°C pendant 8mn puis 65°C pendant 16mn.

15µl du produit PCR résultant de l'amplification de chaque gène ont été mixés avec 3µl de bleu de bromophénol et déposés sur un gel d'agarose 1% à raison de 15 µl par puits en prenant soin de déposer au préalable le marqueur de taille 1kb sur le premier puits. Le gel a par la suite été migré à 50 Volts pendant 3 heures.

RÉSULTATS

Notre étude a montré que la majorité des souches de *E. coli* (90,62 %) arboraient le gène CTX-M-13, alors que 59,37 %, 28,12 %, 3,12 % et 3,12 % portaient les gènes OXA-1, TEM, CTX-M-9 et SHV respectivement. Cependant, le gène CTX-M-25 n'a été détecté chez aucune des 32 souches testées. Notre travail a également permis de mettre en évidence l'existence de différents gènes de BLSE chez la même souche. En effet un double portage a été noté chez 59,37 % des souches qui portaient simultanément les gènes CTX-M-13 et OXA-1, contre 21,87 % qui portaient les gènes CTX-M-13 et TEM. 18,75 % des souches portaient 3 gènes à la fois (CTX-M-13, OXA-1 et TEM) contre 3,12 % des souches qui portaient les gènes CTX-M-13, CTX-M-9 et TEM.

Tableau I : liste des amorces utilisées pour la détection des gènes de BLSE

Gènes	Amorces
TEM	OT-3 : 5'-ATGAGTATTCAACATTCCG-3' OT-4 : 5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3'
SHV	OS-5 : 5'-CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC-3' OS-6 (5'-TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA-3'
CTX-M-13	CTX-M-13 F: 5'-GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3' CTX-M-13 R: 5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3'
CTX-M-9	CTX-M-9 F: 5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3' CTX-M-9 R: 5'-CCC TTC GGC GATGAT TCT C-3'
CTX-M-25	CTX-M-25F: 5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3' CTX-M-25 R: 5'-TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC-3'
OXA-1	OXA F: 5'-TATCAACTTCGCTATTTTTTTA-3' OXA-IR: 5'-TTTAGTGTGTTTAGAATGGTGA-3'

Dans l'étude, 15,62 % des souches testées ne présentaient pas de synergie entre un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de troisième génération, de quatrième génération ou de monobactam. Ces souches étaient au nombre de cinq, deux d'entre eux portaient uniquement le gène CTX-M-13, deux autres avaient en même temps les gènes CTX-M-13, OXA-1 et TEM et la cinquième souche avait uniquement le gène TEM.

La REP-PCR a permis de déterminer sept clones différents *E. coli* qui circulaient dans l'hôpital. Ces clones sont nommés de A à G. Cependant, deux d'entre elles nommés clones du groupe X avaient donné des profils illisibles.

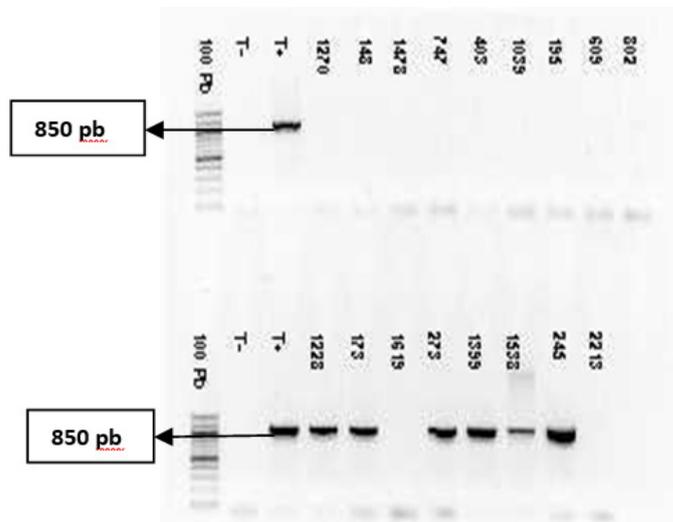


Figure 1 : exemple de résultats de PCR de gènes BLSE de type TEM.

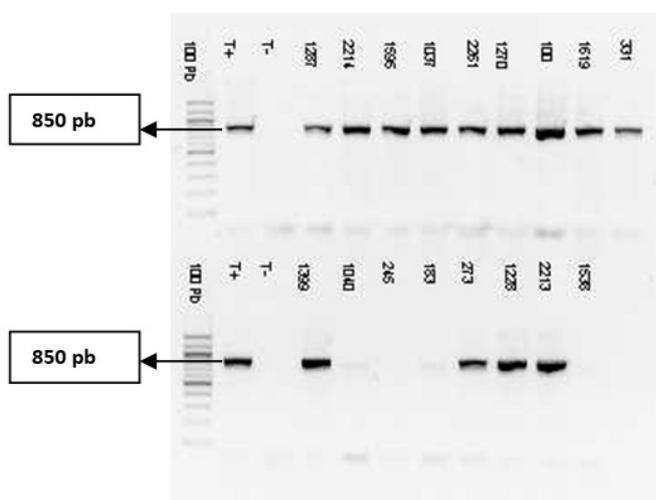


Figure 2 : exemple résultats de PCR de gènes BLSE de type CTX-M-13

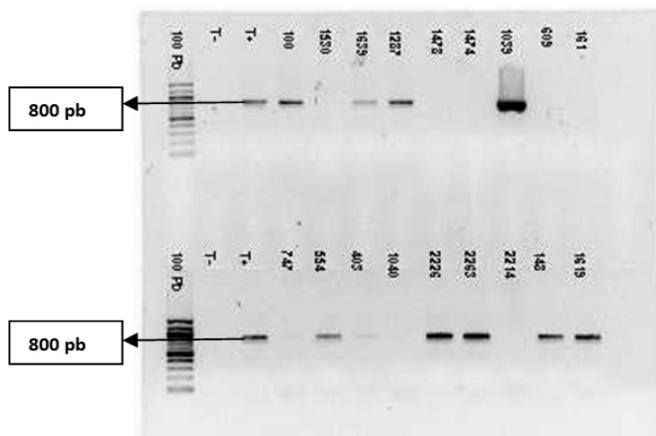
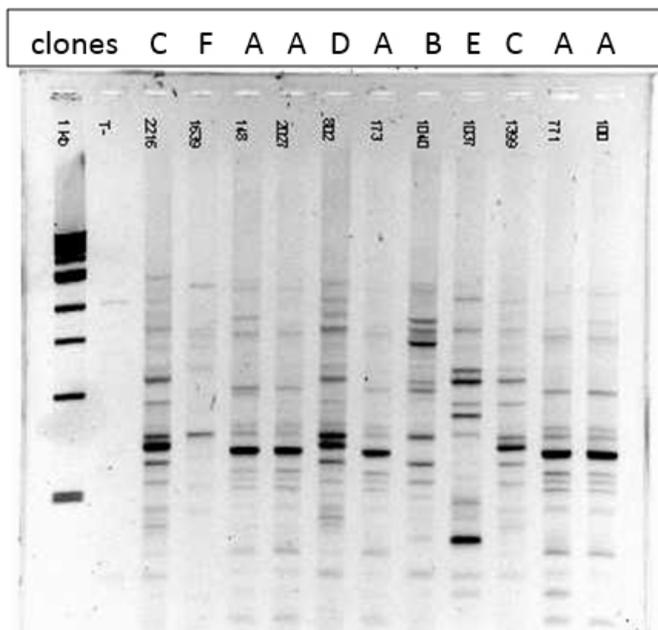


Figure 3 : exemple résultats de PCR de gènes BLSE de type OXA-1



CONCLUSION

La dissémination mondiale de la résistance aux bêta-lactamines est devenue un problème majeur de santé publique.

La résistance aux bêta-lactamines chez *E. coli* et toutes les autres entérobactéries augmente régulièrement au Sénégal.

Cette résistance touche la plupart des bêta-lactamines et remet en cause les traitements classiques.

Les nouvelles techniques de biologie moléculaires utilisées en complément des techniques classiques de sérotypage et d'antibiogramme, permettent une meilleure compréhension de la dissémination des souches multirésistantes.

Une surveillance régulière et active des bactéries multirésistantes au sein des laboratoires de Bactériologie et des unités de soins et une meilleure gestion de la consommation des antibiotiques sont nécessaires pour réduire la transmission et favoriser un succès dans le traitement de ces infections bactériennes.

Une prise de conscience des autorités sanitaires, des professionnels de la santé et de la population est nécessaire pour que ces mesures soient comprises et respectées

RÉFÉRENCES:

- 1- Livenmore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol. Rev 1995;8(4):557-584.
- 2- Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4): 933-51.
- 3- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18(4):657-86.
- 4- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11(6):315- 7.
- 5- Kotra LP, Samama J, Mobashery S. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. In: Lewis K, Slayers AA, Taber HW, Wax RG, editors. Bacterial resistance to antimicrobials 2002:123-160.
- 6- Radice M, Power P, Di Conza J. et al. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(2):

DISCUSSIONS

Le gène CTX-M était le gène majoritairement présent chez les souches de *E. coli* de notre étude avec un taux de portage de 93,74 %, dont 90,62 % de CTX-M-13 et 3,12 % de CTX-M-9. Le gène CTX-M-25 n'était trouvé dans aucune des souches testées. Viennent ensuite en deuxième et en troisième position les gènes OXA-1 et TEM avec respectivement 59,37 % et 28,12 %. Le gène SHV est porté par une seule souche.

En effet comme en atteste nos travaux, d'autres études avaient montré que le gène CTX-M était le gène le plus dominant et le plus répandu à travers le monde et CTX-M-13 était le plus fréquemment isolé. Ce dernier avait été signalé en Inde, en Bulgarie, au Canada, en France, en Italie, au Japon, en Roumanie, en Russie, en Turquie, en Argentine en Afrique (6, 7, 8, 9, 10, 11). Des études réalisées en Angleterre sur 291 souches d'*E. coli* productrices de BLSE avaient montré que 95,5 % des souches avaient le gène CTX-M du groupe 1, plus particulièrement le gène CTX-M-15 allèle très proche du gène CTX-M-13 et seuls 4,1 % avaient le gène CTX-M-9 (12). Rappelons que tous les clones isolés sans exception produisaient le gène CTX-M-13 alors que CTX-M-9 était porté par une seule souche isolée des urines et appartenant au clone C. Le gène CTX-M-25 était très rarement isolé non seulement chez *E. coli* mais chez toutes les entérobactéries. En effet, des études menées par Neil Woodford et al en 2006 sur 633 isolats d'entérobactéries productrices de BLSE avaient montré qu'aucune de ces souches ne portait le gène CTX-M-25 (13). En revanche, ce gène était fréquemment retrouvé chez les souches de *E. coli* d'Israël selon les études d'Inna Chmelnitsky et al en 2006 (14).

602-604.

7-Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(2):1-14.

8-Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob Chemother* 2002; 50(6):1031-4.

9- Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Can J Microbiol* 2004; 50(3):137-65.

10- Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, et al. Country wide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1):151-9.

11-Bou G, Cartelle M, Tomas M, et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J. Clin Microbiol* 2002; 40(11):4030-6.

12-Woodford N, WardME, KaufmannME, TurtonJE, FaganEJ, JamesD, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(4):735-43.

13-Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57(1):154-155.

14- Chmelnitsky I, Carmeli Y, Leavitt A, et al. CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum β -lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(11):4745-4750.