

EPIDEMIOLOGIE DES *ESCHERICHIA COLI* SECRETRICES DE BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU (BLSE) AU CENTRE NATIONAL HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE (CNHU) DE COTONOU.



AGUEMON B. ⁽²⁾, GUEDOU A. ⁽¹⁾, SAIZONOU J. ⁽³⁾, LALEYE D. ⁽¹⁾, ANAGONOU S. Y. ⁽¹⁾,

(1) Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou (CNHU) : Service de Microbiologie

(2) Faculté des Sciences de la Santé (FSS/UAC) : Unité de Santé Communautaire, Département de Santé Publique

(3) Institut Régional de Santé Publique (IRSP/UAC)

Auteur correspondant : Dr Badirou AGUEMON, Médecin Santé Publique - Epidémiologiste (FSS/UAC), 01BP 4680 Cotonou, Bénin. Tél. (+229) 97483574; Fax : (+229) 21305223. Email : baguemon@yahoo.fr

RESUME

Le but de cette étude est d'apprécier l'évolution épidémiologique des entérobactéries productrices de BLSE en particulier des souches d'*Escherichia coli* sécrétrices de bêta -lactamases isolées dans des prélèvements adressés au centre hospitalier de référence du CNHU HKM de Cotonou. Il s'agit d'une étude transversale descriptive portant sur 180 souches d'*E. coli* isolées des échantillons adressés au laboratoire de bactériologie du centre. La fréquence de la bactérie productrice de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) est d'environ 37.8%. Les souches *E. coli* sécrétrices de BLSE s'observent plus chez les hospitalisés que chez les non hospitalisés. La quasi-totalité des ces souches BLSE présentent une résistance aux β -lactamines, sauf à la céphamycine. La résistance est totale pour l'amoxicilline (AMOX : 100%), la ceftriaxone (CRO : 100%) et la céfotaxime (CTX : 100%). On note aussi une sensibilité très remarquable et forte aux carbapénèmes (IMP : imipénème) et une résistance accrue aux fluoroquinolones (NOR, CIP). La résistance d'*E. coli* aux antibiotiques prend de l'ampleur. L'antibiotique le moins actif sur *E. coli* à Cotonou est l'amoxicilline tandis que le plus actif est l'imipénème. La nécessité d'appliquer les méthodes-standard préconisées pour réaliser un antibiogramme fiable en vue d'une détection précise, correcte et précoce des bactéries multi résistantes reste primordiale dans le suivi épidémiologique de ces souches communautaires.

Mots clés : Antibiogramme, Résistance, *Escherichia coli*, BLSE, Epidémiologie, Cotonou

SUMMARY: The aim of this work is to appreciate the epidemiologic evolution of ESBL producing *Enterobacteriaceae*, in particular *Escherichia coli* producing β -lactamases in specimens addressed to the CNHU HKM reference hospital of Cotonou. It is about a descriptive cross-sectional study carrying on 180 strains of *E. coli* isolated from specimens addressed to the bacteriology laboratory of the center. The frequency of extended- spectrum β -lactamases producers (ESBLs) is approximately 37.8%. ESBL producing *E. coli* strains are more often found in samples from hospitalized patients. These ESBL producers are resistant to all β -lactams excepted cephamycine. The resistance is total for amoxicillin (AMOX: 100%), ceftriaxone (CRO: 100%) and cefotaxime (CTX: 100%). We also noticed a strong sensitivity to carbapenems (IMP: imipeneme) and a higher resistance to fluoroquinolones (NOR, CIP). Resistance of *E.coli* to antibiotics gains in increasing. The least active antibiotic on *E. coli* in Cotonou is amoxicilline while imipeneme is the most active. Precise, correct and early detection of multi-resistant bacteria by following standard methods in antibiogram realization remains primordial in epidemiologic follow-up of these Community strains.

Key words: Antibiogram, Resistance, *Escherichia coli*, ESBL, Epidemiology, Cotonou

INTRODUCTION:

Escherichia coli est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. Les souches d'*E.coli* sont naturellement sensibles à toutes les bêta-lactamines. Cependant, certaines souches peuvent produire à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible qui peut entraîner une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux céphalosporines de 1^{ère} génération (C1G). En

dehors de la résistance naturelle, certaines souches peuvent acquérir des résistances supplémentaires (résistance acquise) selon divers mécanismes pouvant être présents seuls ou en association [1, 2]. La résistance aux bêta-lactamines peut être consécutive à la production par les bactéries de bêta-lactamases (enzymes inactivant les bêta-lactamines) ; à la diminution partielle ou totale de la perméabilité membranaire externe soit par obturation des porines ou action de pompes à efflux ; pour certaines souches par

la conjonction de ces deux phénomènes. Aussi de très nombreuses bêta-lactamases existent et sont à déterminisme génétique chromosomique ou plasmidique, produites de façon inductible ou constitutive et touchant préférentiellement les pénicillines et/ou les céphalosporines et/ou les carbapénèmes. Parmi ces bêta-lactamases, certaines hydrolysent notamment les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Ce sont les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) d'origine plasmidique et les céphalosporinases déréprimées généralement d'origine chromosomique [2, 15]. D'autres enzymes, encore rares, hydrolysent les carbapénèmes : ce sont les carbapénémases qui sont de plusieurs types. *E.coli* est responsable en grande partie des infections des voies urinaires. Certains sérotypes (K1 en particulier) sont capables d'induire des septicémies néonatales compliquées ou non de méningites. De nombreuses autres infections lui sont attribuées, notamment des voies digestives (cholécystites, appendicites), génitales et respiratoires.

La prévalence croissante des BLSE en milieu communautaire pose un problème inédit par l'afflux de bactéries multirésistantes [16]. A ce jour, au Bénin, peu de données sont disponibles sur l'évolution épidémiologique

METHODE

Il s'agit d'une étude transversale descriptive et analytique, réalisée de manière prospective du 27 octobre 2012 au 27 décembre 2012. Elle a porté sur 180 souches d'*E. coli* consécutivement isolées d'échantillons d'urines, de pus, de sang, de LCR provenant de patients hospitalisés ou non.

- Confirmation morphologique

A partir de chacune des souches suspectes d'être *E. coli*, un frottis a été réalisé et coloré au Gram. L'observation a été faite au microscope ordinaire à l'objectif à immersion pour confirmer qu'il s'agit bien d'un bacille à Gram négatif.

- Identification

L'identification des souches a été faite à l'aide de la galerie API 20E. La lecture est faite après 24 heures d'incubation.

- Etude de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a ensuite été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. La lecture brute de l'antibiogramme est basée sur

des entérobactéries productrices de BLSE et plus particulièrement les *E. coli* sécrétrices de bêta-lactamases afin de mieux comprendre cette problématique de santé publique. Afin de combler ce vide, nous sommes intéressés à la recherche des caractéristiques épidémiologiques des souches d'*Escherichia coli* isolées à partir de prélèvements de patients hospitalisés ou ambulatoires adressés au service de bactériologie du CNHU de Cotonou, ainsi qu'à leur sensibilité aux antibiotiques.

CADRE:

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de bactériologie-virologie du Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert K. MAGA (CNHU-HKM) de Cotonou, hôpital national de référence. Divers examens sont réalisés dans ce service, notamment des examens cyto-bactériologiques des urines, des sécrétions cervico-vaginales et urétrales, des pus et sérosités, des crachats, des liquides de ponctions (liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, liquide d'ascite, liquide synovial, liquide prostatique, etc.); d'autres non moins importants comme le spermogramme-spermocytogramme; la spermoculture; la coproculture; l'hémoculture et la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants(BAAR).

la mesure du diamètre des zones d'inhibition comparé aux diamètres critiques.

Les mécanismes de résistance sont recherchés, en particulier les actions des BLSE, objet de l'étude. Les BLSE sont mises en évidence par différents tests dont le plus utilisé est la recherche de synergie entre l'acide clavulanique et les C3G, C4G et aztréonam. Cette synergie se manifeste par une image en « bouchon de champagne ». Le respect de la distance entre les disques est important pour une meilleure mise en évidence de l'image. Au moindre doute, il est recommandé d'éloigner ou de rapprocher les disques pour obtenir une image plus nette. La validité des différents tests est déterminée par l'introduction de souches référence *E. coli* ATCC 25922 dans nos manipulations pour vérifier la qualité des consommables utilisés et nos conditions opératoires. L'analyse statistique des données a été faite par le logiciel Epi-info version 3.5.1, le test χ^2 de Pearson a été utilisé avec un seuil de signification fixé à 5%.

RESULTATS :

La réalisation de l'antibiogramme à partir des différents antibiotiques testés permet d'observer les résultats du tableau I ci-dessous :

Tableau I : Antibiogramme des 180 souches isolées dans le service

Antibiotiques		Souches <i>E. coli</i>					
		Sensible (S)		Intermédiaire (I)		Résistant (R)	
		N	%	N	%	N	%
Amoxicilline	AMX	14	7.8	7	3.9	159	88.3
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	92	51.1	35	19.4	53	29.5
Céfoxitine	FOX	158	87.8	3	1.7	19	10.5
Ceftriaxone	CRO	110	61.1	0	0	70	38.9
Céfotaxime	CTX	110	61.1	0	0	70	38.9
Ceftazidime	CAZ	115	63.9	2	1.1	63	35
Céfépime	FEP	123	68.3	10	5.6	47	26.1
Imipénème	IPM	180	100	0	0	0	0
Norfloxacine	NOR	64	35.5	5	2.8	111	61.7
Ciprofloxacine	CIP	78	43.3	3	1.7	99	55
Tétracycline	TE	23	13	0	0	157	87
Doxycycline	DO	18	10	2	1.1	160	88.9
Chloramphénicol	C	92	51.1	7	3.9	81	45
Néthilmicine	NET	93	51.7	0	0	87	48.3
Nitrofurantoïne	FT	166	92	0	0	14	7.8
Triméthoprime-Sulfaméthoxazole	SXT	19	10.6	0	0	161	89.4

Des 180 souches isolées dans le service, la fréquence d'*Escherichia coli* productrice de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est d'environ 37.8%. Les souches proviennent des patients ambulatoires donc non hospitalisés dans 76% des cas contre 24% pour les hospitalisés au centre. Les souches *E. coli* sécrétrices de BLSE s'observent plus chez les hospitalisés que chez les non hospitalisés. Mais cette différence n'est pas statistiquement significative (tableau II).

Tableau II : Répartition des souches d'*Escherichia coli* producteurs ou non de BLSE en fonction des patients

Souches <i>E. coli</i>	Patients non hospitalisés		Patients hospitalisés		Total	p
	Fréquence	(%)	Fréquence	(%)		
BLSE non positive	89	65.0	23	53.5	112	0.175
BLSE positive	48	35.0	20	46.5	68	
Total	137	100	43	100	180	

La figure n° 1 montre que 156 (87%) des souches d'*Escherichia coli* isolées dans le service de bactériologie proviennent des prélèvements d'urines. Parmi elles 55 (35.3%) sont des souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) contre 101 (64.7%) qui sont des souches non BLSE.

La quasi-totalité des souches BLSE présentent une résistance aux bêta-lactamines, à l'exception des céphamycines (80.9% de sensibilité à la céfoxitine : FOX). La résistance est quasi-totale pour l'amoxicilline (AMOX : 100%), la ceftriaxone (CRO : 100%) et la céfotaxime (CTX : 100%). L'association amoxicilline+acide clavulanique restaure seulement 18 souches, soit 26,7% de sensibilité. L'analyse des données de l'antibiogramme a permis de noter également une sensibilité très remarquable et forte aux carbapénèmes (IMP : Imipénème, 100% de sensibilité aux bêta-lactamines BLSE). La différence de niveau de sensibilité entre les souches BLSE et les souches non BLSE est statistiquement significative (p <0.05) (Figure n°2).

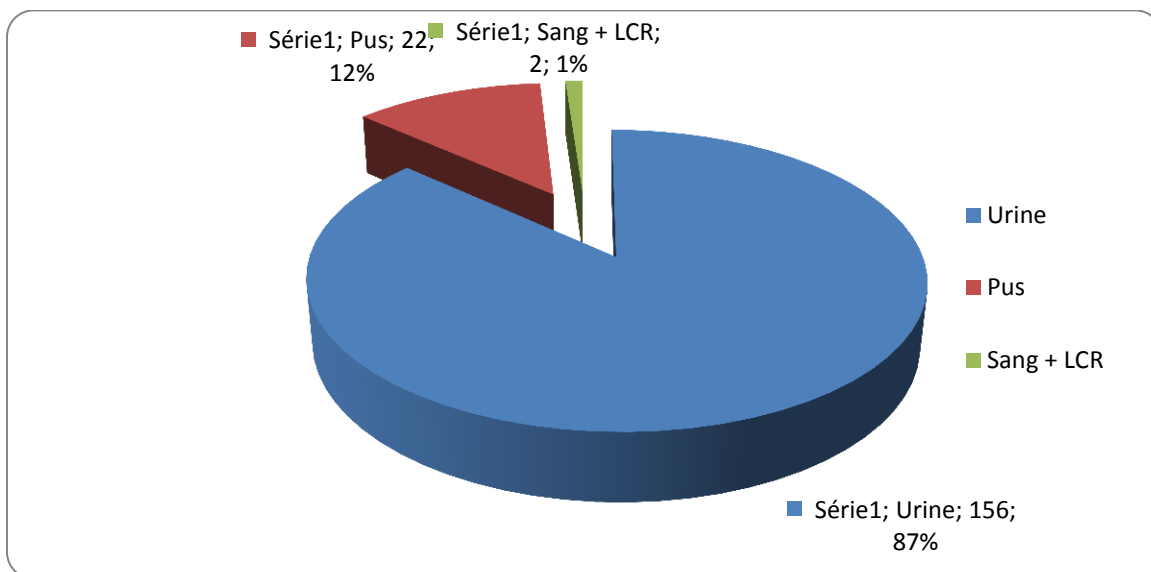


Figure n°1: Répartition des souches en fonction des sites de prélèvement

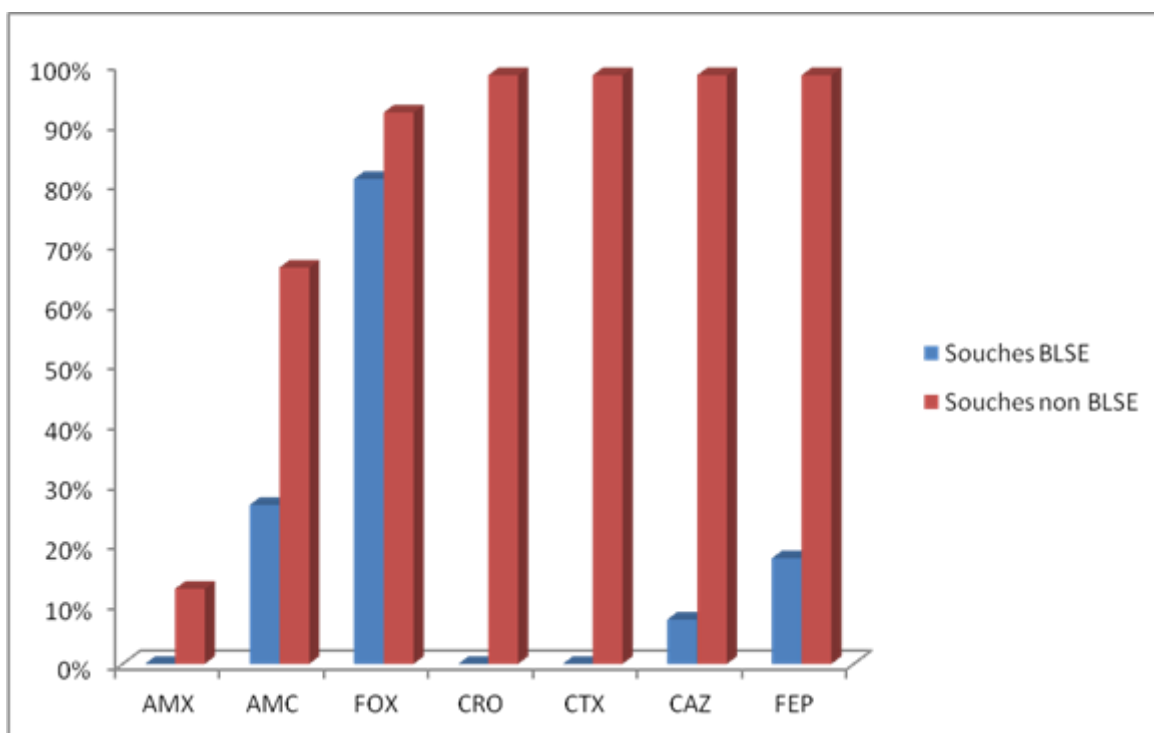


Figure n°2 Répartition des souches en fonction de leur sensibilité aux bêta-lactamines

L'étude de la sensibilité des souches étudiées aux autres antibiotiques a permis de noter que la présence d'une BLSE est associée à une résistance accrue aux Fluoroquinolones (NOR, CIP) et la différence avec les souches non BLSE est statistiquement significative ($P < 0.05$). Il en est de même pour la sensibilité de ces souches aux cyclines (figure n° 3)

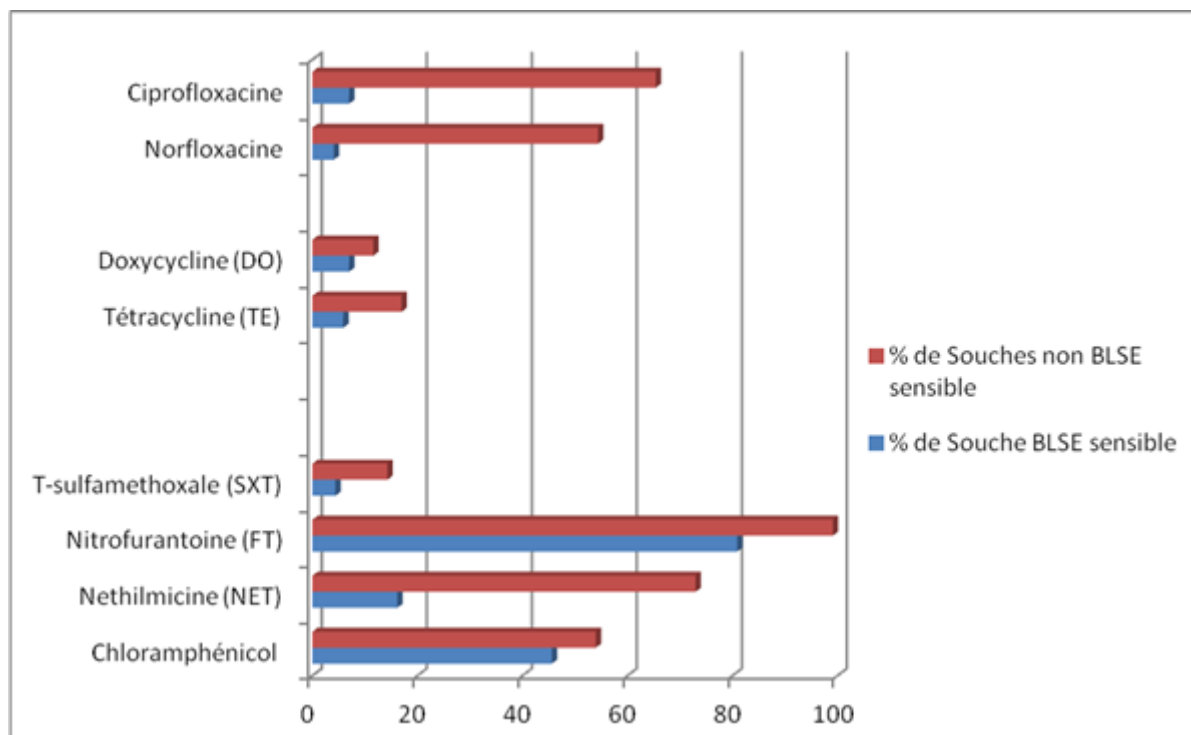


Figure n°3 Répartition des souches en fonction de leur sensibilité aux autres antibiotiques

DISCUSSION

Cette enquête préliminaire sur l'épidémiologie des BLSE dans le service a permis de noter que la majorité des souches isolées proviennent des échantillons d'urines. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui montrent en effet que les infections urinaires représentent l'infection bactérienne la plus diagnostiquée dans un laboratoire de bactériologie et que *E. coli* est de loin la bactérie la plus fréquemment isolée dans ces infections [3,5,6]. La grande fréquence d'*Escherichia coli* dans les infections urinaires serait liée à la présence au niveau de la structure bactérienne d'adhésines capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales [3].

Dans notre étude, les données ont montré que les souches *E. coli* sécrétrices de BLSE s'observent plus chez les hospitalisés que chez les non hospitalisés. Cette observation corrobore les résultats des études réalisées par plusieurs auteurs qui montrent qu'elles sont indifféremment isolées en milieu hospitalier ou communautaire et semblent endémiques dans les établissements de long séjour [6, 10, 11, 14].

De toutes les bêta-lactamines testées, l'Amoxicilline était la moins active avec 7,8% de sensibilité. Ce résultat est similaire aux 5,7% trouvés par HOUNKPE en 2006 dans les

urines communautaires à Cotonou [7]. Dans notre étude, 51,1% des souches étaient sensibles à l'association Amoxicilline et Acide clavulanique. Ce chiffre est supérieur aux 29,1% rapportés par ADE *et al* en 2002 [8] et 20,4% trouvés par AFFOLABI *et al* en 2012 à Cotonou [9]. On note donc une augmentation de sensibilité par rapport aux années antérieures. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que cet antibiotique est de moins en moins utilisé en clinique au profit des C3G comme la Ceftriaxone ou le Céfotaxime. Au total, 61,1% des souches étaient sensibles à la Céfotaxime (C3G) ; un taux en baisse par rapport aux 95,4% rapportés par AFFOLABI *et al* en 2012 à Cotonou [9].

L'Imipénème est l'antibiotique le plus actif avec 100% de sensibilité ; ce qui corrobore les 93% trouvés par MUVUNYI en 2011 au Rwanda [4]. L'Imipénème reste toujours une molécule très active, et apparaît souvent, pour le clinicien, comme le dernier recours thérapeutique [15]. La forte sensibilité à l'Imipénème observée dans l'étude est une indication claire que la résistance aux carbapénèmes est encore exceptionnelle chez les souches d'*E. coli* à Cotonou. Cela peut s'expliquer par l'utilisation peu fréquente de cet antibiotique dans les pays en développement en raison de son coût et de sa disponibilité limitée.

Plus de une souche sur trois parmi les *E. coli* isolées dans l'étude sont productrices de

BLSE. Ce taux est 30 fois plus élevé que celui rapporté par BOURJILAT *et al* en 2009 au Maroc, soit 1,3% [3]. Par contre ce résultat est proche des 38,3% trouvées par MUVUNYI *et al* en 2011 au Rwanda [4]. Aussi, la grande majorité des souches BLSE de l'étude présentent une résistance aux les bêta-lactamines à l'exception de la Céphamycine (Céfoxitine) et des carbapénèmes (Imipénème) et. Nous avons observé une sensibilité des souches de 7,4% à la Ceftazidime et de 17,7% au Céfépime selon les nouvelles recommandations de la SFM (Société Française de Microbiologie). Au regard des précédentes recommandations de la SFM, ces souches auraient été considérées comme intermédiaires à ces antibiotiques. Compte tenu de leur prévalence limitée et de l'usage peu courant en routine à Cotonou, ces nouvelles recommandations auront donc peu d'impact sur l'utilisation de ces antibiotiques dans notre environnement de travail.

Les études antérieures réalisées à Cotonou avaient montré des pourcentages plus élevés de sensibilité aux Fluoroquinolones [8,9].

Nos résultats ont montré une baisse progressive de la sensibilité d'*E. coli* sécrétrices de bêta-lactamases aux quinolones et cette résistance est liée probablement à l'usage à grande échelle et souvent inappropriée de ce groupe d'antibiotiques. La même observation a été faite par BOURJILAT au Maroc et MUVUNYI au Rwanda [3,4]. Il existe donc un lien probable entre la capacité de libérer la BLSE et la résistance aux quinolones mais le mécanisme de cette association n'est pas encore élucidé.

La résistance à la Nitrofurantoïne est quasiment nulle ; ceci peut s'expliquer en partie par le fait que cette molécule a des indications limitées, utilisée uniquement dans les infections génito-urinaires.

CONCLUSION

La résistance d'*E. coli* aux antibiotiques prend de l'ampleur. L'antibiotique le moins actif sur *E. coli* à Cotonou est l'Amoxicilline tandis que le plus actif est l'Imipénème. La production de BLSE représente le mécanisme de résistance le plus fréquent et en cas de BLSE, la quasi-totalité des souches sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération en considérant les nouvelles recommandations de la Société Française de Microbiologie. Ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer les méthodes-standard de réalisation de l'antibiogramme en vue d'une détection précise, correcte et précoce des bactéries multirésistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 COURVALIN P., LECLERCQ R., BINGEN E. Antibiogramme, édition ESKA Paris 2006, 693 p.
- 2 COQUE T. M., NOVAIS A., CARATTOLI A., POIREL A., PITOUT J., PEIXE L., BAQUERO F., CANTON R., NORDMANN P. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 195–200.
- 3 BOURJILAT F., DERSI N., BOUCHARIF B., AMAROUCHE H., TIMINOUNI M. Profil de résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* uropathogènes communautaires au Maroc. *Eur J Sci Res* 2009; 38: 57-62.
- 4 MUVUNYI C M., MASAI F., BAYINGANA C., MUTESA L, USEMAKWERI A., MUHIRWA G., CLAEYS G. W. Diminution de la sensibilité aux agents antimicrobiens couramment utilisés dans les bactéries pathogènes isolées d'infections urinaires au Rwanda: Nécessité de nouvelles lignes directrices antimicrobiens, *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(6) : 923-928.
- 5 ARPIN C., QUENTIN C., GROBOST F., CAMBAU E., ROBERT J, DUBOIS V., COULAGE L., ANDRE C. Nationwide survey of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1205–1214.
- 6 ANDREU A., PLANELLS I. Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study. *Med Clin* 2008; 130: 481–486.
- 7 HOUNKPE C. Niveau de sensibilité aux antibiotiques des bacilles Gram négatif d'infections urinaires communautaire à Cotonou. Thèse de doctorat en médecine FSS/UAC, Benin, 2006 ; 77 p.
- 8 ADE G., ZANNOU D., AMOUSSOU-GUENOU D., YEHOUESSI-VIGNIKIN B., PODIE MAGNE N.K., ANAGONOU Y. S., HOUNGBE F. Les bases d'antibiothérapie probabiliste dans les infections urinaires à Cotonou. *Bénin médical* 2002; 21: 26-29.

- 9 **AFFOLABI D., ADE G., BANKOLE H., HOUNKPE C., SATCHI A., SOGLO DANSI E., ANAGONOU Y. S.** Evolution de la résistance aux antibiotiques dans les infections bactériennes courantes à Cotonou. *Journal de la Société de Biologie Clinique-Bénin* 2012; 16: 79-83.
- 10 **TENA D., GONZALEZ-PRAETORIUS A., GONZALEZ JC., HEREDERO E., ILLESCAS S., de BARANDA C.S., SESENA G.** Changes in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from community diagnosed urinary tract infections during the period 2003-2007. Multicentre study in Castilla la Mancha (Spain). *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23(1): 36-42
- 11 **ADJIDE C.C., BIENDO M., ROUSSEAU F., HAMDAD-DAOUDI F., THOMAS D., LAURANS G., CANARELLI B., OBIN O., HENICQUE M., SCHMIT J-L.** Extended-spectrum betalactamases producing *Escherichia coli*: a new health-care associated infection threat? *Pathol Biol* 2006; 54(8-9): 510-517.
- 12 **MAHMAL L., LOUKILI A., HARIF M., QUESSAR A., BEN BECHIR M., BEN CHEKROUN S.** Germs that produce the extended-spectrum betalactamases. *Tunis Med* 2004; 82(11): 1006-1011.
- 13 **STOBBERINGH EE., ARENDS J., HOOGKAMP-KORSTANJE JA.** Occurrence of extended-spectrum betalactamases (ESBL) in Dutch hospitals. *Infection* 1999; 27(6): 348-54.
- 14 **SABATE M., VERGES C., MIRO E., MIRELIS B., NAVARRO F., Del RIO E., PRATS G.** Incidence of extended- spectrum betalactamases in *Escherichia coli* in a university hospital from 1994-1996. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1999; 17(8): 401-404.
- 15 **Smith RD, Coast J.** Antimicrobial resistance: a global response. *Bull World Health Organ* 2002; 80: 26-33.
- 16 **Goldstein FW.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. Multicentre Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 112-117.