

Profil phénotypique et génotypique des entérobactéries d'origine hospitalière isolée à partir de quatre hôpitaux marocains durant 2011 et 2012

[Phenotypic and genotypic profile of isolated hospital-enterobacteria from four Moroccan hospitals during 2011 and 2012]

Z. Mennane¹, A. Qasmaoui¹, H.L. Sahraoui², K. Halout¹, J. Hamamouchi¹, K. Khedid¹, R. Bahbah³, M. Bourchid⁴, N. Baghdadi⁵, and R. Charof¹

¹Département Bactériologie Médicale, Institut National d'Hygiène Rabat, Maroc

²Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des sciences Kénitra, Maroc

³Laboratoires Médicales régional de Beni Mellal, Maroc

⁴Laboratoires Médicales régional de Oujda, Maroc

⁵Laboratoires Médicales régional de Settat, Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: 73 enterobacteria which isolated from four regional hospitals Moroccans during 2011 to 2012 were referred to The National Institute of Hygiene (INH). For all isolates Phenotyping and genotyping were conducted. Biochemical was performed by galleries Api20E (bioMérieux). Distribution of disks on Mueller Hinton ager was used for antibiotic susceptibility test. Resistance genes (CTX, SHV and TEM) was carried out by molecular biology for genotyping. Among all Enterobacteriaceae *Escherichia coli* was prevalent, followed by *Klebsiella pneumoniae*. The most common phenotype was the genotyping expanded spectrum lactamase"ESBL», CTX was the most predominant for enterobacteria ESBL with an expression estimated at 45%.

KEYWORDS: enterobacteria, phenotyping, genotyping, genes, resistance.

RESUME: L'Institut National d'Hygiène « l'INH » a reçu 73 entérobactéries isolées des quatre hôpitaux régionaux Marocains « sites » durant les années 2011 et 2012 pour réaliser le phénotypage et le génotypage de ces dernières. L'identification biochimique est effectuée par des Galeries Api20E(Biomérieux), l'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur Mueller Hinton, quant au génotypage a été réalisé par la biologie moléculaire en recherchant les gènes de résistance (CTX, SHV et TEM). *Escherichia coli* reste l'espèce la plus prédominante parmi les entérobactéries adressées à l'INH, suivi des *Klebsiella pneumoniae*, le phénotype le plus fréquent est la bêta-lactamase de spectre élargi « BLSE », quant au génotypage, le CTX reste Le gène de résistance le plus prédominant pour les entérobactéries BLSE avec une expression estimée à 45%.

MOTS-CLEFS: entérobactéries, gènes, résistance, phénotype, génotype.

1 INTRODUCTION

Les Infections hospitalières constituent un problème de santé publique dans les hôpitaux dans le monde entier y compris le Maroc. En outre, la résistance des bactéries aux antibiotiques est responsable d'une augmentation significative de la morbidité, de la mortalité et de l'augmentation du coût des dépenses en soins de santé.

Les infections sont plus importantes lorsqu'elles sont causées par des bactéries résistantes aux antimicrobiens ([1], [2]). Parmi ces bactéries, Enterobacteriaceae résistant aux céphalosporines à spectre étendu, résistant aux carbapénèmes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* résistant à la ciprofloxacine et les Enterobacteriaceae bacilles à gram négatif non fermentaires (NFGNB) sont de grande préoccupation ([3],[4])

L'augmentation de la fréquence relative des entérobactéries productrices de BLSE a été observée aussi bien dans les centres de soins ([5], [6]) qu'en dehors ([7], [8]). Leur dissémination marquée par des grandes disparités géographiques [9] est, à l'heure actuelle, un problème mondial de santé publique. Parmi ces entérobactéries, les *Escherichia coli* (Esc) responsables de 90 % voire plus des infections urinaires communautaires et un des germes majeurs des infections urinaires nosocomiales qu'ont connu une fulgurante augmentation de leur niveau de résistance aux agents antimicrobiens ([10], [11]). De plus, l'implication des souches d' *E coli* BLSE dans les infections tellement communautaires que nosocomiales est croissante [12].

L'objectif de cette étude, c'est la recherche des caractères phénotypiques et génotypiques des bactéries hospitalières de profil isolées des quatre hôpitaux marocains.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 ECHANTILLONNAGE

73 entérobactéries isolées des quatre hôpitaux régionaux Marocains « sites » durant les années 2011 et 2012 ont été envoyés au laboratoire de bactériologie à l'Institut d'Hygiène Rabat pour la caractérisation phénotypique et génotypique.

2.2 IDENTIFICATION ET ANTIBIOGRAMME

- L'identification biochimique : les Galeries Api20E(Biomérieux) ont été utilisés dans ce test.
- L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur Mueller Hinton et interprété selon les normes de la Commission européenne de l'antibiogramme(13).

2.3 TECHNIQUES MOLÉCULAIRES

Le génotypage a été réalisé par la biologie moléculaire en recherchant les gènes de résistance (CTX, SHV et TEM).

2.3.1 EXTRACTION DE L'ADN TOTAL

L'ADN total a été extrait par un choc thermique à bain sec à une température de 100 ° C pendant 10 minutes et puis il est refroidi immédiatement dans la glace. Après 10 minutes de la centrifugation à 12 000 tours / minute, le surnageant est stocké à -20° C jusqu'à l'utilisation.

2.3.2 REACTION EN CHAÎNE PAR POLYMERASE : PCR

Amplification des gènes codants des CTX - M Groupe 1, TEM, enzyme SHV a été effectuée à l'aide des « amorces » spécifiques [14] (tableau 1),

Le mélange pour les réactions de PCR était composé d'une unité de la Taq polymérase, 0,4 mM de chaque amorce, 100 mM de chaque désoxy-nucléoside triphosphate, 0,5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris – HCl à pH 8,3 et 50 mM KCl. Un microlitre de l'ADN a été ajouté à un volume final de 50 µl.

La réaction a été effectuée dans un thermocycleur, sur les modalités d'amplifications (tableau 2).

2.4 REVELATIONS DU PRODUIT PCR PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les produits PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 1 %. Le tampon utilisé pour la préparation du gel c'est le TBE 1 X (Tris Borate EDTA).

La migration) est effectuée en utilisant un générateur de courant à une tension de 90 Volts pendant 45 minutes environ. Le gel est ensuite visualisé à l'aide d'une courte longueur d'onde aux UV

Tableau 1 : amorces de CTX-M ,SHV et TEM

Les genes		Primer
CTX-M	CTX-MF	50 - ATGTGCAGYACCAGTAARGT – 30
	CTX-MR	50 - ACCGCRA TRTCRTTGGTKGT – 30
TEM	TEML	50 - ATGAGTATTCAACATTT – 30
	TEMR	50 - TTACCAATGCTTAATCA – 30
SHV	OS5	50 - TTATCTCCCTGTTAGCCACC – 30
	OS6R	50 - GATTGCTGATTCGCTCGG – 30

Tableau 2: Conditions d'amplification par PCR des gènes SHV, TEM, CTX- M.

gène	Etape initiale	Dénaturation, hybridation, élongation	Nombre de cycles	Etape finale
CTX-M	94°C 5 min	94°C 30s/56°C 30s/ 72°C 45s	30	72°C 7min
SHV	94°C 5 min	94°C 30s/55°C 30s/ 72°C 30s	25	72°C 7min
TEM	94°C 5 min	94°C 30s/42°C 30s/ 72°C 30s	25	72°C 7min

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉPARTITION TOTALE DES GERMES REÇUS

Au cours de l'année 2011-2012 l'unité a reçu 73 entérobactéries des quatre sites, La répartition des souches est présentée sur la figure1.

Les espèces isolées pendant cette période correspondent essentiellement à *Escherichia coli* (*E.coli*) en premier (53%) suivis par *Klebsiella pneumoniae* (Kp) (29.5%) en 2 ieme position et *Enterobacter cloacae*(Ent cl) et *proteus spp* en 3 ieme (6%) ces résultats sont proches à ceux qui sont trouvés par Nadmi H, et al [15], et H. Ben Abdallah et al [19]

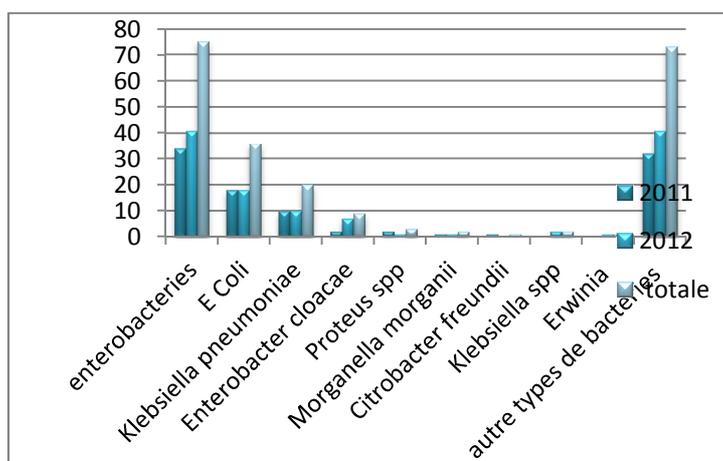


Figure1 : Répartition totale des germes reçus

3.2 REPARATION DES GERMES PAR SERVICE ET NATURE DE PRELEVEMENT DANS LES 4 SITES

Selon les résultats 46°/° des prélèvements sont d'origine urinaire suivit par les pus qui représentent 20% et les prélèvements distal protégé viennent en 3 ieme position avec un taux de 11%

Selon les résultats (tableau 3) et à part le service externe le service médecine est classé en premier (31%) dont les majorités des prélèvements (82,5%) ont été isolés à partir des urines avec la prédominance de *Klebsiella pneumoniae* (KP) et *E.coli* suivi du service de la chirurgie (25,5%) et dont les urines et les pus présentent un taux de 86% et que *E.coli*, KP et Ent cl ,prolifèrent dans ce service. Alors en troisième position vient la réanimation à un taux de (13%) et dont les urines et les cathéters centraux prédominent à 57% et que les bactéries Ent clo et KP sont les espèces les plus fréquemment isolées.

Tableau3 : Réparation des germes par service et par nature de prélèvement

service	nombre des bactéries	Les bactéries prédominantes	Prélèvements prédominantes
Médecine	17	(10Kp; 7 E col ;)	14urines; 6 pus
chirurgie	14	(4 Ent cl; 4 kP ; 5E col)	6pus ; 6 urines
Réanimation	7	(4Ent Clo;3KP)	2Urines; 2cathéters centraux
externe	17	(12Ecol)	14urines

3.3 LES SOUCHES IDENTIFIEES DANS LES QUATRE SITES ET LEURS PHENOTYPES :

Le phénotype le plus prédominant est le BLSE (51,5 %/°) suivi de la céphalosporinase de haut niveau (28°/°) et en 3ieme classe vient la pénicillinase haut niveau (7,5%) (figure 2)

L'analyse ces différentes bactéries envoyées par les quatre provinces montre la prédominance des entérobactéries à un taux de 53% dont les entérobactéries BLSE représentent 51%.

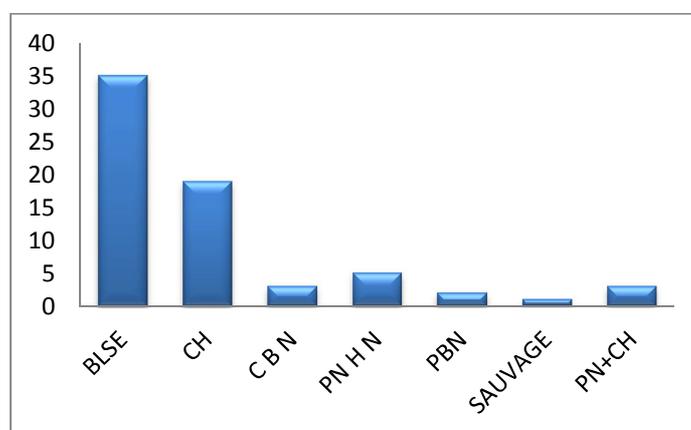


Figure 2 : Répartition des souches selon leurs phénotypes.

Légende:

- BLSE : bétalactamase à spectre élargi
- CH : céphalosporinase de haut niveau
- PHN : Pénicillinase haut niveau
- CBN : céphalosporinase de bat niveau

3.4 RESULTAT D'ANALYSES PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE DES ENTEROBACTERIES BLSE

Parmi les gènes responsables de la production de BLSE, on trouve le CTX M, le SHV et le TEM ou parfois on peut trouver deux gènes ou plus qui s'expriment au même temps.

Dans notre cas le gène le plus prédominant est le CTX qui s'exprime chez 45% des entérobactéries BLSE (Tableau 4) il est inférieur au taux trouvé par Tabbouche Sana (2011) [17] et similaire aux résultats trouvés par C. Giraud-Morin et al (2008) [18] et en combinaison avec TEM, il s'exprime pour 20.8% de ces bactéries. Alors le SHV en combinaison avec CTX ou seule ne s'exprime que pour 16.60%.

Tableau4 : Nombre de souches qui s'expriment pour les gènes CTX, SHV et TEM

gènes	Nombre de souches
CTX	11
SHV	5
TEM	0
CTX-TEM	4
CTX-SHV	4

4 CONCLUSION

Escherichia coli reste parmi Les entérobactéries la plus responsable des infections hospitalières, suivi des *klebsiella pneumoniae* en deuxième position. Les phénotypes les plus fréquents sont en premier la bêta lactamase à spectre élargi « BLSE », suivi du phénotype céphalosporinase de haut niveau, la pénicillinase de haut niveau, les carbapénémase, quant au génotypage le CTX reste le gène de résistance le plus prédominant pour les entérobactéries BLSE avec une expression estimée à 45%.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements aux responsables et le personnel des unités de bactériologie (S. Natoubi, Omar, amal...) dans les laboratoires Médicales régionaux successivement de Settat, Beni Mellal, Tétouan et d'Oujda.

RÉFÉRENCES

- [1] Archibald L., Phillips L., Monnet D., McGowan JE Jr., Tenover F., Gaynes R., Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 24:211-215 (1997).
- [2] Flamm RK., Weaver MK., Thornsberry C., Jones ME., Karlowsky JA., Sahm DF., Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002., *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2431-6 (2004).
- [3] Fridkin SK., Steward CD., Edwards JR., Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States hospitals: project ICARE phase 2. Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) hospitals., *Clin Infect Dis.* 29:245-52 (1999).
- [4] Hsueh PR., Teng LJ., Chen CY., Wen-Hwei Chen., Shen-Wu H., Kwen-T., Pandrug-resistant *Acinetobacter Baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan., *Emerg Infect Dis.* 8:827-32 (2002).
- [5] Kim YK., Pai H., Lee HJ., Park SE., Choi EH., Kim J., Kim JH., Kim EC., Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome., *Antimicrob Agents Chemother* 46(5):1481-91 (2002).
- [6] Nijssen S., Florijn A., Bonten MJ., Schmitz FJ., Verhoef J., Fluit AC., Betalactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates., *Int J Antimicrob Agents.* 24(6):585-91
- [7] Arpin C., Dubois V., Coulange L., Andre C., Fischer I., Noury P., Grobost F., Brochet, J. P., Jullin, J., Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers., *Antimicrob Agents Chemother.* 47(11):3506 (2003).
- [8] Woodford N., Ward ME., Kaufmann ME., Turton J., Fagan EJ., James D., Johnson AP., Pike R., Warner M., Cheasty T., Pearson A., Harry S., Leach JB., Loughrey A., Lowes JA., Warren RE., Livermore DM. J., Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *Antimicrob Chemother.* 54(4) 735-43 (2004).

- [9] Winokur PL., Canton R., Casellas JM., Legakis N., Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum betalactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region., *Clin Infect Dis.* (32) 94-103 (2001).
- [10] Gupta K., Hooton TM., Stamm WE., Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections., *Ann Intern Med.* 135 (1):41-50 (2001).
- [11] Gupta K., Addressing antibiotic resistance., *Am J Med.* 113 29-34 (2002).
- [12] Brigante G., Luzzaro F., Perilli M., Lombardi G., Coli A., Rossolini GM., Amicosante G., Toniolo A., Risk factors for the development of extended-spectrum betalactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients., *Int J Antimicrob Agents.* 25(2)157-62(2005).
- [13] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.
- [14] Thabaut A., Meyran M., In-vitro activity of tazobactam (YTR 830) and piperacillin combinations against 224 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* harboring known -lactamase. *Pathological Biology.* (39) 361-6 (1990)
- [15] Nadmi H., Elotmani F., Talmi M., Zerouali K., Perrier-Gros-Claude J.D., Timinouni M., Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc), *Med Mal Infect.* 10 1016 (2009).
- [16] Nadmi H., Elotmani F., Talmi M., Zerouali K., Perrier-Gros-Claude J.D., Timinouni M., Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées dans la région de monastir., *Progrès en Urologie.* 24 1058 - 1062(2014)
- [17] Tabbouche S., Khudary R., Beyrouthy R., Dabboussi F., Achkar M., Mallat H., Hlais S., Hamze M., Detection of genes TEM, OXA, SHV and CTX-M in 73 clinical isolates of *E.coli* ESBL and determination of their susceptibility to antibiotics., *International Arabic Journal of Antimicrobial Agents.* (1) 1:5 (2011)
- [18] Giraud-Morin C., Fosse T., Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007), *Pathologie Biologie.* 56) 417-423 (2008).