





## Moyens de détection des BLSE

Dr M Walfi, Pr K Zerouali

Laboratoire de Bactériologie-Virologie et Hygiène, CHU Ibn Rochd, Casablanca

#### Introduction

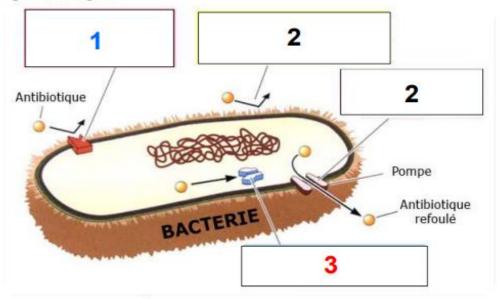
- Les β-lactamines antibiotiques essentielles à la prise en charge des infections dues aux entérobactéries
- L'identification des mécanismes de résistance naturelle et acquise est essentielle à l'analyse de l'antibiogramme des souches d'entérobactérie
- La complexité de cette analyse s'est accrue avec l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance comme la production de β-

lactamases

Méthodes de détection des BLSE repose sur des approches phénotypiques et génotypiques

## Mécanismes de résistance aux ATB chez les entérobactéries

- 3 grands mécanismes de résistance aux AB
- 1- Modification de la cible
- 2- Défaut de pénétration
- 3- Modification enzymatique



## Modification enzymatique

- Pénicillinase: Activité restaurée par IBLA (ac. clavulanique, tazobactam)
- Céphalosporinase: Résistante aux IBLA et inductible par les βlactamines
- BLSE: Résistante aux pénicillines, céphalosporine et à l'aztréonam, la sensibilité aux associations pénicillines-inhibiteurs de βlactamases est souvent conservée
- Carbapénémase: Présente une diminution de sensibilité aux carbapénèmes

#### **Définition**

 Les BLSE sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes appartenant majoritairement à la classe A de la classification des β-lactamases selon Ambler

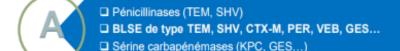
 Elles hydrolysent habituellement l'ensemble des pénicillines, des céphalosporines et des monobactames à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes

 Elles sont généralement inhibées par les inhibiteurs classiques des bêta-lactamases

#### Classification

(enzymes capables d'hydrolyser le cycle β -lactam)

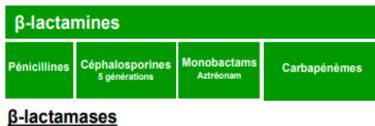
#### Classification d'Ambler













Class B metallo-enzymes

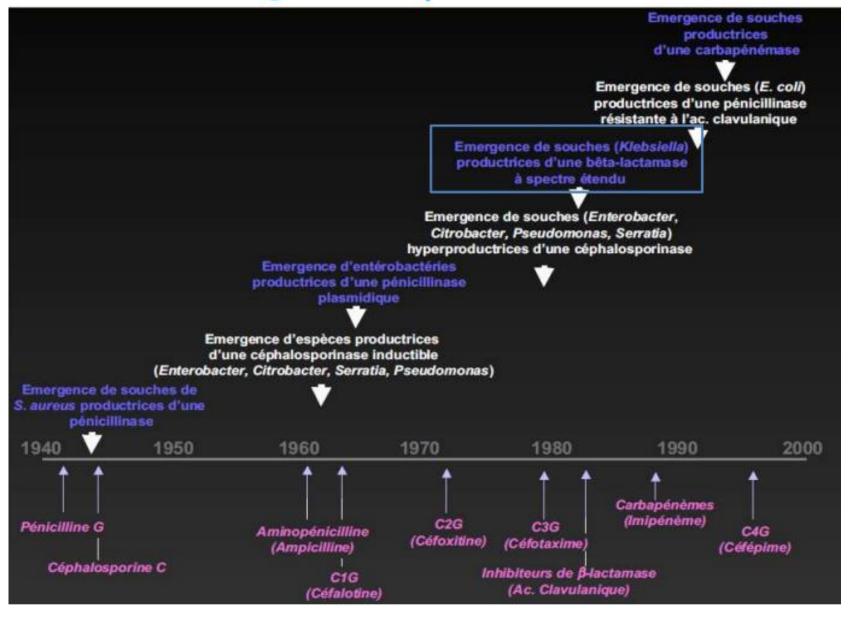
NDM, VIM, IMP

Class C cephalosporinases



**OXA-48** 

#### Emergence des β-lactamases ...



#### Epidémiologie des EBLSE

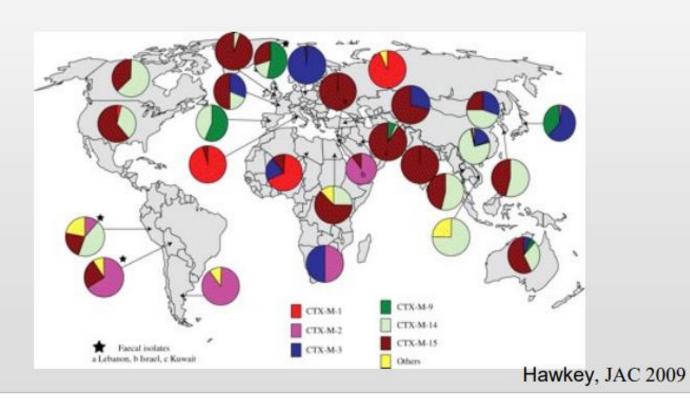
1980 : E. coli TEM-3,

K. pneumoniae SHV-4

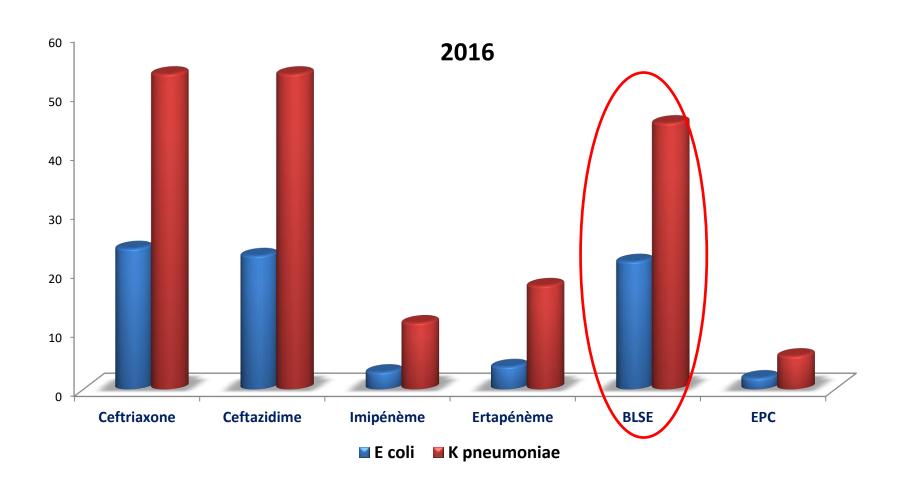
E. aerogenes TEM-24...

Infections nosocomiales

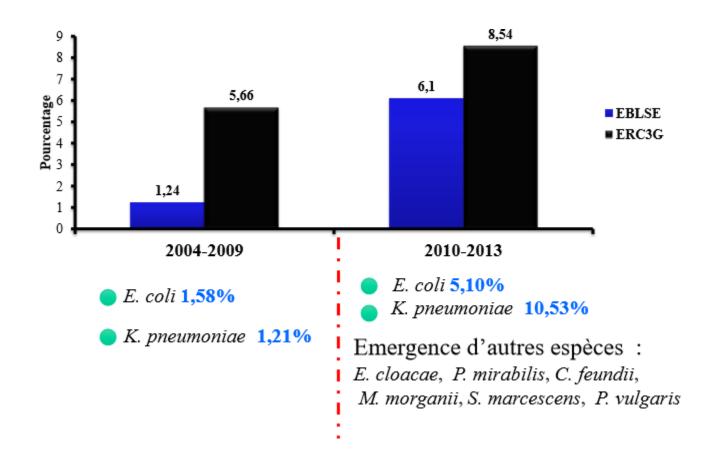
2000 : E. coli CTX-M



## Etat de résistance de K pneumoniae / E coli au CHU Ibn Rochd - Casablanca



# Evolution des EBLSE communautaires (2004 à 2013)



## Méthodes de détection des BLSE au laboratoire

- Au laboratoire de microbiologie, deux approches sont possibles pour la détection de BLSE :
- la détection phénotypique : la capacité de l'enzyme à hydrolyser certaines céphalosporines et la capacité de l'acide clavulanique à contrecarrer cette hydrolyse

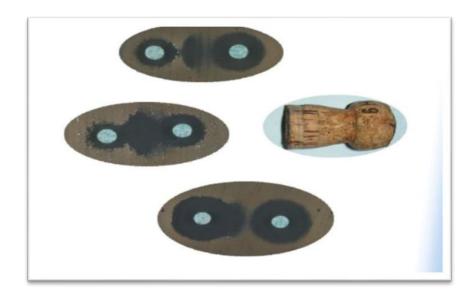
➤ la méthode génotypique : l'amplification génomique par PCR des gènes responsables de la production des BLSE

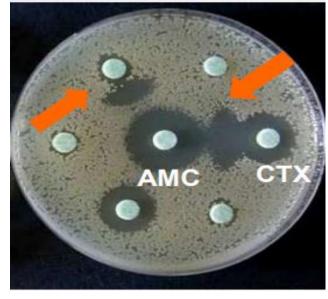
## Test de double diffusion de synergie

- la capacité de l'acide clavulanique a inhibé les BLSE
- Le test de synergie traditionnel avec des distances inter-disques pouvant varier entre 2 et 4 cm selon les espèces
- Image en « bouchon de champagne » dite de « synergie » entre au moins un des disques des céphalosporines et le disque content l'inhibiteur
- Peut être réalisé sur gélose contenant de la cloxacilline pour optimiser la détection des souches suspectes de produire une céphalosporinase à haut niveau

## Test de double diffusion de synergie

- Synergie en « bouchon de champagne »
- Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique
- Un test de synergie est décrété négatif s'il n'y a pas d'augmentation du diamètre d'inhibition



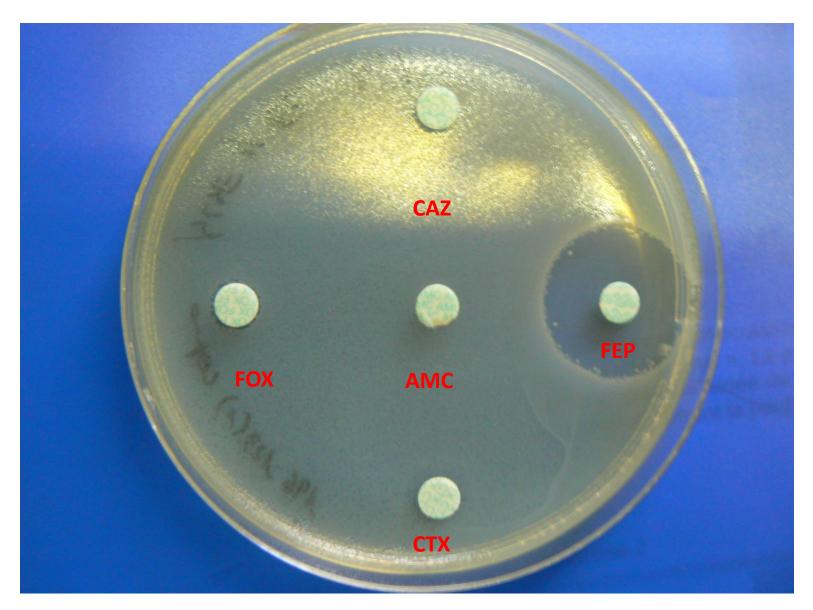


E.coli BLSE

## Test de double diffusion de synergie

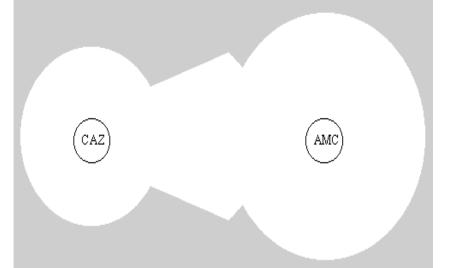
 Les entérobactéries du 3ème groupe possèdent une céphalosporinase chromosomique inductible type AmpC qui masque la BLSE :

- Utilisation d'un disque de céfépime moins inactivée par l'AmpC que par la BLSE
- ➤ Réduction de la distance entre le disque contenant l'acide clavulanique et les disques des C3G
- Réalisation du test sur une gélose Mueller-Hinton à la cloxacilline qui est un puissant inhibiteur de la céphalosporinase



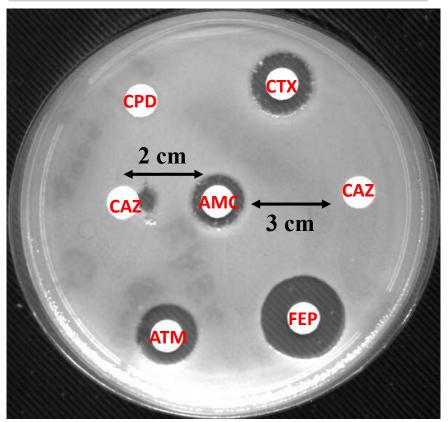
Céphalosporinase haut niveau

## Test de synergie AMC(IBL)/C3G



Images en « bouchon de champagne »

**Entérobactérie 3**ème groupe



## Méthode des disques combinés

- Mesurer la zone d'inhibition autour du disque de céphalosporine seule et celle autour du disque de la même céphalosporine additionnée d'acide clavulanique
- Le test est positif si la différence de diamètre >5mm





#### Test de la CMI

- L'E-test pour la détection des BLSE permet de quantifier la synergie entre les céphalosporines à spectre élargi et l'inhibiteur des β-lactamases
- Le test est considéré comme positif lorsque la CMI de la céphalosporine à tester est réduite de plus de trois fois le taux de dilution (ratio CMI ≥ 8) en présence de l'inhibiteur



TZ : Céftazidime

TZL : Céftazidime + acide clavulanique

## Milieux chromogènes



chromID® BLSE

D'après bioMérieux

#### Principe d'utilisation et de lecture

Identification immédiate et directe des entérobactéries les plus fréquentes, après 18 à 24 heures d'incubation.

·Escherichia coli:

Coloration rose à bordeaux des souches productrices de ßglucuronidase

- Proteae (Proteus, Providencia, Morganella):
  Coloration brune à marron des souches exprimant une désaminase.
- Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter (KESC):
  Coloration vert / bleu à vert-brun des souches productrices de ß-glucosidase
- Inhibition sélective des bactéries Gram positif et des levures
- Le caractère BLSE doit être vérifié par la technique de synergie dite "en bouchon de champagne"

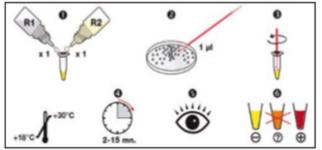
## Test colorimétrique β LACTA (BIO-RAD)

#### β LACTA™ test



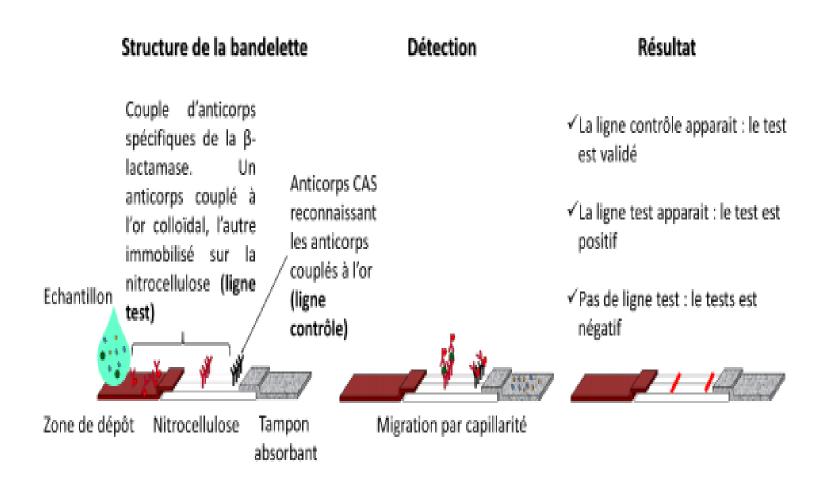
B-LACTA™ se base sur le clivage d'une céphalosporine chromogénique, HMRZ-86\*. Initialement jaune, ce substrat devient rouge en présence de souches d'entérobactéries productrices de B-lactamases responsables de la résistance aux céphalosporines de troisième génération.

Le test est réalisé directement dans des micro-tubes soit avec des colonies d'entérobactéries fraîchement isolées soit à partir d'un culot bactérien issu de flacons d'hémoculture positive ou d'urines positives à entérobactéries.



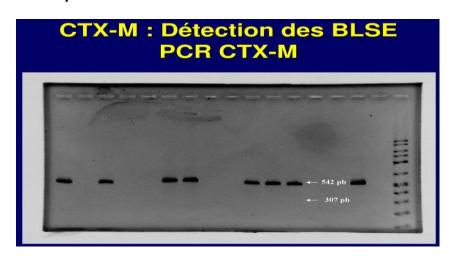
	A partir de colonies	A partir du prélèvement
Spécificité	97,9%	100%
Sensibilité	80,2%	84 – 88,5%

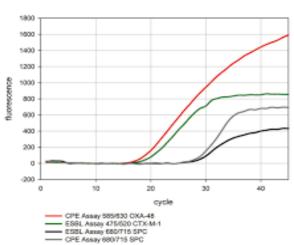
### Tests immunochromatographiques



## Biologie moléculaire (PCR)

- Amplification génomique par PCR des gènes codant les β-lactamases
- Permet pas de faire la distinction entre les enzymes responsable d'un phénotype BLSE ou non-BLSE: associée à une analyse complémentaire
- Le génotypage n'est pas réalisable en milieu diagnostique : techniques trop longue et onéreuses
- Sur le plan épidémiologique: suivre les bactéries productrices de BLSE et les plasmides circulants





#### **Conclusion**

- Les BLSE : potentiel de diffusion et prévalence importante justifiant une surveillance épidémiologique:
- Augmentation de la mortalité et du temps d'hospitalisation
- Ajustement régulier de la politique d'utilisation des antibiotiques
- Détection :
- Rôle majeur des laboratoire de Bactériologie
- Moyens de détection rapides
- Signalement au près des comités de lutte contre les infections nosocomiales