



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

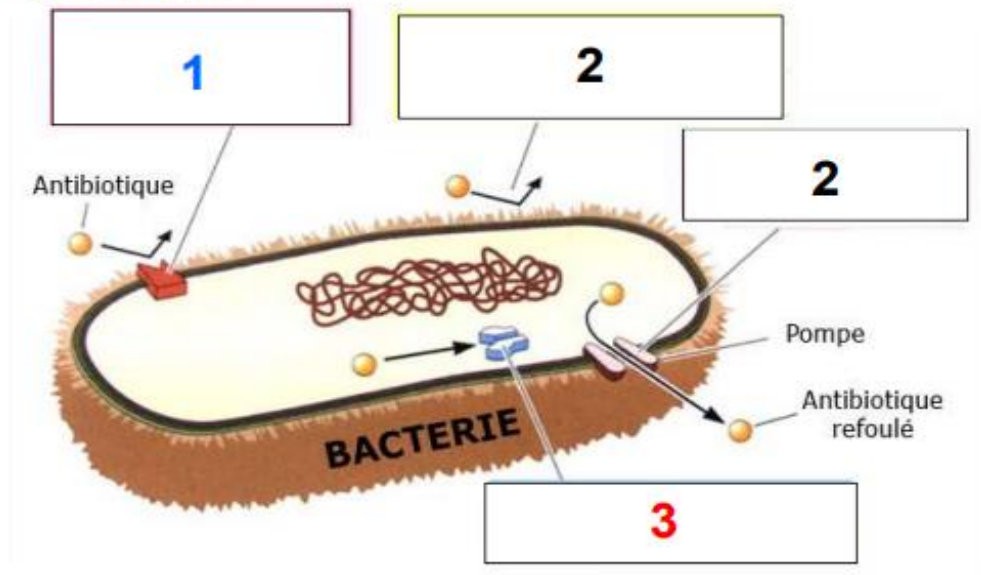
Mécanismes de résistance aux ATB chez les entérobactéries

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 β -lactamines
- **BLSE**: Résistante aux pénicillines, céphalosporine et à l'aztréonam, la sensibilité aux associations pénicillines-inhibiteurs de β -lactamases 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)

| β -lactamines | | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| Pénicillines | Céphalosporines 5 générations | Monobactams Aztréonam | Carbapénèmes |

β -lactamases

Class A penicillinases

ESBL

KPC

Class B metallo-enzymes

NDM, VIM, IMP

Class C cephalosporinases

Class D oxacillinases

OXA-48

Classification d'Amber

A

- ❑ Pénicillinases (TEM, SHV)
- ❑ BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES...
- ❑ Sérine carbapénémases (KPC, GES...)

B

- ❑ Métallo-bêta-lactamases (VIM, IMP, NDM)

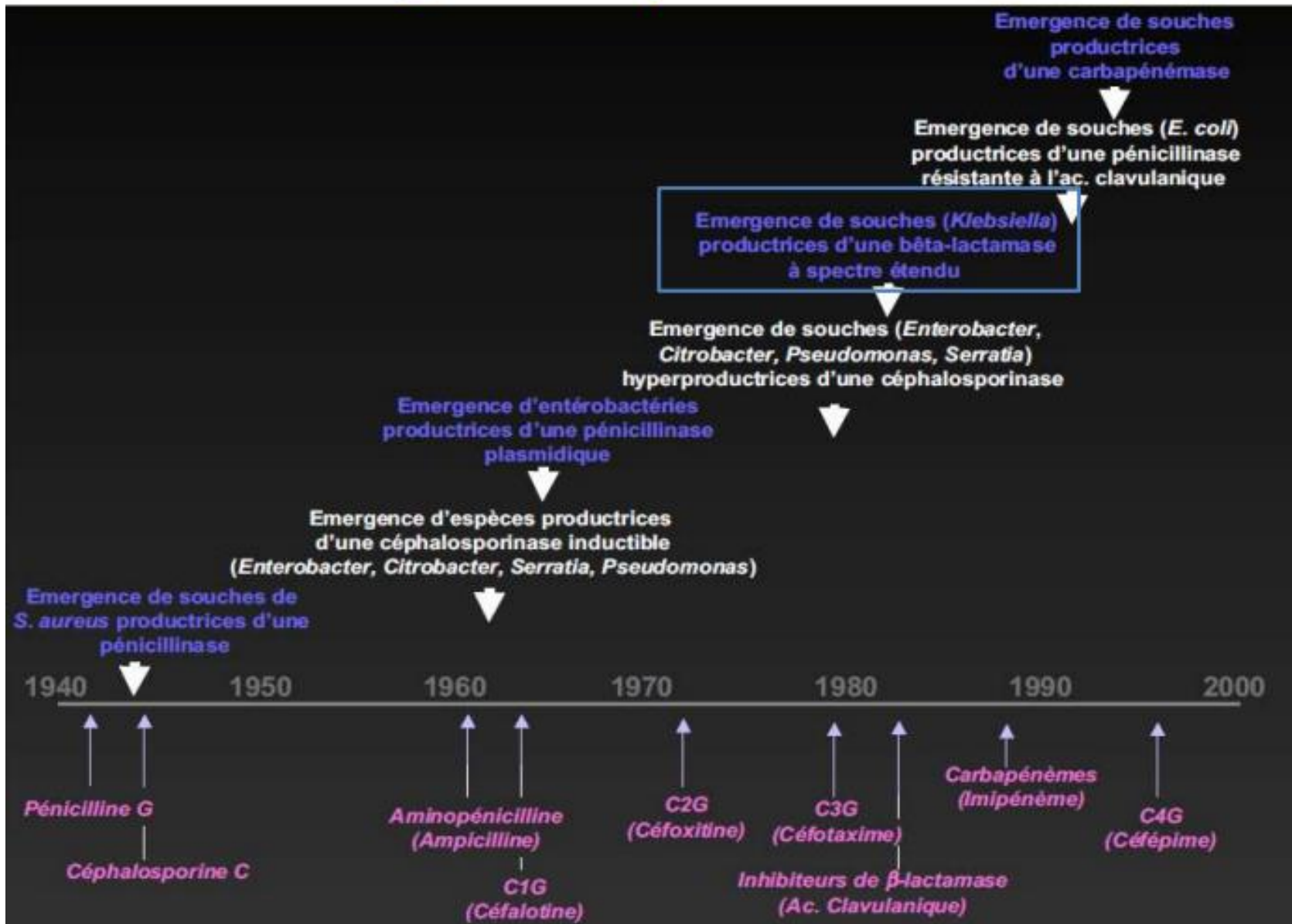
C

- ❑ Céphalosporinases (AmpC)

D

- ❑ Oxacillinases (OXA)
- ❑ BLSE de type OXA
- ❑ Oxa-carbapénémases (OXA-48, variants)

Emergence des β -lactamases ...

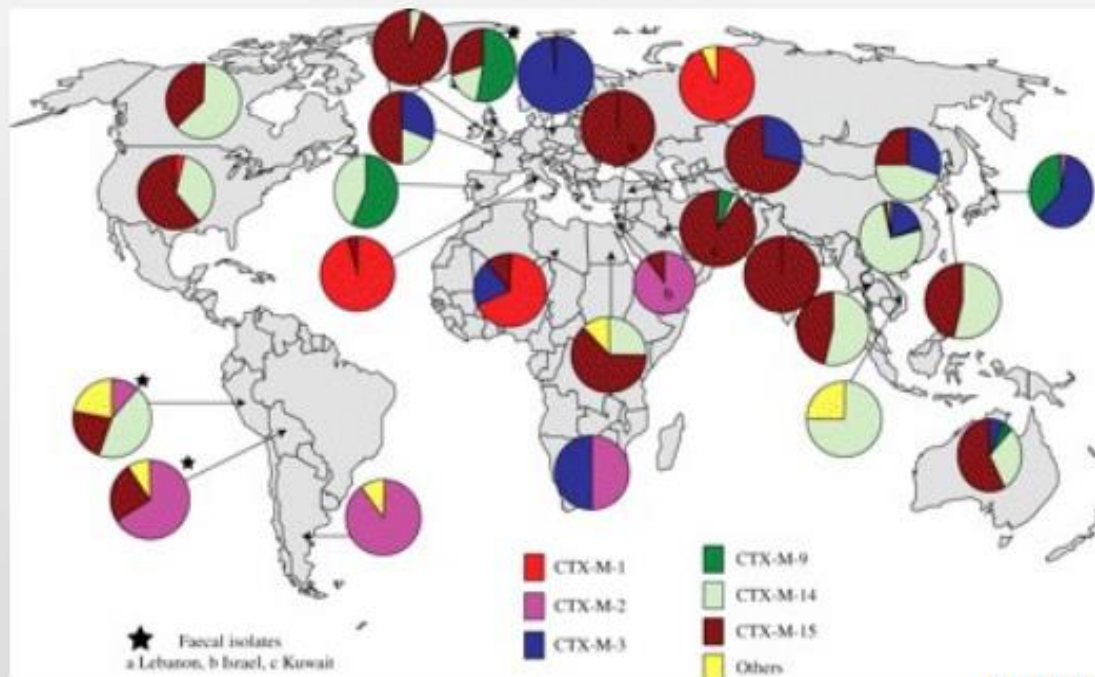


Epidémiologie des EBLSE

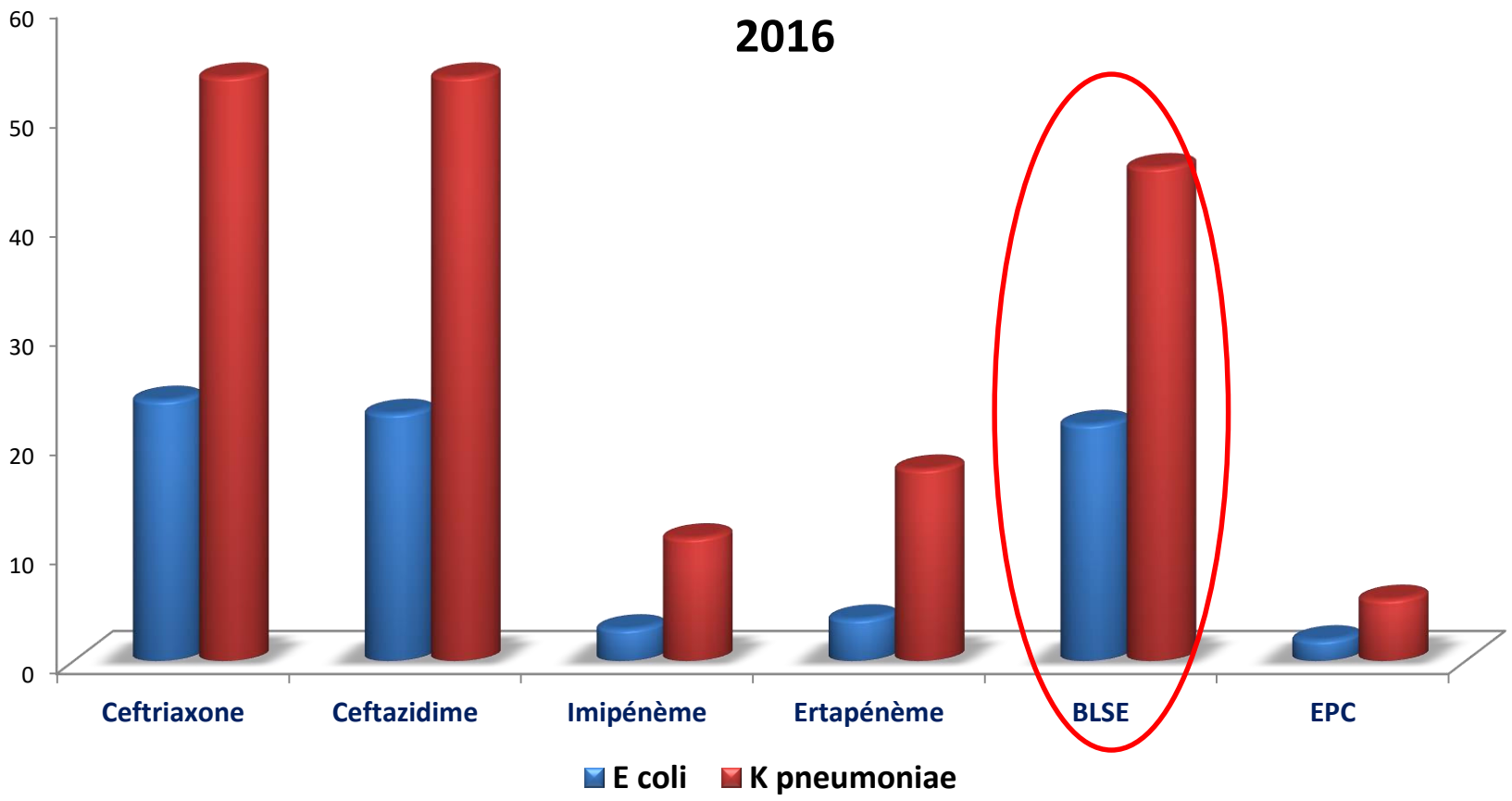
1980 : *E. coli* TEM-3,
K. pneumoniae SHV-4
E. aerogenes TEM-24...

Infections nosocomiales

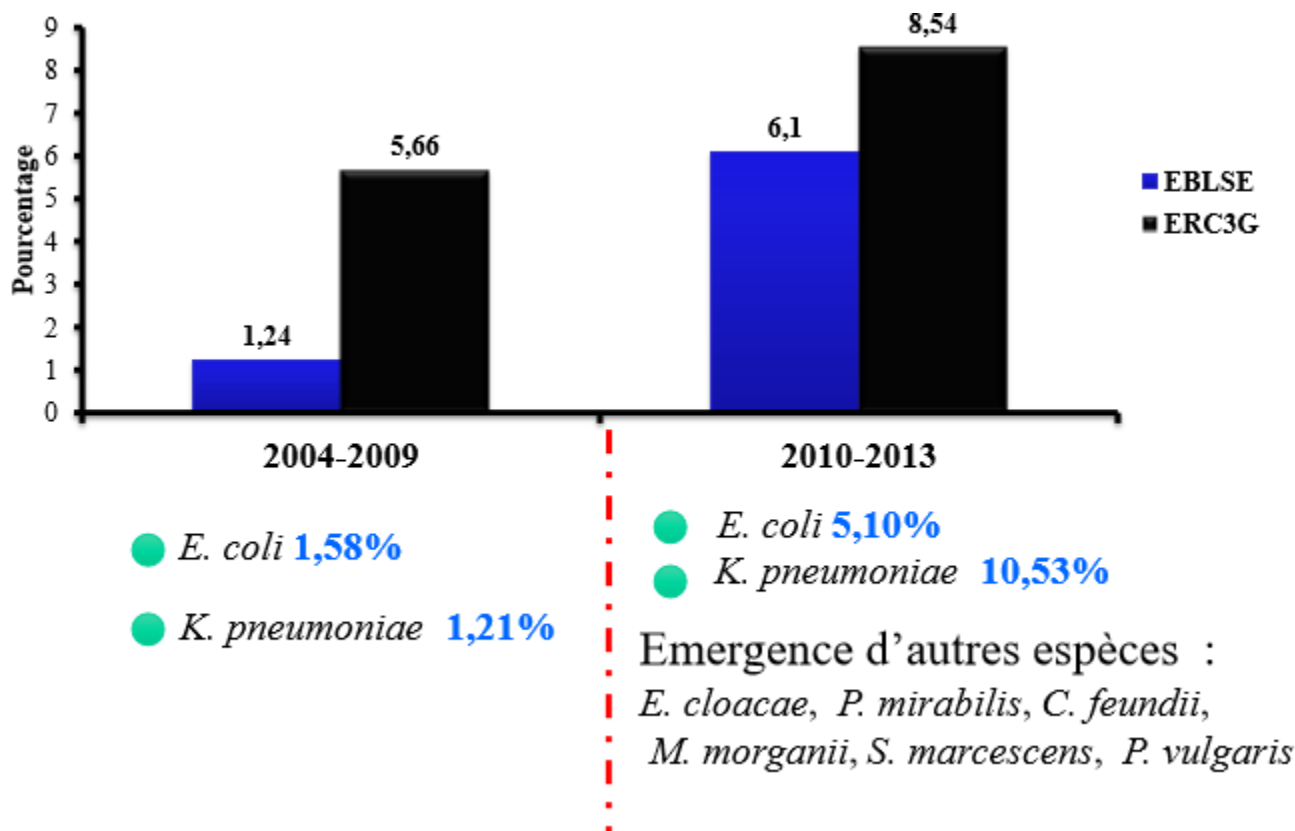
2000 : *E. coli* CTX-M



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

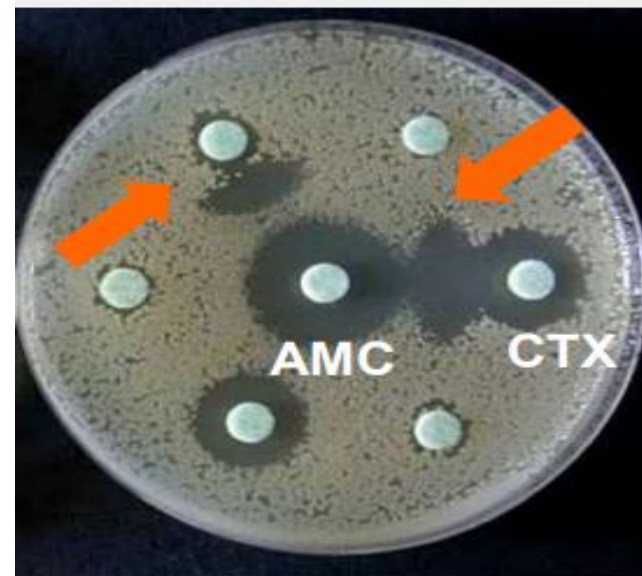
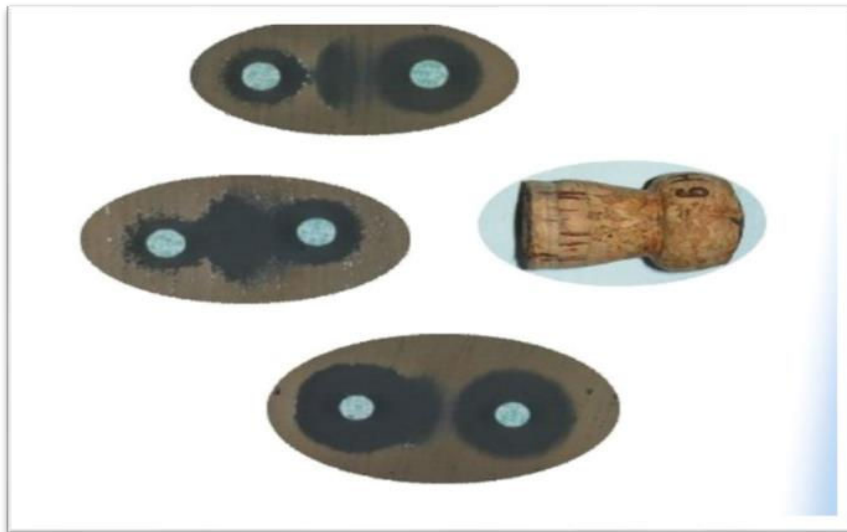
- Au laboratoire de microbiologie, deux approches sont possibles pour la détection de BLSE :
 - *la détection phénotypique* : la capacité de l'enzyme à hydrolyser certaines céphalosporines et la capacité de l'acide clavulanique à contrecarrer cette hydrolyse
 - *la méthode génotypique* : l'amplification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

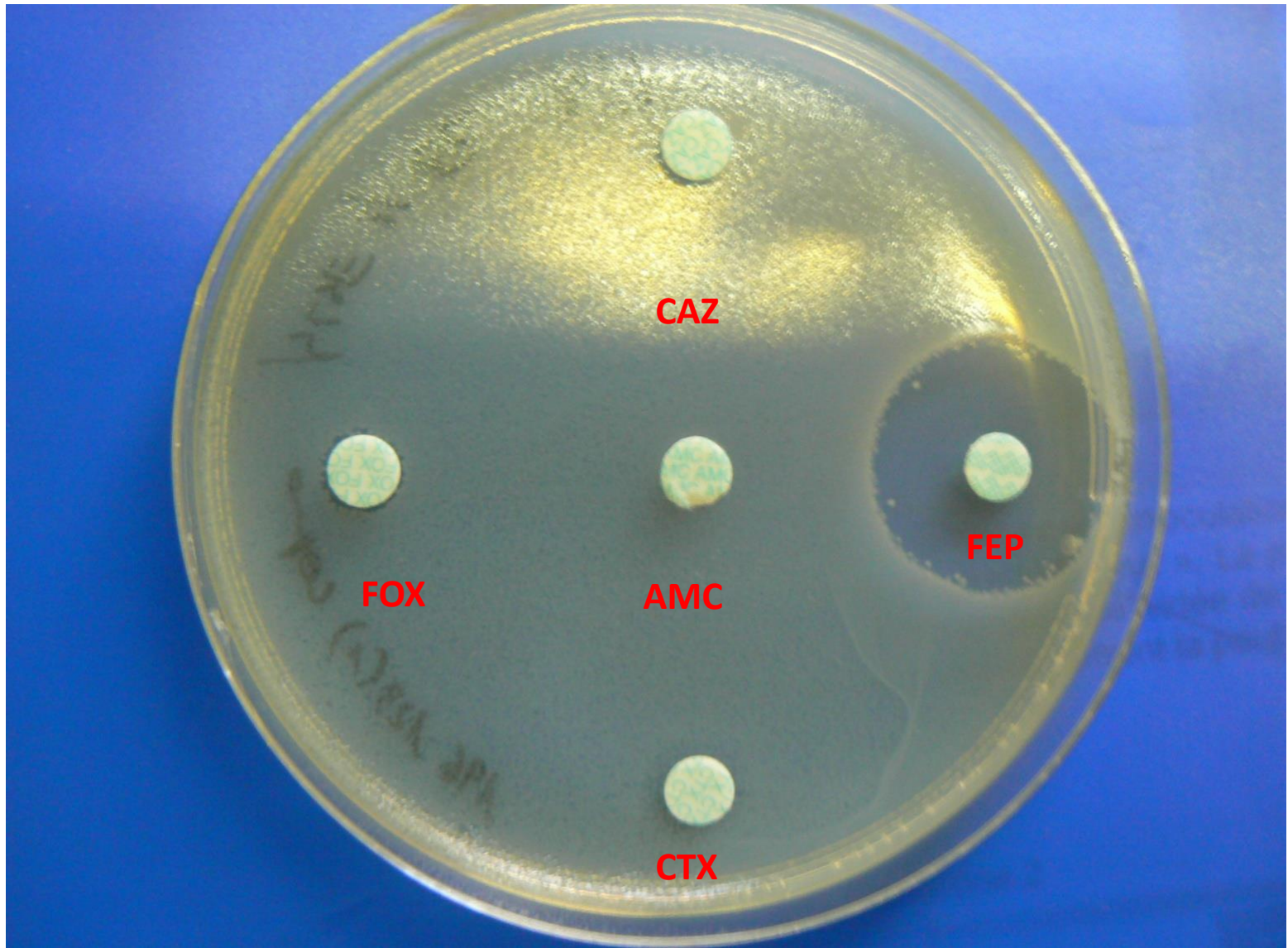
- Synergie en « **bouchon de champagne** »
- Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique
- Un test de synergie est décrété négatif s'il n'y a pas d'augmentation du diamètre d'inhibition



E.coli BLSE

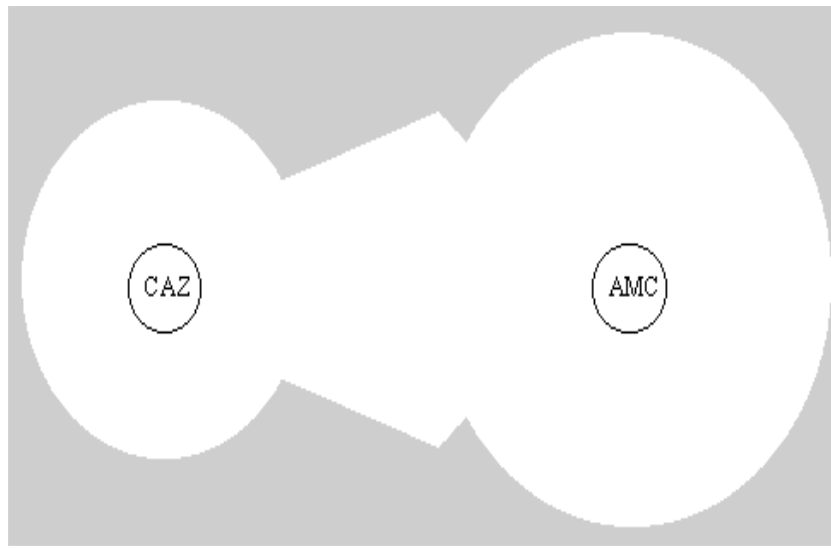
Test de double diffusion de synergie

- 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



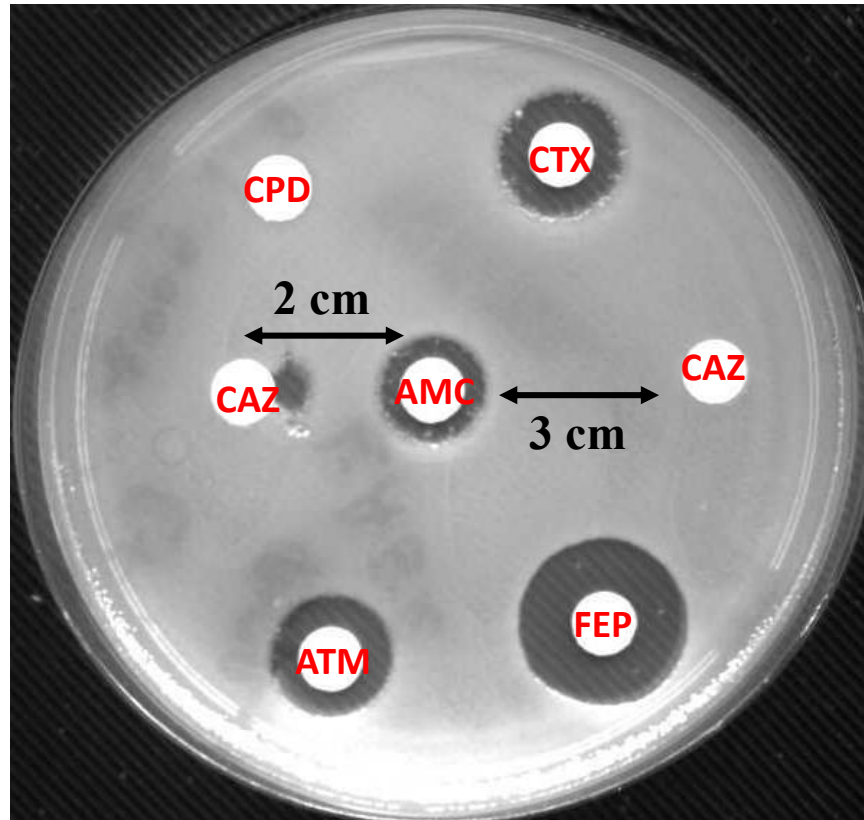
Céphalosporinase haut niveau

**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 $>5\text{mm}$



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 β -glucuronidase

•*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 β -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"

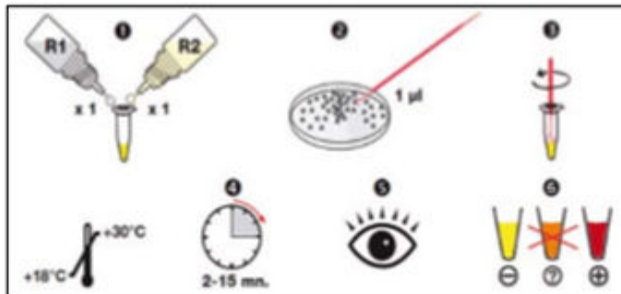
Test colorimétrique β LACTA (BIO-RAD)

β LACTA™ test



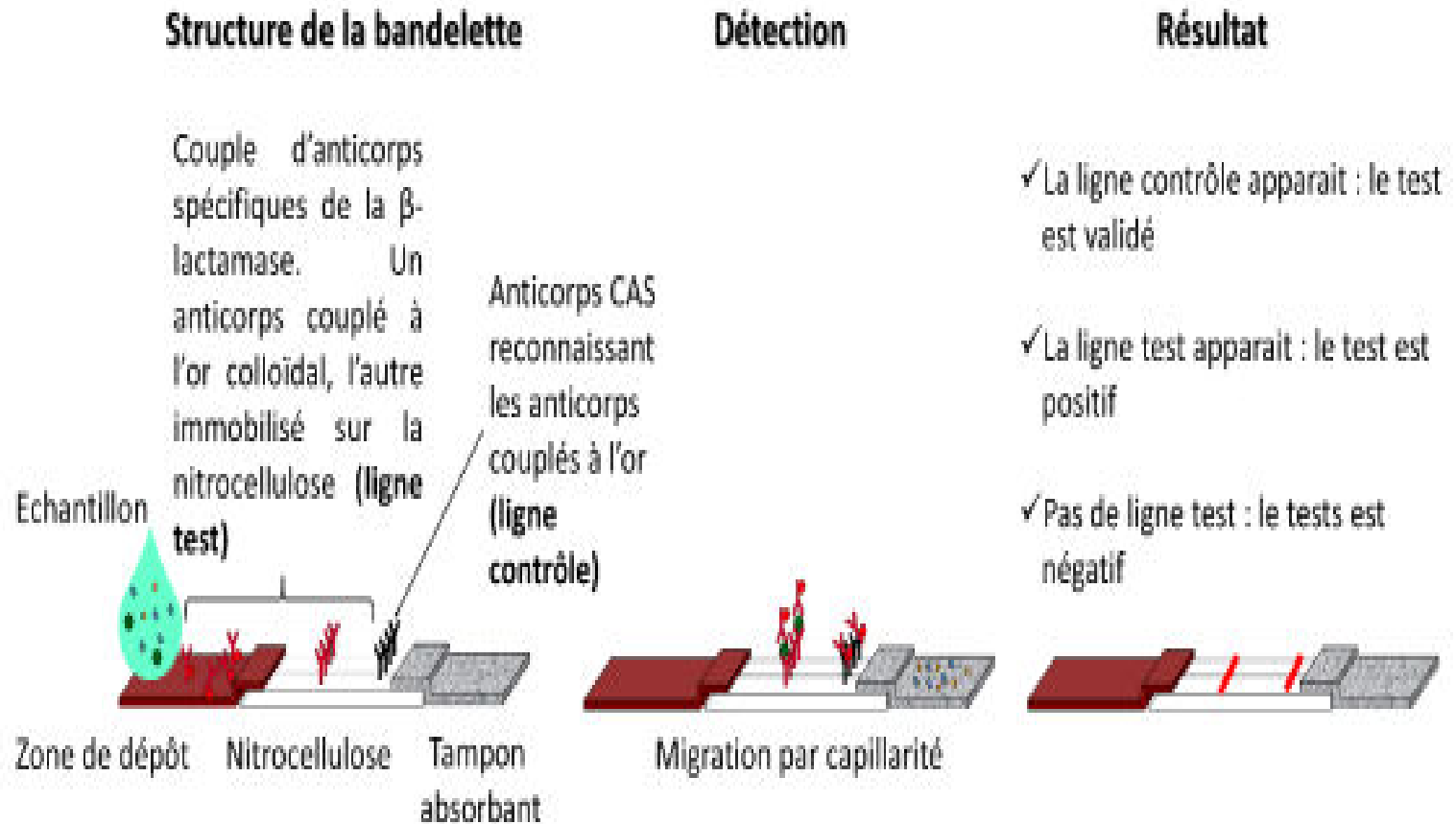
B-LACTA™ se base sur le clivage d'une céphalosporine chromogénique, HMRZ-86*. Initialement jaune, ce substrat devient rouge en présence de souches d'entérobactéries productrices de B-lactamases responsables de la résistance aux céphalosporines de troisième génération.

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.



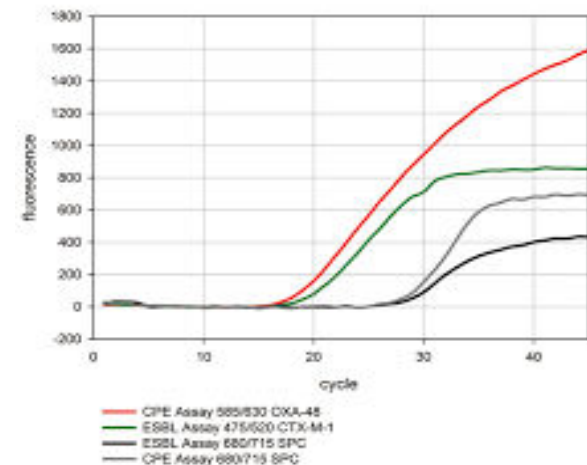
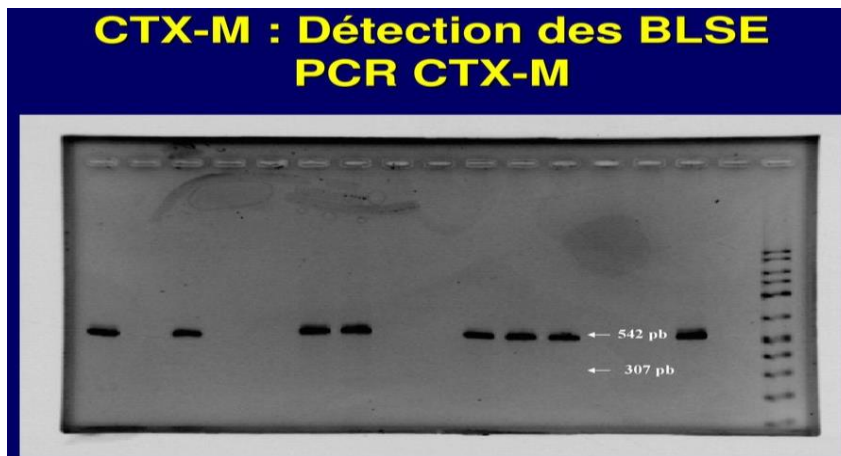
| | A partir de colonies | A partir du prélèvement |
|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Spécificité | 97,9% | 100% |
| Sensibilité | 80,2% | 84 – 88,5% |

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 laboratoires de Bactériologie
 - Moyens de détection rapides
 - Signalement au près des comités de lutte contre les infections nosocomiales