



Caractérisation moléculaire de la résistance plasmidique aux quinolones chez des souches d'*Escherichia coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu

S. Ferjani², M. Saidani M¹⁻², A. Slim¹⁻², I. Boutiba-Ben Boubaker¹⁻²,

¹- Laboratoire de Microbiologie - Hôpital Charles Nicolle - Tunis

²-Laboratoire de Recherche "Résistance aux Antimicrobiens"-Faculté de Médecine de Tunis

INTRODUCTION

- ✓ La résistance aux fluoroquinolones (FQ) chez les entérobactéries est classiquement chromosomique (Hopkins KL et al, Int J Antimicrob Agents. 2005):
 - ❖ Modification de la cible (mutations des gènes *gyrA* et *parC*)
 - ❖ Diminution de la concentration intracellulaire des FQ:
 - Imperméabilité membranaire
 - Hyper expression des pompes à efflux actif (AcrAB-TolC/ AcrR ou MarA)

- ✓ Depuis 1998, émergence et diffusion d'une résistance plasmidique aux quinolones (RPQ), en particulier chez les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Rodríguez-Martínez JM et al, J Infect Chemother, 2011).

INTRODUCTION

Mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones

Protection de cible:

QNR

- Motifs pentapeptidiques répétés
- 5 déterminants : A, B, S, C, D

(Martinez-Martinez L et al, Lancet, 1998)

Inactivation enzymatique des FQ:

AAC (6')-Ib-cr

- Substitution des codons:
Trp102Arg /Asp179Tyr
(Robicsek A et al, Nat. Med, 2006)

Expulsion FQ:

Qep A, OqxAB

- Major Facilitator Superfamily
- Resistance Nodulation cell Division
(Yamane K et al, AAC, 2007/
Bin Kim H et al, AAC, 2009)

→ Bas niveau de résistance aux fluoroquinolones

OBJECTIF DU TRAVAIL:

- Détecter et identifier les différents mécanismes de RPQ
- Etudier leur transférabilité
- Rechercher lien de clonalité

Chez 40 souches, consécutives et non redondantes, d'*E. coli* productrices de BLSE isolées à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis, en 2010

Méthodes:

❖ **Identification bactériologique:** Méthodes conventionnelles & Api 20E (bioMérieux)

❖ **Étude de la sensibilité aux antibiotiques (selon les recommandations du CLSI):**

- Antibiogramme: Méthode de diffusion en milieu gélosé
- Détection des BLSE: Test de double synergie
- Détermination des CMI des FQ: Méthode de dilution en milieu solide

Méthodes:

Identification des RPQ:

qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr, qepA, et oqxAB

Mutations chromosomiques associées:

gyrA et *parC*

Identification des β -lactamases associées:

*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} et *bla*_{SHV}

PCR suivies de
séquençage

Typage moléculaire: Electrophorèse en champs pulsé (ECP) après macrorestriction avec XbaI [analyse par le logiciel FP-Quest (BioRad)]

Transfert de la résistance:

- Conjugaison en milieu liquide: souche de référence *E. coli* J53-2
- 9 souches représentatives de chaque profil ECP

RESULTATS et DISCUSSION:

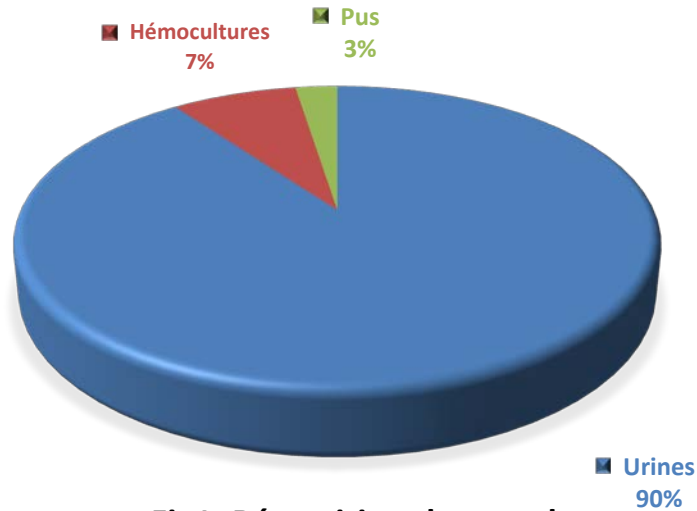


Fig1. Répartition des souches selon les prélèvements

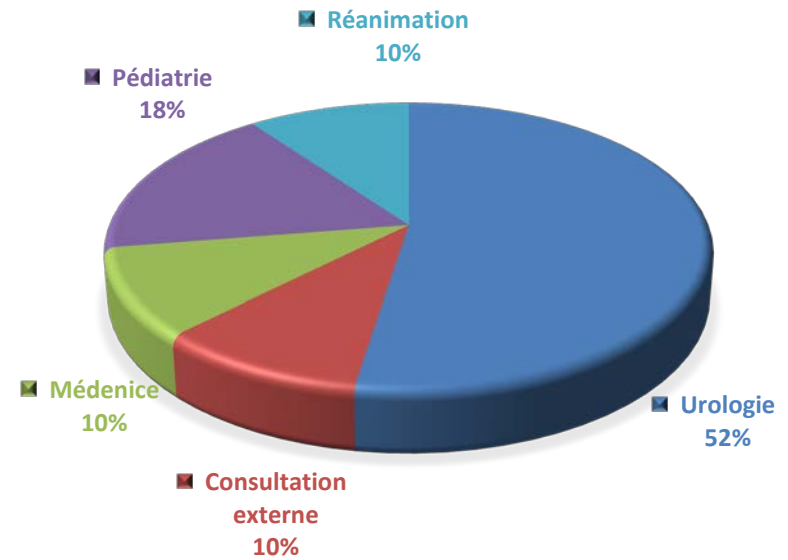


Fig2. Répartition des souches selon les services

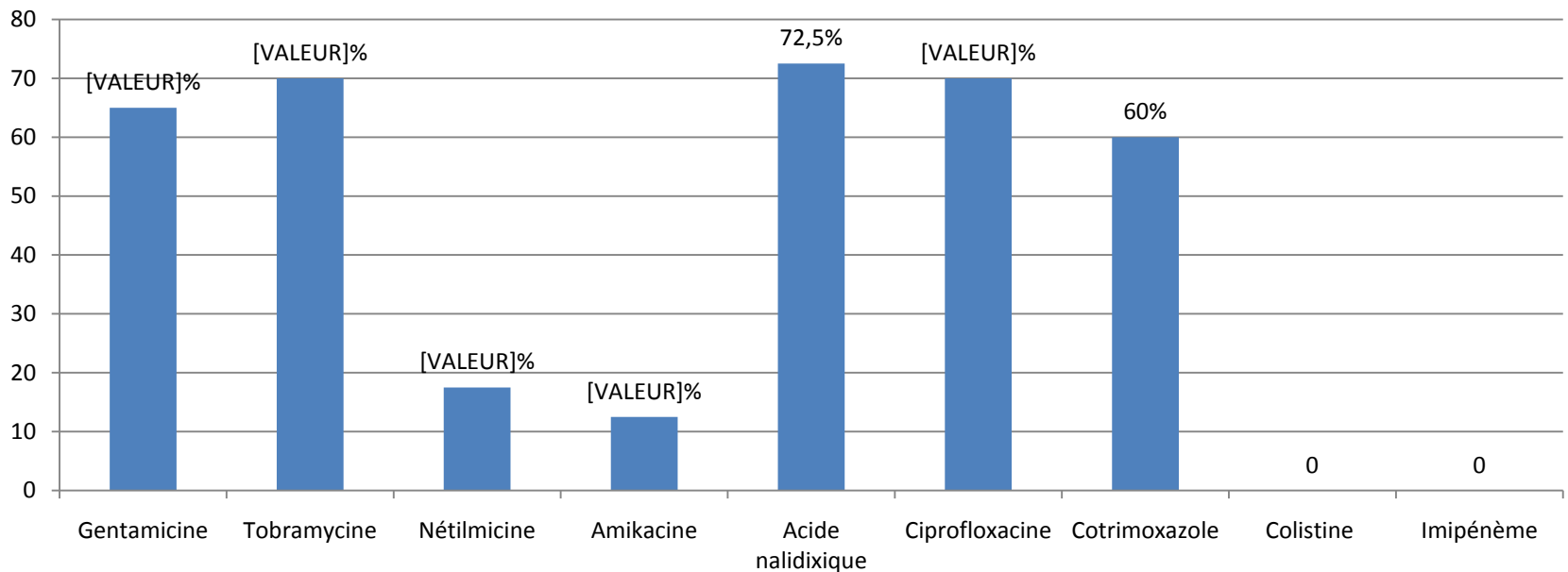


Fig3. Pourcentages de résistance aux antibiotiques

RESULTATS et DISCUSSION:

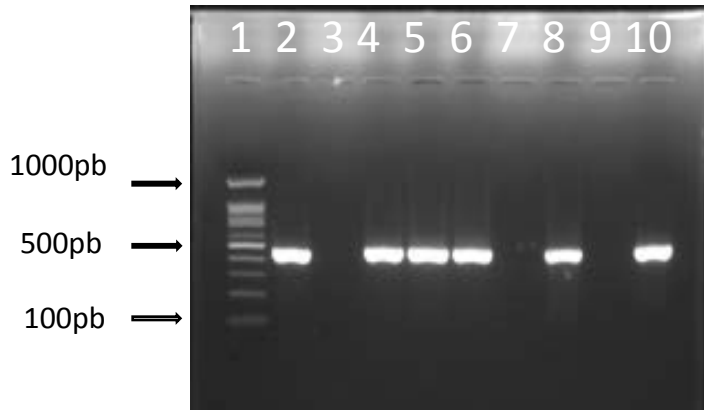


Fig4. Profil électrophorétique du produit d'amplification du gène *aac(6')-Ib*.

1: Marqueur de taille (100pb); 2: témoin positif *aac(6')-Ib* (480pb); 4, 5, 6, 8 et 10 : *aac(6')-Ib* (+); 3, 7 et 9: *aac(6')-Ib* (-)

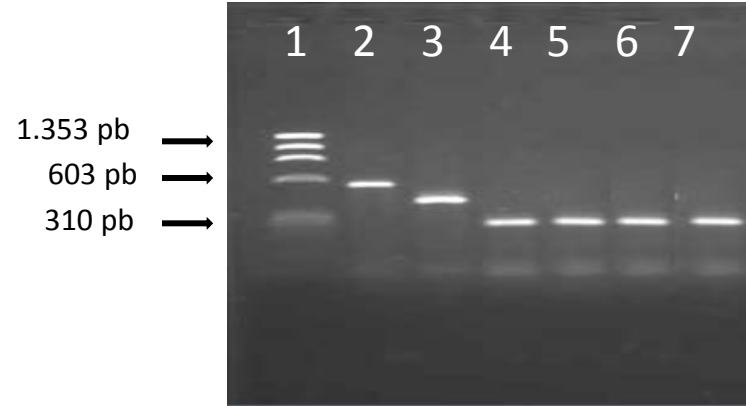


Fig5. Profil électrophorétique du produit d'amplification des gènes *qnrA*, *qnrB* and *qnrS*

1: Marqueur de taille (Φ X174); 2: témoin positif *qnrA* (580pb); 3: témoin positif *qnrS* (428pb); 4: témoin positif *qnrB* (264pb); 5,6 et 7: souches *qnr B* (+)

✓ RPQ concernait 50% (n=20) de nos souches

<i>aac(6')-Ib-cr</i> (+)	<i>qnr B1</i> (+)	<i>qnr B1</i> (+)/ <i>aac(6')-Ib-cr</i> (+)
17 (42,5%)	1 (2,5%)	2 (5%)

➔ Conformément aux données de la littérature ➔ Prédominance du variant *aac(6')-Ib-cr* / *qnrB1* chez *E. coli* (Karah N et al, Diagn Microbiol Infect Dis, 2010)

RESULTATS et DISCUSSION:

Niveau de résistance aux FQ des souches hébergeant la RPQ

	Acide nalidixique 16 - 32*	Norfloxacine 4 - 16*	Ciprofloxacine 1 - 4*
CMI ₅₀ (µg/mL)	512	128	64
Valeurs limites (µg/mL)	4-1024	0,25-256	0,06-128

* Valeurs critiques

Souches (n=5)	CMI (µg/mL)		
	Acide nalidixique 16 - 32*	Norfloxacine 4 - 16*	Ciprofloxacine 1 - 4*
S EC4 (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	4	0,25	0,06
S EC23 (<i>qnr B1 /aac(6')-Ib-cr</i>)	32	1	0,5
S EC28 (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	8	0,12	0,06
EC30 (<i>qnr B1</i>)	16	0,12	0,12
EC36 (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	4	0,25	0,06

Difficulté de la détection phénotypique des RPQ
Intérêt de leur typage moléculaire

✓ Bas niveau de résistance aux FQ/ gènes natifs *gyrA-parC*

RESULTATS et DISCUSSION:

✓ Toutes les souches RPQ (+) ↪ $bla_{CTX-M-15}$.

➔ $bla_{CTX-M-15}$ est fréquemment associé avec la RPQ, cependant leur l'association avec d'autres types de BLSE tel que SHV, LAP, TLA et VEB a été rapportée (Rodríguez-Martínez JM, J Infect Chemother, 2011).

✓ Le transfert réussi pour 2 souches sur 9

Marqueurs de résistance et gènes de β -lactamases des souches donatrices et de leurs transconjugants (Tc)

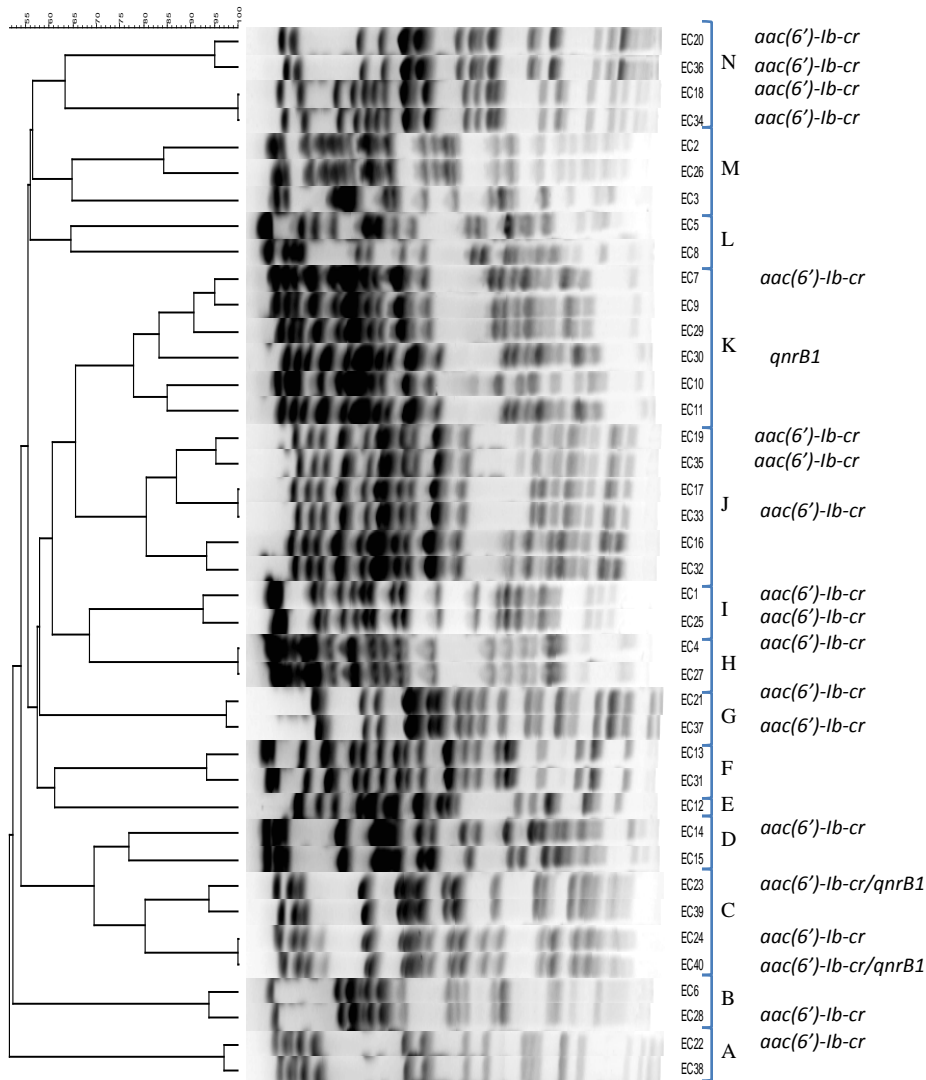
Souches	Gènes RPQ	$bla_{CTX-M-15}$	Autres marqueurs de résistance	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
				NA	NOR	CIP
EC5	<i>qnr B1</i>	+	TM-GM-NET-AN-TE-C-NA-NOR-CIP-SXT	512	128	64
Tc EC5	<i>qnr B1</i>	+	TM-GM-TE-C-SXT-RIF	8	0,5	0,06
EC40	<i>aac(6')-Ib-cr/qnrB1</i>	+	TM-GM-NET-NA-NOR-CIP-SXT-RIF	512	128	64
Tc EC40	<i>aac(6')-Ib-cr/qnrB1</i>	+	TM-GM-NET-RIF	32	4	1
J53	-	-	RIF	4	0,03	0,007

TM : tobramycine, GM : gentamicine, NET : nétilmicine, AN : amikacine, TE : tétracycline, C : chloramphénicol, NA : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, NOR : norfloxacine et SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole

RESULTATS et DISCUSSION:

Dica (0pt10.00%) (Tot1 0%+ 0%) (P=0.0% S=0.0%) (D.0%+100.0%)
PFGE E.coli

PFGE E.coli




✓ Les 20 souches RPQ (+): 9 profiles

↪ Diversité clonale des souches

Fig6. Dendrogramme des profiles ECP

Conclusion:

- ✓ Fréquence élevée de RPQ, parmi les *E. coli* productrices de BLSE *aac(6′)-Ib-cr* +++
- ✓ Association fréquente:
 - ✓ Mutations chromosomiques (topoisomérase)
 - ✓ *bla*_{CTX-M-15}
- ✓ Par ailleurs, nos résultats confirment l'importance de la détection du bas niveau de résistance aux FQ, afin de prévenir sélection de mutants hautement résistants

 Ce qui contribue à préserver ces molécules

MERCI