

## GENERALITES

Les antibiotiques ont différentes cibles sur les bactéries (synthèse de la paroi, membrane plasmique, réplication, transcription, traduction...). Voir cours et livre p 22.

La résistance d'une bactérie à un antibiotique peut être **naturelle** : caractère commun à une famille, à un genre ou une espèce. Elle est d'origine chromosomique et peut constituer un critère d'identification (voir tableau des phénotypes de résistance des entérobactéries).

La résistance peut être **acquise** par mutation chromosomique ou extrachromosomique (plasmide ou transposon). La souche a alors un phénotype de résistances différent de celui de la souche sauvage et devient une **BMR = Bactérie MultiRésistante**.

**Les  $\beta$ -lactamines agissent en bloquant la synthèse du peptidoglycane indispensable à la synthèse de la paroi bactérienne. Les  $\beta$ -lactamines comprennent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases.**

Comme les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques de choix dans le traitement de nombreuses infections bactériennes il existe de nombreux tests permettant la mise en évidence de la résistance aux  $\beta$ -lactamines.

### I. Qu'est qu'une $\beta$ -lactamase ?

**Une  $\beta$ -lactamase est une enzyme qui hydrolyse le noyau  $\beta$ -lactame commun à toutes les  $\beta$ -lactamines ce qui forme un acide** (exemple : acide pénicilloïque par hydrolyse d'une pénicilline p 78). L'antibiotique est inactivé. Les bactéries possédant ce type d'enzyme sont donc résistantes à une ou plusieurs  $\beta$ -lactamines.

Il existe des : -  **$\beta$ -lactamases inductibles** qui sont produites par la souche uniquement s'il y a présence d'une  $\beta$ -lactamine dans le milieu de culture. C'est le cas de la  $\beta$ -lactamase produite par *Staphylococcus aureus*.

-  **$\beta$ -lactamases constitutives** qui sont produites de façon permanente qu'une  $\beta$ -lactamine soit présente ou non. C'est le cas des  $\beta$ -lactamases d'*Haemophilus*, de *Neisseria*.

Il existe plusieurs types de  $\beta$ -lactamases, elles diffèrent par leur affinité pour le cycle  $\beta$ -lactame, exemples :

- **pénicillinase** (action sur les pénicillines et éventuellement C1G)
- **céphalosporinase** (active sur les pénicillines et les céphalosporines)
- **BLSE :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu** (c'est une pénicillinase active aussi sur les les céphalosporines avec une synergie permettant de la différencier des céphalosporinases).
- **Carbapénémases** (active aussi sur les carbapénèmes)

**Remarque** : En fonction du profil de résistance, chaque catégorie de  $\beta$ -lactamases comprend des degrés, il existe ainsi des pénicillinases et céphalosporinases de bas ou haut niveau, des BLSE de classe A, ou D, des carbapénémases de classe A, B ou D. (voir aussi tableau de classification des  $\beta$ -lactamases du livre page 79).

**L'acide clavulanique est un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases (I $\beta$ L).** L'acide clavulanique est contenu dans les disques :

- AMC : Amoxicilline (amino pénicilline) + acide clavulanique (ou Augmentin)
- TCC : ticarcilline (carboxypénicilline) + acide clavulanique
- CCT : céfotaxime (C3G) + acide clavulanique

Bilan	
Antibiotiques	Enzymes qui dégradent l'antibiotique
$\beta$ -lactamine : Pénicilline	$\beta$ -lactamases : pénicillinase, BLSE, céphalosporinase, carbapénémase
$\beta$ -lactamine : Céfoxitine (C2G)	$\beta$ -lactamases : BLSE, céphalosporinase, carbapénémase
$\beta$ -lactamine : Imipénème (carbapénème)	$\beta$ -lactamases : carbapénémase A, B ou D

## II. Recherche des $\beta$ -lactamases (Cf livre page 79 à 86)

Plusieurs techniques permettent de mettre en évidence la production d'une  $\beta$ -lactamase par une souche bactérienne.

### 2.1. Mise en évidence d'une $\beta$ -lactamase sur l'antibiogramme

Le choix des disques déposés sur l'antibiogramme va permettre de rechercher spécifiquement les  $\beta$ -lactamases.

#### a. Mise en évidence d'une pénicillinase

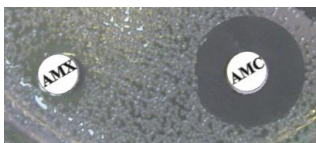
Cette recherche de  $\beta$ -lactamase est réalisée pour les souches de bacilles Gram négatifs appartenant aux entérobactéries, aux genres *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*.

On compare sur l'antibiogramme, les diamètres d'inhibition obtenus avec un disque d'une pénicilline au diamètre obtenu avec un disque de l'association de cette pénicilline avec un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (livre page 78). Le choix des disques dépend de la souche étudiée (livre page 33). Ces disques peuvent correspondre :

- soit à l'amoxicilline et à l'amoxicilline + l'acide clavulanique.
- soit à l'ampicilline et à l'ampicilline + le sulbactam.
- soit à la ticarcilline et à la ticarcilline + l'acide clavulanique.
- soit à la pipéracilline et à la pipéracilline + le tazobactam.

Un diamètre d'inhibition pour le disque pénicilline + I $\beta$ L supérieur au diamètre d'inhibition pour la pénicilline seule indique qu'il y a production d'une  $\beta$ -lactamase par la souche étudiée.

$\phi$ AMC >  $\phi$ AMX = pénicillinase



Pas de pénicillinase



#### b. Mise en évidence d'une $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) → p 84

Les BLSE sont des  $\beta$ -lactamases qui inactivent une large partie des  $\beta$ -lactamines (pénicillines et céphalosporines jusqu'à la 3<sup>ème</sup> génération). Elles ont la particularité d'être inhibées par l'acide clavulanique et d'être inactives sur les carbapénèmes comme l'imipénème (IPM). Leur recherche est effectuée à des fins épidémiologiques.

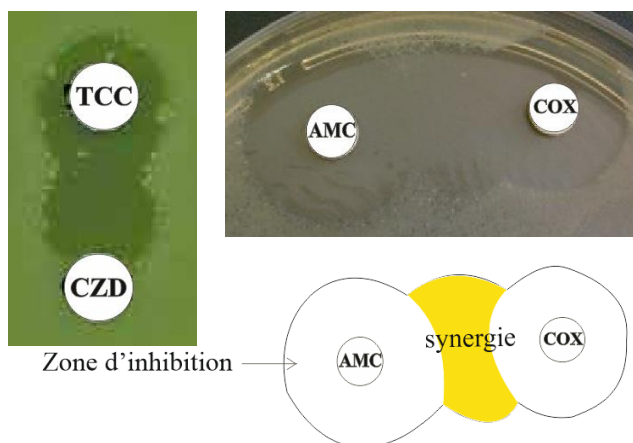
Il existe plusieurs BLSE, les plus fréquentes appartiennent à la classe A.

Mise en évidence par observation d'une synergie entre deux disques :

- Un disque contenant un I $\beta$ L : AMC (Amoxicilline + acide clavulanique) ou TCC (Ticarcilline + acide clavulanique).
- Un disque contenant une C3G : COX (céfotaxime) ou CZD (ceftazidime).

Ces deux disques d'antibiotique sont placés entre 15 et 30 mm l'un de l'autre selon la souche sur un milieu Muëller-Hinton préalablement ensemencé. Pour les entérobactéries on utilise AMC et COX et pour les bacilles Gram négatif oxydase positive on utilise TCC et CZD.

Après incubation, on recherche une synergie entre l'IβL et la C3G qui se visualise par une augmentation de la zone d'inhibition entre les deux disques.



S'il y a synergie entre l'IβL et la C3G → l'association IβL + C3G est plus efficace que la C3G seule → la bactérie possède une BLSE, elle est donc résistante à un grand nombre de β-lactamines. Le patient pourra être traité par une association qui apparaît efficace après antibiogramme.

S'il n'y a pas de synergie entre l'IβL et la C3G la souche testée ne produit pas de BLSE.

### **Mise en évidence à l'aide de deux disques de céphalosporine :**

On compare le diamètre d'inhibition obtenu pour une C3G seule (ex : céfotaxime COX) avec le diamètre de cette même C3G combinée à l'acide clavulanique (ex : céfotaxime + acide clavulanique CCT), la souche possède une BLSE si le diamètre d'inhibition en présence d'acide clavulanique est augmenté d'au moins 5 mm.

#### **c. Mise en évidence d'une carbapénémase → p 83 et 84**

Les carbapénèmes sont les β-lactamines ayant le spectre le plus large, elles sont à usage exclusivement hospitalier pour le traitement des infections nosocomiales à bactéries multirésistantes.

Il existe 3 classes de carbapénémases :

- Carbapénémases A de type KPC pour (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémases) active sur toutes les β-lactamines et partiellement inhibées in vitro par l'acide clavulanique.
- Carbapénémases B (Métallo-β-lactamases) actives sur toutes les β-lactamines sauf l'aztréonam.
- Carbapénémases D (Oxacillines) qui hydrolysent peu les C3G mais qui sont souvent couplées à la présence d'une BLSE.

Des entérobactéries productrices de carbapénémases sont rencontrées depuis 2004 en France en milieu hospitalier. Leur recherche est aujourd'hui systématique en cas d'infection nosocomiale.

Pour la recherche d'une carbapénémase on dépose parmi les disques testés un disque d'imipénème (IPM). Si la souche s'avère résistante un test complémentaire sera réalisé. Comme par exemple le test de Hodge modifié → page 83 ou la technique des disques de ROSCO (page 84).

**Remarque :** La détection des métallo-β-lactamases (métalloenzymes à Zn) peut se faire grâce à un disque chargé d'EDTA placé à proximité de disques de carbapénèmes à tester. L'EDTA qui complexe le Zn<sup>2+</sup> inhibe l'action de la carbapénémase ce qui provoque une image de synergie (voir photo livre p 83).

## **2.2. Autres méthodes de mise en évidence des β-lactamases**

### **a. Méthode rapide à la céphalosporine chromogène (p 81)**

Technique la plus utilisée, mais limitée à certaines souches : *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* et *Branhamella catarrhalis*

On place la souche à étudier au contact de la céphalosporine chromogène. L'hydrolyse de cette céphalosporine par une β-lactamase libère un composé coloré.

Il existe différents disques commercialisés: **Céfinase** (BD) sur disque : rose positif ; PADAC (Pasteur) : jaune positif.

### **b. Milieux gélosés permettant une détection rapide de BLSE**

Des milieux gélosés spécifiques ont récemment été commercialisés afin de permettre une détection simple et rapide de bactéries productrices de BLSE. Méthode très utilisée dans le cadre de **prélèvements de dépistage ce qui permet d'isoler les malades porteurs et de prendre les mesures d'hygiène qui s'imposent.**

**Exemple : gélose chromID ESBL** de Biomérieux contenant une C3G (livre page 86). Ces milieux peuvent se révéler utiles pour détecter les carbapénémases de classe A et B mais en aucun cas les carbapénémases de classe D dont la sensibilité aux C3G est conservée.

### **c. Détection colorimétrique (p 80)**

L'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame induit la production d'acide ( $H_2O + \beta$ -lactamine  $\rightarrow$  acide pénicilloïque).

On place donc la souche à étudier en présence de l'antibiotique à tester et d'un indicateur de pH.

La  $\beta$ -lactamase est mise en évidence par le virage de l'indicateur à sa couleur à pH acide.

**Exemple :** détection de carbapénémase grâce à une solution de carbapénème + rouge de phénol (RAPIDEC Carba NP de Biomérieux).

### **d. Le test de Gots (p 82)**

On utilise une souche sensible aux  $\beta$ -lactamines. On observe une éventuelle levée d'inhibition de la souche sensible par la libération de  $\beta$ -lactamase produite par la souche testée.

### **e. Autres**

- **Détection au spectromètre de masse :** un antibiotique hydrolysé par une  $\beta$ -lactamase a une masse moléculaire augmentée de 18 Daltons (ajout de 2 H et 1 O à sa structure). Le spectromètre est capable de détecter cette variation de masse moléculaire. Ainsi sur un échantillon de carbapénème + « bactérie à tester », si l'antibiotique conserve sa masse moléculaire, la bactérie n'a pas de carbapénémase mais si le produit d'hydrolyse de l'antibiotique est détecté on conclut à la présence de carbapénémase.

- **Détection d'antigène par test immunochromatographique :** ex : OXA-48 K-set pour la détection de la carbapénémase de classe D (OXA-48) et KPC K-set pour la détection de carbapénémase de classe A KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase).

- **Tests moléculaires** (Biopuces à ADN, PCR...)

**Des biopuces à ADN** ont été mises au point ces dernières années comme la puce Check MDR CT102 commercialisés par la société Biocentrics qui permet la détection simultanée de nombreuses BLSE et carbapénémases (type KPC et OXA 48 par exemple). L'utilisation de cette biopuce en routine est encore inaccessible pour la plupart des laboratoires d'analyse (coût trop important).

**Les techniques de PCR simplex** sont actuellement utilisées pour la détection des carbapénémases. Elles sont suivies par un séquençage de l'amplicon pour déterminer exactement l'enzyme.

**Certaines techniques de PCR multiplex en temps réel** permettent de détecter simultanément, en 3 h, les principaux gènes codant pour les carbapénémases des entérobactéries (Exemple de gènes : *blaKPC*, *blaVIM*, *blaOXA-48*, ...)

Pour aller plus loin : informations sur les entérobactéries productrices de carbapénémases : <http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Newsletter/2012/02/articles/EPC.pdf>