

EMERGENCE DE SOUCHES DE SALMONELLA VIRCHOW MULTIRÉSISTANTES ET PRODUCTRICES D'UNE BETA-LACTAMASE A SPECTRE ETENDU EN BELGIQUE EN 2003



S. Bertrand¹, M. Vrints¹, K. Dierick¹, L. De Zutter², G. Daube³, C. Godard⁴, C. Wildemaue⁴ et J-M.Collard¹.

¹ Institut Scientifique de Santé Publique, Bruxelles, ² Université de Gand, ³ Université de Liège,

⁴ Institut Pasteur, Bruxelles, Belgique.

Introduction:

L'émergence des souches de salmonelles multirésistantes représente un problème important tant en médecine humaine que pour la médecine vétérinaire (1). Bien qu'une antibiothérapie ne soit pas recommandée pour traiter les salmonelloses non-typhoïdes chez l'humain, un traitement devient essentiel en cas d'infection invasive extra-intestinale chez les patients à risque ou chez les patients présentant des symptômes sévères ou prolongés (2).

Matériel et méthodes:

En Belgique, les souches de *Salmonella* d'origine humaine sont envoyées sur base volontaire au Centre National de Référence des *Salmonella*. Ce centre réalise un typage de chaque souche et une analyse de la sensibilité aux agents antimicrobiens au moyen de la méthode de diffusion par disque et d'E-test selon les recommandations du NCCLS.

Table 1: Amorces utilisées pour la détection par PCR de l'ADN codant pour les β-lactamase TEM, CTX et SHV.

Amorces	Cible	séquence	Taille de l'amplicon (pb)	Référence ou origine des amorces
TEM-f TEM-r	tem	5' ATGAGTATTCAACATTCCGTC 3' 5' TACCAATGCTTAATCAGTGTG 3'	840	Sanguinetti
CTX-C1 CTX-C2	ctx	5' ATGTGCAGCACCAGAAAGT 3' 5' ACCGGGATATCGTTGGTGG 3'	717	L. Armand-Lefèvre
SHV fw SHV rv	shv	5' ATGGCTTATATTCGCTGTG 3' 5' TTAGCGTTGGCAGTGTG 3'	847	Sanguinetti

Les antibiotiques suivants ont été testés : ampicilline (AMP), amoxicilline (AMX), imipenème (IMP), aztréoname (ATM), céfotaxime (TAX), ceftazidime (CAZ), céfoxitine (FOX), ticarcilline (TIC), piperacilline (PIP), tazobactame (TZB), acide clavulanique (CA) et céfépime (FEP), gentamycine (GEN), streptomycine (STR), vancomycine (VAN), erythromycine (ERY), tétracycline (TET), minocycline (MIN), ciprofloxacine (CIP), chloramphénicol (CHL), triméthoprime + sulfaméthoxazole (SXT). Une électrophorèse en champs pulsés a été réalisée selon les recommandations de PulseNet.

La détection moléculaire des gènes de résistance aux β-lactames a été réalisée par amplification PCR à l'aide d'oligonucléotides tels que décrits dans le tableau 1.

Résultats:

La surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les *Salmonelles*, d'origine humaine, réalisée en Belgique a permis de mettre en évidence une émergence de la multirésistance chez le sérovar Virchow (8% des souches résistantes à 4 antibiotiques ou plus en 2000; 29,7% en 2002 et 52,25% en 2003). Sur la période 2000-2003, ce sérovar représentait environ 1% des cas de salmonellose humaine en Belgique. En 2003, la majorité des isolats de *S. Virchow* (environ 91%) étaient au minimum résistants à l'acide nalidixique (Tableau 2). De plus, une émergence de souches multirésistantes présentant une résistance à la céfotaxime a également été détectée à partir de l'année 2001: un isolat en 2001, 2 en 2002 et 7 en 2003 (Tableau 2). L'utilisation « d'E-test ESBL » a permis de démontrer que ces souches étaient productrices d'une β-lactamase à spectre étendu (BSLE) (Tableau 3).

Tableau 2 : Caractérisation de la sensibilité par la méthode de disque diffusion des *S. Virchow* d'origine humaine isolées entre 2000-2003. Les antibiotiques testés étaient les suivants : ampicilline (AMP), amoxicilline + acide clavulanique (AMX), céfotaxime (CTX), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), acide nalidixique (NAL), streptomycine (STR), sulfamides (SUL), tétracycline (TET), triméthoprime (TMP), ceftazidime (CAZ). La résistance à une céphalosporine est présentée en rouge.

résistance	pattern antibiotogramme	N=		N=		N=	
		2000	2001	2002	2003	%	%
7	AMP AMX CTX TET TMP NAL SUL	13	51	47	44		
6	AMP AMX CTX TMP NAL STR					2,1	
7	SUL					2,1	
6	AMP AMX TET TMP NAL STR					4,3	
7	SUL					13,63	
6	AMP AMX CTX TET TMP NAL SUL						2
6	AMP CHL TET TMP NAL STR SUL		2			6,4	
6	AMP TET STR CHL TMP SUL					2,1	
6	AMP CTX TET TMP NAL SUL					3,9	
6	AMP TET TMP NAL STR SUL					5,9	
5	AMP TET TMP NAL SUL		7,7			2	
5	AMP CTX TMP NAL SUL					10,6	31,81
5	AMP TET TMP NAL SUL					2,27	
4	AMP TMP NAL KAN					2,27	
3	NAL GEN SUL					2,27	
3	AMP TMP NAL					2,1	
3	AMP AMX NAL					4,3	
3	AMP CTX NAL					2,1	
3	AMP NAL SUL		7,7			4,3	
2	AM CAZ		7,7				
2	NAL STR					2,27	
2	TMP NAL					2,1	
2	AMX NAL					9,09	
2	AM NAL					3,9	
1	NAL		30,8	29,4	36,2	20,45	
1	KAN					2,27	
1	STR					2,1	
1	SUL					2,1	
0	Sensitive		46,2	49	14,9	9,09	

Tous les isolats résistants à la céfotaxime (N=10) présentaient également une sensibilité réduite à la ciprofloxacine conférée par la substitution Ser83 vers Phe dans le gène de la gyrase A.

Figure 1: Comparaison de la séquence de la gyrase non mutée avec celle de l'échantillon 03-664 d'origine humaine présentant une résistance à la céfotaxime et une sensibilité diminuée pour la ciprofloxacine. Une substitution Ser 83 vers Phe (TCC vers TTC) a été observée dans la gyrase A de cette souche.

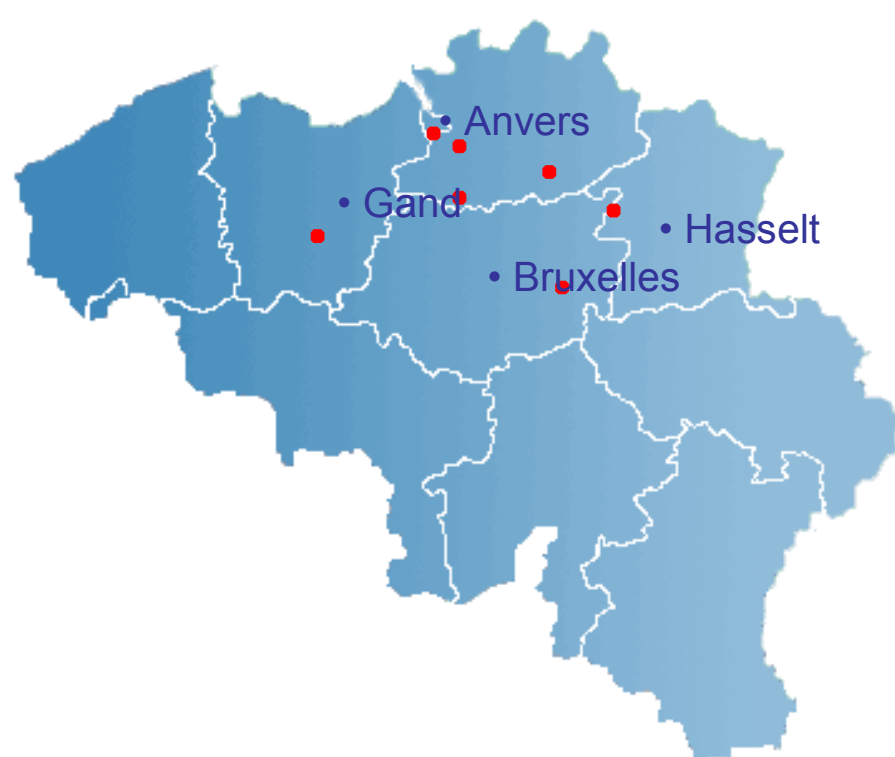
Ser83 → Phe

```

gyrase-A : gatcgcgagtgatgacaccatccttccgtatggcgcagccattctccgcgctgtaac : 174
03-664 : gatcgcgagtgatgacaccatccttccgtatggcgcagccattctccgcgctgtaac : 285
GATT CGCAGTGTATGACACCATCCTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCCGCTGCTTAC
    
```

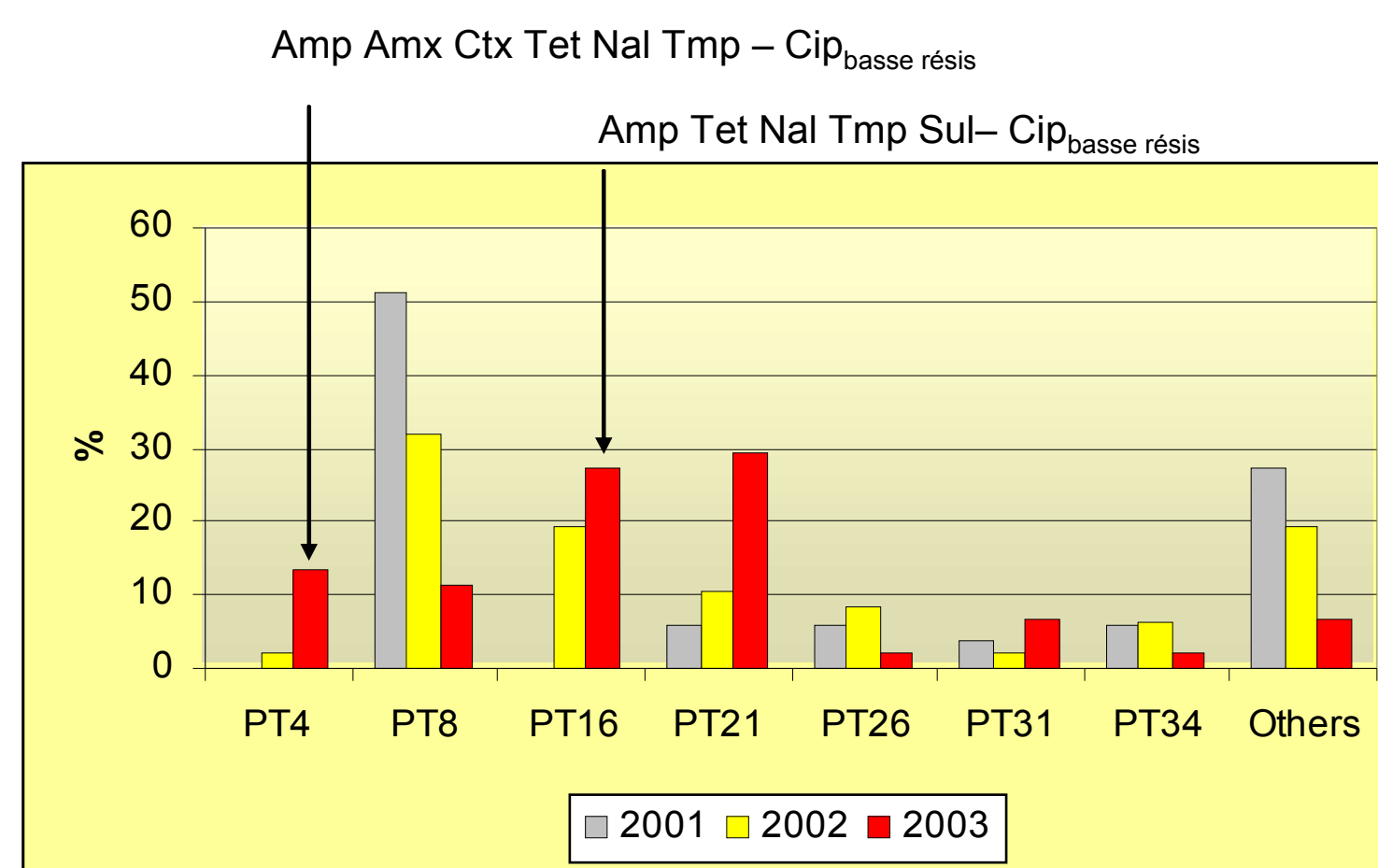
En 2003, six de ces sept isolats producteurs d'une BLSE étaient géographiquement liés dans un triangle formé par les villes d'Anvers, Gand et Hasselt (figure 2).

Figure 2: répartition géographique des *Salmonella* Virchow d'origine humaine isolées en 2003 et présentant une résistance à la céfotaxime



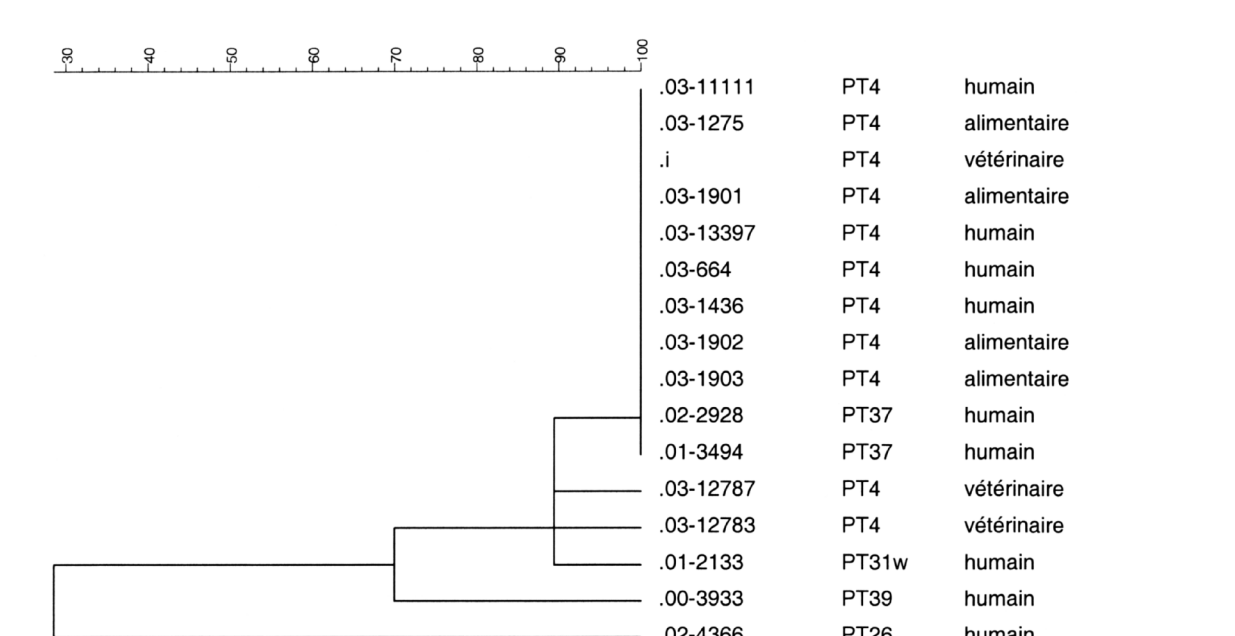
Toutes ces souches productrices d'une BLSE appartiennent au lysotype PT4, lysotype extrêmement rare en 2002 (2,1%) (figure 3).

Figure 3: Distribution des principaux lysotypes en 2000, 2001 et 2002 pour les *Salmonella* Virchow d'origine humaine



Dans le but de déterminer l'origine de cette contamination, des isolats de *S. Virchow* provenant d'aliments humains, de nourritures pour animaux, de prélèvements vétérinaires ont été criblés. Quatre *S. Virchow* d'origine alimentaire (noix de coco pour bétail et poulets destinés à la consommation humaine), ainsi que 3 souches d'origine vétérinaire (peaux et vicères de poulet) présentaient le même profil de multirésistance aux antibiotiques. L'analyse moléculaire (PFGE) a mis en évidence que tous les isolats de *S. Virchow* producteurs d'une BLSE isolés en 2003 avaient le même profil génomique, quelque soit leur origine (figure 3). De plus toutes ces souches sont localisées dans le même triangle géographique, formé par les villes d'Anvers, Gand et Hasselt (figure 2).

Figure 3: Dendrogramme représentant les pourcentages d'homologie entre les profils obtenus par électrophorèse en champs pulsés réalisés sur les différentes souches de *S. Virchow* productrices d'une β-lactamase à spectre étendu.



En vue de caractériser la production de la β-lactamase par ces différentes souches, les concentrations minimales inhibitrices à différentes β-lactamines ont été déterminées (Tableau 3).

Tableau 3: Détermination des concentrations minimales inhibitrices des *S. Virchow* résistantes à la céfotaxime isolées entre 2000 et 2003. Les antibiotiques suivants ont été testés: IMP: imipenème; ATM: aztréoname; CTX: céfotaxime; CAZ: ceftazidime; FOX: céfoxitine; TIC: ticarcilline; PIP: piperacilline; TZB: tazobactame; CA: acide clavulanique; FEP: céfépime; Tic: Ticarcilline + acide clavulanique; PTC: piperacilline + tazobactame; TZL: ceftazidime + acide clavulanique.

Accession	Origine	IMP (μg)	ATM (μg)	CTX (μg)	CAZ (μg)	FOX (μg)	TIC (μg)	PIP (μg)	TZB (μg)	CA (μg)	FEP (μg)	Tic (μg)	Ptc (μg)	TzL (μg)
03-3833	Humain	0,02	16	0,02	4	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1210	Humain	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1464	Humain	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-2959	Humain	0,004	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-4302	Humain	0,02	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-4366	Humain	0,19	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-664	Humain	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1333	Humain	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1436	Humain	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1889	Humain	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1111	Humain	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1207	Humain	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1275	Humain	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1861	Vétérinaire	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1862	Vétérinaire	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1863	Vétérinaire	0,5	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
031	Vétérinaire	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1292	Vétérinaire	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
03-1293	Vétérinaire	0,75	16	0,02	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Une amplification PCR des gènes CTX-M, TEM et SHV a été également réalisée à partir de l'ADN des différentes souches reprises dans le tableau 3 et l'amplicon a ensuite été séquencé. Dans toutes les souches, une β-lactamase de type TEM-1 a été mise en évidence. Toutes les souches isolées 2003 produisaient également une β-lactamase à spectre étendu de type CTX-M2.

Discussion:

Les résultats de cette étude montrent que les *S. Virchow* sont de plus en plus résistantes à un large spectre d'antibiotiques. En 2003, le centre de référence a détecté l'émergence de souches multirésistantes produisant une β-lactamase à spectre étendu de type CTX-M2 et présentant une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (3). Même si l'utilisation des antibiotiques reste extrêmement rare dans la plupart des infections à *Salmonella*, elle devient incontournable dans le cas d'infection extra-intestinale ou chez les patients à risque. Les céphalosporines sont, alors, préférentiellement choisies pour le traitement de jeunes enfants. L'existence de souches produisant une BSLE dans des échantillons alimentaires et dans les élevages de poulets démontre l'origine animale de cette souche. L'utilisation prudente des antibiotiques aussi bien en médecine humaine qu'en médecine animale, ainsi qu'un programme de surveillance, restent essentiels pour contrôler et endiguer ce type de dissémination (4).

Références:

- Parry, C. (2003) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. Current Opinion in Infectious Diseases, **16** : 467-472.
- Simarro E., Navarro F., Ruiz J., Miro E. and Gomez J. (2000) *Salmonella enterica* Serovar Virchow with CTX-M-Like β-Lactamase in Spain. Journal of Clinical Microbiology, **38** : 4676-4678.
- Bonnet, R. (2004) Growing Group of Extended-Spectrum β-lactamase: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **48** : 1-14.
- Eckert C., Gauthier V., Saladin-Allard M., Hidri N., Verdet C., Ould-Hocine Z., Barnaud G., Delisle F., Rossier A., Lambert T., Philippon A. and Arlet G. (2004) Dissemination of CTX-M-Type β-lactamases among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **48** : 1249-1255.

Contact :

Dr. Sophie Bertrand
 Centre de référence des Salmonelles et des Shigelles
 Section de Bactériologie - Département de microbiologie
 Institut Scientifique de la Santé publique (ISP)
 SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire
 et Environnement