

Sensibilité aux antibiotiques d'*Haemophilus influenzae* à Sfax 2 ans après l'introduction de la vaccination anti-Hib en Tunisie

Senda Mezghani Maalej (*), Ratiba Ben Abdallah, Adnene Hammami

Laboratoire de microbiologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie

Laboratoire de microbiologie, Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax, Tunisie

*maalej.sonda@laposte.net / maalejsenda69@gmail.com

4997 reçu le 19 janvier 2020, accepté le 14 mars 2020

Abstract: Antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* in Sfax 2 years after the introduction of the Hib vaccination in Tunisia

A retrospective study was conducted at the Sfax hospitals between 2013-2014 to study the susceptibility to antibiotics of *Haemophilus influenzae* after the introduction of Hib vaccination in Tunisia. Capsular typing was done by PCR. MICs for β -lactams were determined by Etest. The blaTEM, blaROB and ftsI genes were searched for by PCR. Among the 259 strains of H. influenzae isolated, 248 (95.7%) were non-invasive. Five strains were encapsulated (3 type b and 2 type c). Resistance rates were 33.4% for ampicillin, 10.4% for amoxicillin-clavulanic acid, 2.3% for cefixime, 1.1% for cefotaxime and 1.9% for fluoroquinolone. Among the strains resistant to β -lactams, 67 produced β -lactamase type TEM and 40 had a modification of PLP3. This study shows the change in the epidemiology of H. influenzae induced by vaccination with a dramatic decrease of invasive infections. Replacement with other capsular types or with non-typable strains that may be resistant to antibiotics requires continuous surveillance for H. influenzae infections.

Epidemiology
Haemophilus influenzae
Antimicrobial resistance
serotype
Anti-Hib vaccine
Hospital
Tunisia
Maghreb
Northern Africa

Résumé :

Une étude rétrospective a été menée dans les hôpitaux de Sfax en 2013-2014 pour étudier la sensibilité aux antibiotiques d'*Haemophilus influenzae* après l'introduction de la vaccination anti-Hib en Tunisie. Le typage capsulaire des souches d'H. influenzae a été fait par PCR. Les CMI des β -lactamines ont été mesurées par Etest. Les gènes blaTEM, blaROB et ftsI ont été recherchés par PCR. Sur 259 souches d'H. influenzae isolées, 248 (95,7 %) étaient non invasives. Cinq souches étaient capsulées (3 de type b et 2 de type c). Les taux de résistance étaient de 33,4 % pour l'ampicilline, 10,4 % pour l'amoxicilline-acide clavulanique, 2,3 % pour le céfixime, 1,1 % pour le céfotaxime et 1,9 % pour les fluoroquinolones. Parmi les souches résistantes aux β -lactamines, 67 étaient productrices de β -lactamase de type TEM et 40 avaient une modification de PLP3. Cette étude atteste du changement de l'épidémiologie d'H. influenzae induit par la vaccination avec la quasi-disparition des infections invasives. Le remplacement de Hib par d'autres types capsulaires ou par des souches non typables éventuellement résistantes aux antibiotiques impose une surveillance continue des infections à H. influenzae.

Épidémiologie
Haemophilus influenzae
Résistance aux antibiotiques
Sérotype; Vaccin anti-Hib
Hôpital
Tunisie
Maghreb
Afrique du Nord

Introduction

Haemophilus influenzae est responsable d'infections invasives, dont les plus fréquentes sont les méningites, et non invasives. Sa virulence est liée à la présence d'une capsule polysaccharidique. Jusqu'à la fin des années 1980, *H. influenzae* sérotype b (Hib) était incriminé dans 95 % des infections invasives survenant chez l'enfant de moins de 5 ans [8]. L'introduction du vaccin conjugué anti-Hib au début des années 1990 dans de nombreux pays, a entraîné une quasi-élimination des infections invasives à Hib et leur substitution par des souches non capsulées (NTHi) [1]. L'efficacité du vaccin anti-Hib nécessite une surveillance épidémiologique des infections à *H. influenzae* afin de détecter un éventuel remplacement de sérotype.

La résistance acquise aux antibiotiques d'*H. influenzae*, notamment aux β -lactamines, n'a cessé de progresser. Après la description des souches productrices de β -lactamase au cours des années 1970, d'autres mécanismes de résistance sont apparus : résistance par modification de PLP (souches BLNAR pour β -lactamase négative ampicillin résistant), souches possédant les deux mécanismes de résistance (BLPACR pour β -lactamase positive amoxicillin-clavulanic acid résistant) entraînant une résistance aux aminopénicillines et éventuellement aux céphalosporines [8,11].

En Tunisie, le vaccin conjugué anti-Hib a été introduit dans le programme national de vaccination en avril 2011, suivi d'une diminution des infections invasives. L'évolution des résistances d'*H. influenzae* en période post vaccinale n'a pas été étudiée en Tunisie. L'objectif de ce travail était de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*H. influenzae* isolées dans les hôpitaux de Sfax après l'introduction du vaccin anti-Hib.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

Cette étude rétrospective a concerné toutes les souches d'*H. influenzae* isolées au laboratoire de microbiologie du Centre hospitalo-universitaire (CHU) Habib Bourguiba de Sfax durant une période de 2 ans (2013-2014). Ces souches provenaient des malades hospitalisés ou consultants dans les différents services hospitaliers, les dispensaires ou les structures de libre pratique de la région de Sfax.

Nous avons considéré comme invasives les souches isolées à partir d'hémocultures, de liquides céphalo-rachidiens, de liquides de ponction ou d'autres sites

normalement stériles.

Les isolats d'*H. influenzae* ont été identifiés sur leurs caractères morphologiques, culturels, l'exigence en facteurs X+V et les caractères biochimiques avec la galerie API NH (Biomérieux).

Détermination des types capsulaires

Le typage capsulaire a été réalisé par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR simplex) selon la méthode décrite par Falla et al [5].

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

La méthode de diffusion des disques a été utilisée selon les recommandations de l'European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) 2014 [4]. La détection des souches productrices de β -lactamase a été faite par le test chromogénique à la céfinaïse (bioMérieux, Marcy l'Etoile).

Pour les β -lactamines, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été réalisées par la méthode du E-test (AB Biodisk) et interprétées selon les normes de l'EUCAST. Les antibiotiques testés étaient : ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, céfexime, céfotaxime et céftriaxone pour toutes les souches. Les CMI des fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine) ont été déterminées pour les souches résistantes à l'acide nalidixique [4]. Un contrôle de qualité interne a été effectué régulièrement avec les souches de référence *H. influenzae* ATCC 49247 (BLNAR) et *H. influenzae* ATCC 49766 (sensible).

Étude moléculaire des gènes de résistance à l'ampicilline

Les gènes blaTEM, responsable de la production d'une β -lactamase de type TEM ; blaROB, responsable de la production d'une β -lactamase de type ROB et ftsI, codant pour le domaine transpeptidase de la PLP 3 ont été recherchés par PCR simplex pour toutes les souches. Le gène ftsI est présent chez les souches ne présentant pas de modification de PLP3 [2].

Résultats

Durant la période d'étude, 259 souches d'*H. influenzae* ont été isolées. L'âge des patients variait de 1 mois à 97 ans. Les souches isolées étaient non invasives dans 95,7 % des cas (Tableau 1). Cinq souches seulement étaient capsulées : 3 de type b et 2 de type c. Les 3 souches d'Hib provenaient de patients non vaccinés contre Hib : prélèvements respiratoires chez un enfant âgé de 2 ans et un adulte de 45 ans et ponction articulaire chez un

Répartition des souches d'*Haemophilus influenzae* isolées selon le type de prélèvement et selon l'âge des patients
Distribution of strains of *Haemophilus influenzae* isolated according to the type of sample and according to the age of patients

Age	Types de prélèvements								Total N=259
	Invasifs				Non invasifs				
	pus profond ^a N=7	ponction ^b N=2	LCR N=1	hémoculture N=1	respiratoire N=176	ORL N=55	conjonctival N=15	pus superficiel N=2	
< 2 mois					1	1	1		3 (1,2 %)
2 mois – 2 ans				1	20 ^d	28	10		59 (22,8 %)
2-4 ans					15	9	2		26 (10 %)
5-17 ans	1				31	10			42 (16,2 %)
18-65 ans	4	1	1		80 ^e	5 ^f	2	2	95 (36,7 %)
≥ 65 ans	2	1 ^c			29	2			34 (13,1 %)

a : abcès pulmonaire et abcès pancréatique ; b : ponction articulaire et ponction pleurale ; c : 1 souche de type b ; d : 1 souche de type b ; e : 1 souche pour chacun des types b et c ; f : 1 souche de type c

patient âgé de 67 ans. Les 2 souches de type c étaient isolées à partir d'un prélèvement respiratoire et d'un prélèvement ORL chez deux adultes de 22 ans et 45 ans, respectivement.

L'étude des CMI des β -lactamines et les résultats de l'amplification des gènes blaTEM, blaROB et ftsI ont permis de subdiviser les souches en 4 catégories (Tableau 2) : 167 souches étaient sensibles à toutes les β -lactamines, 25 souches non productrices de β -lactamase de type TEM ou ROB et présentant des modifications de PLP ont été classées BLNAR. Parmi les 67 souches résistantes à l'ampicilline avec présence de β -lactamase de type TEM, 15 étaient résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique par modification de PLP (PCR gène ftsI négative) : BLPACR. Aucune souche productrice de blaROB n'a été trouvée.

Les pourcentages de résistance aux autres antibiotiques étaient de 3,3% pour la tétracycline, 1,5% pour la rifampicine, 26,3% pour le cotrimoxazole. Cinq souches (1,9%) étaient résistantes aux fluoroquinolones avec des CMI variant de 3 à 32 mg/L pour la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Discussion

En Tunisie, l'introduction de la vaccination anti-Hib a été suivie d'une quasi-disparition des infections invasives, notamment des méningites, comme dans les pays ayant réalisé des études après vaccination [1,8]. Dans cette étude rétrospective,

sur 11 souches invasives isolées, 10 étaient non capsulées et 9 étaient isolées chez des adultes. Cette constatation est faite dans la majorité des études post-vaccinales [1,3,12]. Les infections à Hib devenant rares chez les enfants de moins de 5 ans et affectant plutôt les adultes et les immunodéprimés [3,8]. Les souches de type c, isolées de prélèvements respiratoire et ORL, sont moins virulentes et moins résistantes au complément que les souches d'Hib [3,8].

Dans notre étude, 33,4 % des souches étaient résistantes à l'ampicilline, et 10,4 % étaient résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique. Ces résultats sont comparables à ceux d'une étude réalisée en période pré-vaccinale à Tunis entre 1999 et 2005 [10]. La production de β -lactamase est le mécanisme de résistance à l'ampicilline le plus fréquemment rencontré chez *H. influenzae*. L'enzyme TEM-1 est retrouvée dans plus de 90 % des cas [8,10]. La production de β -lactamase de type TEM a été mise en évidence dans 25 % des souches étudiées dans notre série.

La résistance par modification de PLP3 suite à des mutations du gène ftsI est le deuxième mécanisme de résistance acquise aux β -lactamines. Nos souches BLNAR étaient majoritairement de bas niveau de résistance à l'ampicilline (CMI de l'ampicilline entre 1 et 4 mg/L). Les CMI50/90 de l'ampicilline et de l'amoxicilline-acide clavulanique étaient respectivement de 1/2 mg/L et 2/4 mg/L (3 à 4 fois plus élevées que les souches sauvages). Ces résultats se rapprochent de ceux retrouvés dans des études

Activité des β -lactamines en fonction du phénotype de résistance d'*H. influenzae*
 Activity of β -lactams according to the resistance phenotype of *H. influenzae*

	BLNAS N=167 (64,5 %)			BLNAR N=25 (9,6 %)			BLPAR N=52 (20,1 %)			BLPACR N=15 (5,8 %)			Total N=259 (100 %)			% résistance
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalle de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalle de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalle de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalle de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Intervalle de CMI	
Ampicilline	0,25	1	0,064-1	1	2	1-4	≥ 256	≥ 256	3- ≥ 256	≥ 256	≥ 256	24- ≥ 256	0,5	≥ 256	0,064- ≥ 256	33,4
Amoxicilline- acide clavulanique	0,5	1	0,25-1	2	4	2-6	1	1	0,5-2	4	4	3-6	1	2	0,5-6	10,4
Céfixime	0,032	0,064	0,032- 0,064	0,064	1	0,032-2	0,064	0,064	0,032- 0,12	0,064	0,064	0,064- 0,094	0,064	0,064	0,032-2	2,3
Céfotaxime	0,012	0,032	0,012- 0,032	0,064	0,25	0,032- 0,25	0,016	0,032	0,012- 0,064	0,064	0,064	0,023- 0,064	0,016	0,032	0,012- 0,25	1,1
Ceftriaxone	0,006	0,008	0,003- 0,012	0,016	0,064	0,008- 0,064	0,006	0,008	0,003- 0,012	0,012	0,016	0,008- 0,016	0,006	0,008	0,006- 0,064	0

BLNAS : β -lactamase negative ampicillin susceptible ; BLNAR : β -lactamase negative ampicillin resistant ; BLPACR : β -lactamase positive ampicillin resistant
 BLPACR : β -lactamase positive amoxicillin-clavulanic acid resistant
 CMI : Concentration minimale inhibitrice

faites en Tunisie et en Europe [3,6,10].

Parmi les 259 souches isolées, 6 de phénotype BLNAR, étaient résistantes au céfixime dont 3 étaient aussi résistantes au céfotaxime, mais aucune souche résistante à la céftriaxone n'a été détectée. La supériorité de l'activité intrinsèque de la céftriaxone par rapport au céfotaxime sur les souches d'*H. influenzae* a été aussi documentée dans d'autres études [7,11].

La résistance d'*H. influenzae* aux fluoroquinolones est rare. Elle a été observée chez les sujets âgés ou présentant des bronchopneumopathies chroniques traitées par fluoroquinolones à plusieurs reprises ou au long cours [9,11]. Cette résistance concerne le plus souvent des souches non capsulées et non invasives. Nous l'avons observée sur 5 souches (1,9 %), isolées de prélèvements respiratoires.

La résistance au cotrimoxazole, de 26,3 % dans cette série, varie de 20 % et 50 % selon les études [7,11].

La rifampicine et la tétracycline sont des antibiotiques habituellement peu prescrits dans le traitement des infections à *H. influenzae*. Le faible taux de résistance à ces antibiotiques (3,6 % pour la tétracycline et 1,5 % pour la rifampicine) est habituel ; il ne dépasse pas 5 % des souches isolées en Europe et en Amérique du Nord [7,11].

Conclusion

En conclusion, ces données confirment le changement de l'épidémiologie des infections à *H. influenzae* après l'introduction de la vaccination anti-Hib avec une quasi-disparition des infections invasives. Le remplacement des souches d'Hib par des souches d'*H. influenzae* non capsulées ou par des types capsulaires moins virulents doit inciter à la vigilance. La résistance aux antibiotiques, en particulier aux céphalosporines et aux fluoroquinolones nécessite une surveillance microbiologique régulière de ces infections.

Conflit d'intérêt : aucun

Références

1. Agrawal A, Murphy TF. (2011) *Haemophilus influenzae* Infections in the H. influenzae Type b Conjugate Vaccine Era. J Clin Microbiol 49(11):3728-32. doi: 10.1128/JCM.05476-11. Epub 2011 Sep 7.
2. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, et al (2002) Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 46(7):2208-18.
3. Dabernat H, Delmas C (2012) Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31(10):2745-53. Epub 2012 Apr 27.
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (2014) Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 4.0 [en ligne]
5. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, et al (1994) PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 32(10):2382-6
6. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, et al (2007) Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. Antimicrob Agents Chemother 51(7):2564-73. Epub 2007 Apr 30.
7. Gaillot O (2009-2010, 2011, 2012, 2013, 2014 et 2015) CNR *Haemophilus influenzae*. Rapports d'activité.
8. Kayal S, Degand N (2010) Après 20 ans de vaccination efficace, que reste-t-il des infections à *Haemophilus influenzae* ? Med Ther 16(2):133-42
9. Kuo SC, Chen PC, Shiau YR, et al (2014) Levofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae*, Taiwan, 2004-2010. Emerg Infect Dis 20:1386-90
10. Oueslati S, Smaoui H, Joubert G, et al (2009) Etude de la résistance aux β -lactamines et des marqueurs moléculaires chez 157 souches d'*Haemophilus influenzae* isolées chez l'enfant à Tunis. Can J Microbiol. 55(5):515-9. doi: 10.1139/W08-142
11. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC (2007) Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 20(2):368-89
12. Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW (2014) Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. Lancet Infect Dis 14(12):1281-92. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70734-0. Epub 2014 Jul 7.