



Article Original

Facteurs de Pathogénicité et Résistance aux Antibiotiques des Souches d'*Escherichia coli* isolées chez les Enfants Diarrhéiques de 0 à 59 Mois en Milieu Communautaire à Bamako

Pathogenicity factors and antibiotic resistance of Escherichia Coli strains isolated from diarrheal children aged 0 to 59 months in community settings in Bamako.

Ibrehima Guindo^{1,2}, Alhadji Alassane Dicko¹, Issa Konaté^{3,4}, Karamoko Sacko^{4,5}, Mahamadou Abdou¹, Sounkalo Dao^{3,4}, Flabou Bougoudogo²

RÉSUMÉ

(1)Institut National de Santé Publique, Bamako-Mali
 (2)Faculté de Pharmacie, USTTB Bamako-Mali
 (3)Service de Maladie infectieuses et tropicales, CHU-Point G, Bamako-Mali
 (4)Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, USTTB Bamako-Mali
 (5)Service de Pédiatrie, CHU Gabriel Touré, Bamako Mali

Auteur correspondant

Ibrehima Guindo, PharmD, DES, PhD
 Institut National de Santé Publique (INSP), Département Laboratoire et Recherche Biomédicale (DLRB)
 Hippodrome, Route de Koulikoro
 Rue 235, Porte 52, BP : 1771, Bamako – Mali
 E-mail : guindo50@gmail.com
 Tél. +223 76078639

Mots clés : enfants, diarrhée, Bamako, *E. coli*, gènes de résistance.

Keywords: children, diarrhea, Bamako, *E. coli*, resistance genes.

Contexte. La diarrhée demeure un problème de santé publique au Mali. Le but de ce travail était d'identifier les facteurs de pathogénicité et les gènes de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées chez les enfants diarrhéiques de moins de 5 ans. **Matériels et Méthodes.** L'étude a concerné les enfants âgés de 0 à 59 mois diarrhéiques reçus dans 4 centres de santé communautaires de Bamako. Une coproculture standard a été effectuée, suivie d'une recherche de gènes par PCR. Les gènes codant les adhésines (*bfp*, *eae*, *ipah* et *eagg*), les entérotoxines (*slt1*, *slt2*, *lt* et *sta*), la résistance aux bêta-lactamines (*oxaA1*, *shv*, *tem*), aux phénicolés (*catA1*), aux cyclines (*Tet*), aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) et les intégrons de classe 1 (*intl1*), classe 2 (*intl2*) et classe 3 (*intl3*) ont été recherchés. **Résultats.** 120 patients des quatre centres communautaires ont été inclus ; le sexe masculin a été le plus représenté avec 62%, de même que la tranche d'âge de 7 à 12 mois. *E. coli* a été isolé dans 30,8% des cas. Les gènes de virulence les retrouvés étaient : *slt1* (11), *sta* (16), *bfp* (7), *eae* (7) et *ipaH* (6). Les intégrons et gènes spécifiques de résistance aux antibiotiques les plus retrouvés étaient : *intl1* (14 cas), *intl3* (13), *tet* (25), *shv* (8), *tem* (15), et *qnrS* (11). **Conclusion.** *Escherichia coli* demeure fréquente chez les enfants diarrhéiques avec une production de toxine et une résistance aux antibiotiques usuels nécessitant une surveillance moléculaire renforcée.

ABSTRACT

Background. Diarrhea remains a public health problem in Mali. The aim of this work was to identify pathogenicity factors and antibiotic resistance genes of strains of *Escherichia coli* isolated in cases of diarrhea in children under 5 years. **Material and method.** The study involved children aged 0 to 59 months seen in 4 community health facilities. A standard coproculture was carried out followed by a conventional PCR. The genes encoding the adhesins (*bfp*, *eae*, *ipah* and *eagg*), the enterotoxins (*slt1*, *slt2*, *lt* and *sta*), the resistance to beta-lactams (*oxaA1*, *shv*, *tem*), to phenicols (*catA1*), to cyclins (*Tet*), to quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), Class 1 (*intl1*), class 2 (*intl2*) and class 3 (*intl3*) integrons were searched. **Results.** 120 patients from 4 community health facilities were included; the male sex was the most represented with 62%, as well as the age group from 7 to 12 months. *E. coli* was isolated in 37 patients (30.8%). The most virulence genes found were: *slt1* (11), *sta* (16), *bfp* (7), *eae* (7), *ipaH* (6). The most integrons and antibiotic resistance genes found were: *intl1* (14 cases), *intl3* (13), *tet* (25), *shv* (8), *tem* (15), *qnrS* (11). **Conclusion.** *Escherichia coli* remains common in children with diarrhea associated with toxin production and resistance to common antibiotics, requiring enhanced molecular surveillance.

INTRODUCTION

Les maladies entériques représentent la 2^{ème} cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans avec 2,5 milliards de cas estimés dans le monde et 1,5 millions de morts chaque année (1). L'Afrique Subsaharienne présentent des taux de mortalité très élevés (2). Les bactéries entéro-pathogènes dont *Escherichia coli*, occupent une place importante tant par leur fréquence que par la gravité des affections qu'elles provoquent (3). *E. coli* est considéré comme un colonisateur normal de la microflore

digestive de l'homme mais peut cependant être pathogènes. C'est le cas des pathovars (4) parmi lesquels les souches entérohémorragiques (EHEC), entéro-pathogène (EPEC), entérotoxigène (ETEC), entero-invasif (EIEC), entéro-aggrégatif (EAggEC) (5). Ces souches provoquent des diarrhées et colites diverses, régulièrement acquises par intoxications alimentaires (6). Elles peuvent être également à l'origine de manifestations cliniques d'extrême sévérité et conduisant à des décès. La létalité varie de 3 à 5 % et plus

d'un tiers des malades conservent des séquelles rénales à long terme pour les souches entéro-hémorragiques (7). Les facteurs de pathogénicité qui sont les adhésines, les toxines, les enzymes hydrolytiques augmentent les capacités des bactéries à instaurer l'infection chez les sujets porteurs (8). Les agents antibactériens de premier choix pour le traitement des diarrhées à colibacilles sont les bêta-lactamines, les sulfamides et les quinolones. Des résistances à ces antibiotiques émergent et sont généralement codées par des plasmides qui peuvent porter les gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques avec des capacités de dissémination élevée (9). Au Mali, la diarrhée constitue le 3^{ème} motif de consultation des enfants de moins de 5 ans (1), et la première cause de consultation chez enfants de 1 à 35 mois hospitalisés au service de pédiatrie générale du CHU Gabriel Touré (10) ; Selon l'enquête démographique et de santé (EDSM-V), 9% des enfants de moins de 5 ans avaient un épisode diarrhéique particulièrement importante chez les nourrissons de 6-11 mois (12,8%) et de 12-23 mois (13%) (11) ; ces âges sont ceux auxquels les enfants commencent à recevoir des aliments autres que le lait maternel et commencent à explorer leur environnement les exposant davantage à la contamination par les agents pathogènes (12). Le nombre total de décès chez les enfants de moins de cinq ans dû à la diarrhée en 2010 était de 17 977 avec environ 14% des décès (13). Peu d'entre elles ont porté sur la recherche des facteurs de pathogénicité au Mali notamment la recherche des adhésines et des toxines. Nous disposons également de peu de données décrivant les gènes associés à la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) types blaTEM-1, blaSHV-1 et blaCTX-M, à la résistance aux cyclines, quinolones et sulfamides (9, 14-18). Notre étude vise donc à déterminer la fréquence des gènes des facteurs de pathogénicité et de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées chez les enfants de moins de 5 ans en milieu communautaire à Bamako.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Sites de l'étude

L'étude s'est déroulée à Bamako dans quatre centres de santé communautaire (CSCOM) qui sont l'association de santé communautaire de Sikoroni (ASACOSIK 1), de Boukassoumbougou (ASACOBOUL 1), de Torokorobougou/Quartier-Mali (ASACOTOQUA), et de Sabalibougou (ASACOSAB 1).

Type, période et population de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale prospective chez les enfants âgés de 0 à 59 mois, dont la collecte a été réalisée de février 2016 à août 2017. Nous avons considéré trois saisons de collecte soit la saison fraîche (de novembre à mars), la saison chaude (d'avril à fin juin) et l'hivernage (de juillet à octobre). La population étudiée concernait les enfants de 0 à 59 mois fréquentant l'un des centres de santé communautaires et présentant au moins un épisode de diarrhée.

Échantillon biologique

Les échantillons de selles fraîches ont été recueillis chez les enfants dans les pots stériles dans les centres de santé communautaires et acheminés au laboratoire de

bactériologie à l'institut national de santé publique (INSP), conditionnés dans un emballage secondaire, lui-même placé dans un emballage tertiaire.

Examens de laboratoire

Examen macroscopique et état frais

Les prélèvements reçus ont fait l'objet d'examen macroscopique afin d'observer si les selles étaient pâteuses/molles, liquides, glaireuses, sanguinolentes. Une suspension dans 1 ml d'eau physiologique observée entre lame et lamelle au microscope au grossissement 10 et 40 permettait également observer la flore et présence d'éléments caractéristiques. La même lame était colorée au Gram pour compléter l'appréciation de la flore.

Culture et identification

Les échantillons ont été cultivés sur gélose EMB (Eosin methylene blue) en raison de l'aspect caractéristique d'*E. coli* sur ce milieu, et incubés à 35±5°C pendant 18 à 24h. Après coloration de Gram, une colonie isolée caractéristique avec éclat métallique faisait l'objet de test à l'oxydase et ensemencée sur Kligler-Hajna. Une suspension permettait d'inoculer les puits de la galerie API (Analytical Profile index) 20E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) pour la recherche de vingt caractères biochimiques. Les souches identifiées ont fait l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques, de tests d'agglutination pour la recherche d'antigènes O, et conservées dans un bouillon glycéro à -80°C pour la recherche des gènes des facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques par réaction polymérisation en chaîne (PCR).

Tests de sensibilité aux antimicrobiens

Des tests de sensibilité aux antimicrobiens ont été effectués sur tous les isolats par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (Sanofi Diagnostics Pasteur), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les antibiotiques testés étaient l'amoxicilline (25µg), la céfoxitine (30µg), la céfépime (30µg), l'association Amoxicilline / acide clavulanique (20 µg/10µg), la ceftazidime (30µg), la ticarcilline (75µg), le chloramphénicol (30µg), l'association triméthoprim / sulfaméthoxazole (1,25µg/23,75µg), la péfloxacin (5µg), l'acide nalidixique (30µg), l'amikacine (30µg), la tobramycine (10µg), la tétracycline (30UI), la gentamycine (10UI) et l'imipénem (10µg). Sur tous les isolats la recherche de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) a été faite en observant le bouchon de champagne à l'aide de disques de ceftazidime (30 µg), de céfotaxime (30 µg), de céfépime (30µg) disposés autour du disque amoxicilline / acide clavulanique (20 µg/10µg).

Recherche de pathovars par agglutination

Les souches *E. coli* ont fait l'objet d'agglutination pour la recherche d'antigènes O spécifiques associés à la pathogénicité, à l'aide du kit antisérum *Escherichia coli* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette). Ce kit a permis la recherche de 12 sérotypes dont 9 regroupés en nonavalent (incluant le trivalent I, Trivalent II et trivalent III) et le trivalent IV. Le trivalent I permet de détecter les antigènes O111, O55, O26, le trivalent II les antigènes O86, O119,

O127, le trivalent III les antigènes O125, O126, O128 et le trivalent IV les antigènes O124, O114 et O142. Le nonavalent était testé en premier lieu et les trivalents I, II et III n'étaient testés qu'en cas d'agglutination du nonavalent, et le trivalent IV en cas de non-agglutination du nonavalent.

Recherche des gènes des facteurs de pathogénicité et de résistance aux antibiotiques

Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir des isolats d'E. coli par le procédé dit de « choc thermique ». Quatre à cinq colonies jeunes obtenues par repiquage ont été remises en suspension dans 200µl d'eau distillée stérile et mis à -20°C pendant 30 minutes. La suspension est ensuite chauffée à ébullition pendant 10 minutes dans un bain-marie à une température supérieure ou égale à 95°C puis soumise à une centrifugation à 12 000 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a été utilisé comme matrice d'ADN.

Amplification par PCR

Pour toutes les réactions d'amplification génique, un témoin négatif constitué par l'eau d'extraction et un témoin positif (souches de référence : E2348-69, M90T, 17.2, EDL 933, EDL 1493, R3, R4, R5, R6, R7) ont été utilisés. Le

mixte réactionnel d'un volume de 22,5µl était composé de 2,5µl de solution tampon, 14,25µl d'eau, 1,5µl d'amorces sens et antisens à une concentration de 10 mM, 0,25µl de polymérase 5UI/µl. Un volume de 2,5µl d'extrait d'ADN était ajouté au mixte réactionnel pour un volume final de 25µl dans chacun des puits correspondant et soumis à un cycle thermique dans un thermocycleur ABI 9700 (Applied Biosystems™, USA) de 95°C pendant 5min (dénaturation initiale), suivi de 35 cycles de 95°C pendant 30s (dénaturation), d'une température variable d'hybridation pendant 39s selon les amorces (voir tableau I), de 72°C pendant 60s (élongation). Huit facteurs de pathogénicité ont été recherchés à travers les amorces ciblant quatre adhésines et quatre toxines (voir tableau I). Les gènes des adhésines recherchées étaient *bfp*, *eae*, *ipaH*, *Eagg*, et les gènes des toxines étaient *slt1*, *slt2*, *lt* et *sta*. Les gène *bfp* et *eae* permettaient la recherche des souches entéro-pathogènes (EPEC), le gène *ipaH* pour la recherche des souches entéro-invasives (EIEC), le gène *agg* pour la recherche des souches entéro-agrégatives (EAaggEC), les gènes *slt1* et *slt2* pour la recherche des souches entéro-hémorragiques (EHEC), le gène *lt* pour la recherche des souches entéro-toxinogènes (ETEC).

Tableau I : Liste des amorces utilisées pour le typage de la virulence d'E. coli par PCR

Noms des gènes	Séquences nucléotidiques (5' → 3')	Températures d'hybridation	Tailles amplicon
Gènes des adhésines			
<i>bfp</i>	GAC ACC TCA TTG CTG AAG TCG CCA GAA CAC CTC CGT TAT GC	57°C	324 bp
<i>eae</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG	65°C	494 bp
<i>ipaH</i>	GAA AAC CTC CTG GTC CAT CAG G GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	53°C	424 bp
<i>eagg</i>	ACG CAG AGT TGC CTG ATA AAG AAT ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	53°C	630 bp
Gènes des toxines			
<i>slt1</i>	TTT ACG ATA GCA TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	56°C	130 bp
<i>slt2</i>	CTT CAC GTC ACC ATA CAT AT ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA	56°C	346 bp
<i>lt</i>	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	56°C	707 bp
<i>sta</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	43°C	146 bp
Gènes de résistance aux antibiotiques			
<i>int1</i>	ACATGTGATGGCGACGCA CGA ATTTCTGTCCTGGCTGGC GA	57°C	580 pb
<i>int2</i>	GTAGCAAACGACTGACGAAAT G CACGGATATGCGACAAAA AGG T	62°C	806 pb
<i>int3</i>	GCC CCG GCA GCG ACT TTC AG ACG GCT CTG CCA AAC CTG ACT	62°C	1200 pb
<i>blaOXA1</i>	ATGAAAAACAATACATATC AATTTAGTGTGTTAGAATGG	55°C	890 pb
<i>blaSHV</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC GATTTGCTGATTCGCTCGG	55°C	800 pb
<i>blaTEM</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	55°C	850 pb
<i>catA1</i>	CGCCTGATGAATGCTCCG CCTGCCACTCATCGAGTAC	57°C	450 pb
<i>tet</i>	GTAGTAATTCTGAGCACTGTCCGC CTGCCTGGACAACATGCTT	55°C	956 pb
<i>qnrA</i>	TCAGCACAAGAGGATTCTC GGCAGCACTATTACTCCA	55°C	657 pb
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAAGCCAGAAAGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	55°C	469 pb
<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCTGTAGGC	55°C	417 pb

Le gène *sta* pour la recherche des toxines thermostables cytotoxiques qui agissent sur le contrôle entérocytaire de la sécrétion hydro-électrolytique.

La recherche des gènes de résistance aux antibiotiques a porté sur les gènes codant pour la production de bêta-lactaminase à spectre étendu (*blaOXA1*, *blaSHV*, *blaTEM*), le gène codant pour l'acétyltransférase des pénicillines (*catA1*), le gène codant pour de l'efflux des cyclines ou la protection du ribosome (*tet*), les mutations sur les gènes codant pour les protéines de protection des topoisomérases IV et ADN gyrase cibles des quinolones (gènes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) et les intégrons de classe 1 (*intI1*), classe 2 (*intI2*) et classe 3 (*intI3*) qui portent des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques.

Révélation de la réaction de PCR

Les produits de PCR ont fait l'objet de migration sur gel d'agarose à 1,5% préparé dans un tampon TAE (Tris-EDTA) et visualisés à l'aide d'un transilluminateur les tailles attendue (voir tableau I) avec une échelle de poids moléculaire (DNA molecular weight 100µg, promega).

Analyses des données

Les données ont été collectées à partir d'un formulaire standard comprenant les informations sociodémographiques, cliniques et biologiques. L'analyse a été faite à l'aide du logiciel SPSS™, version 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) et les résultats générés sous forme de tableaux de fréquence. Le test de khi-deux a été utilisé pour la comparaison des proportions (seuil de signification $p < 0,05$)

Aspects éthiques

L'étude s'est déroulée dans un contexte de surveillance de routine dans les centres de santé communautaires. Aucun test ou prélèvement supplémentaire n'a été demandé et les examens réalisés l'ont été faits gratuitement. Un consentement libre et éclairé écrit a été obtenu de tous les parents des enfants ainsi que l'assentiment des enfants.

RÉSULTATS

Caractéristiques sociodémographiques des patients

L'étude a porté sur des échantillons de coproculture de 120 patients vus pour des épisodes de diarrhée dans les quatre CSCOM avec une fréquence de collecte plus élevée à ASACOSIK 1 (33 patients) et ASACOSAB 1 (50 patients). Les sujets de sexe masculin étaient les plus représentés avec 64,2% et un sex-ratio de 1,72. Plus de la moitié des enfants étaient âgés de moins de 12 mois avec une fréquence plus élevée dans la tranche d'âge de 7 à 12 mois représentant 46,7% (voir tableau II). La plupart des familles des enfants avaient une consommation d'eau provenant de robinet à domicile (74,2%).

Culture bactérienne

Les selles, systématiquementensemencées pour la recherche de bactéries pathogènes, étaient glaireuses à 45% et présentaient des traces de sang dans 1,7% des cas, les enfants présentant majoritairement la fièvre et le vomissement comme signes associés à la diarrhée. Une antibiothérapie antérieure au prélèvement a été enregistrée dans 24,2% des cas.

Trente-sept souches d'E. coli ont été isolées chez des enfants soit une fréquence d'isolement de 30,8% (37/120). La fréquence la plus élevée a été observée à la saison fraîche avec 21 cas parmi les cas de diarrhée observés à la même période soit 60% d'isolement (voir tableau III). Le CSCOM de Sikoroni (ASACOSIK1) a présenté le plus grand nombre d'isolements avec 18 échantillons positifs. Aucune tranche d'âges ne présentait un écart significatif en termes de fréquence d'isolement d'E. coli (voir tableau III).

Tableau II : Caractéristiques sociodémographiques des patients

Variables (n=120)	Effectif	Pourcentage
Sites		
ASACOBOUL 1	12	10,0
ASACOSAB 1	50	41,7
ASACOSIK 1	33	27,5
ASACOTOQUA	25	20,8
Tranches d'âges (mois)		
0-6	16	13,3
7-12	56	46,7
13-18	25	20,8
19-24	18	15,0
<25	5	4,2
Sexe		
Féminin	43	35,8
Masculin	77	64,2
Approvisionnement en eau de boisson		
Eau minérale	9	7,5
Borne fontaine	12	10,0
Robinet à domicile	89	74,2
Puits	10	8,3
Signes cliniques majeurs associés à la diarrhée*		
Vomissement	50	41,7
Fièvre	51	42,5
Soif	35	29,2
Pli cutané	26	21,7
Altération de la conscience	03	2,5
*Plus d'un signe peut être observé par patient		

Tableau III : Résultat de la culture en fonction des saisons de prélèvement, des sites, de l'âge et du mode d'approvisionnement en eau de boisson

Saisons (p=0,000)	Escherichia coli		Total
	Oui	Non	
Saison fraîche	21	14	35
Saison chaude	1	8	9
Hivernage	15	61	76
Sites (p=0,002)			
ASACOBOUL 1	5	7	12
ASACOSAB 1	8	42	50
ASACOSIK 1	18	15	33
ASACOTOQUA	6	19	25
Tranche d'âges (p=0,414)			
≥1 an	18	37	55
<1 an	19	46	65
Mode d'approvisionnement en eau (p=0,573)			
Eau minérale	2	7	9
Borne fontaine	3	8	12
Robinet à domicile	30	59	89
Puits	2	8	10
Total	37 (30,8%)	83	120

Profil de résistance aux antibiotiques

Les antibiogrammes par diffusion sur gélose ont montré des fréquences élevées de résistance aux antibiotiques (voir tableau IV). Parmi les souches isolées, la résistance aux bêta-lactamines était de 86,4% pour l'amoxicilline, 59,5% pour l'association avec l'acide clavulanique,

21,6% pour la céfoxitine. La sensibilité à l'imipénème était conservée. Concernant les quinolones, E. coli présentait une résistance 51,4% à l'acide nalidixique (mais 72,9% avec les souches de sensibilité intermédiaire) et de 64,9% aux fluoroquinolones. Les aminosides étaient la famille d'antibiotique ayant la plus conservée sa sensibilité avec une résistance de 29,7% pour la gentamicine et 18,9% pour l'amikacine.

Tableau IV : Résistance des souches d'Escherichia coli aux antibiotiques

Antibiotiques (n=37)	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Bêta-lactamines			
Amoxicilline	5 (13,5%)	0	32 (86,4%)
Céfoxitine	29 (78,4%)	0	8 (21,6%)
Céfépime	22 (59,5%)	7	8 (21,6%)
Amoxicilline + acide clavulanique	15 (40,5%)	0	22 (59,5%)
Ticarcilline	4 (10,8%)	0	33 (89,2%)
Imipénème	33 (89,2%)	4	0
Ceftazidime	25 (67,6%)	7	5 (13,5%)
Quinolones			
Péfloxacin	13 (35,1%)	0	24 (64,9%)
Acide nalidixique	10 (27,0%)	8	19 (51,4%)
Aminosides			
Amikacine	26 (70,2%)	4	7 (18,9%)
Tobramycine	23 (62,2%)	6	8 (21,6%)
Gentamicine	25 (67,6%)	1	11 (29,7%)
Autres			
Chloramphénicol	35 (94,6%)	0	2 (5,4%)
Sulfaméthoxazole triméthoprime	4 (10,8%)	0	33 (89,1%)
Tétracycline	2 (5,4%)	5	30 (81,1%)

Résultats de facteurs de pathogénicité et gènes de résistance

Le tableau V indique la fréquence des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance. Les tests d'agglutination de l'antigène O ont montré une positivité dans 9 cas dont la plus fréquente au sein du trivalent II comportant les antigènes O86, O119, O127 retrouvé majoritairement chez les EPEC. Les facteurs de pathogénicité recherchés par PCR ont révélé la présence des gènes : 2 *lt* (5,4%), 11 *slt1* (29,7%), 16 *sta* (43,2%), 4 *Eagg* (10,8%), 7 *bfp* (18,9%) et 7 *eae* (18,9%), 6 *ipaH* (16,2%).

Le gène le plus fréquent était le gène *sta* avec une fréquence de 43,2%. En ce qui concerne les gènes codants pour les intégrons, nos isolats ont présenté pour *int1*, *int2* et *int3* 14, 5 et 13 positifs respectivement (tableau V). Sur 37 souches analysées, 5 (13,5%), 25 (67,5%), 8 (21,6%), 15 (40,5%), 3 (8,1%), 4 (10,8%) et 11 (29,7%) étaient positifs pour les gènes *catA*, *tet*, *Shv*, *Tem*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*. Ni les gènes *slt2* ni *oxa* n'ont été détectés parmi tous les isolats.

DISCUSSION

Ce travail a permis d'inclure dans des conditions réelles d'exercice des centres de santé communautaires 120 enfants avec épisodes de diarrhées, pour la plupart moins d'un an et de sexe masculin. Cette même tendance a été observée par Zohra et al. en 2014 en Algérie lors d'une étude sur les gastro-entérites aiguës du nourrisson où ils rapportèrent 61% des patients âgés de moins de 12 mois avec une prédominance masculine (19).

Tableau V : Répartition des souches d'Escherichia coli selon la détection des gènes des facteurs de pathogénicité et de résistance aux antibiotiques

Antigène O / Gènes (n=37)	Nombre de cas détectés	Absence de détection
Antigène O (Agglutination)		
Nonavalent	8	29
Trivalent I	1	36
Trivalent II	6	31
Trivalent III	1	36
Trivalent IV	1	36
Gènes des adhésines		
<i>Eagg</i>	4	33
<i>Bfp</i>	7	30
<i>eae</i>	7	30
<i>ipaH</i>	6	31
Gènes des entérotoxines		
<i>lt</i>	2	35
<i>slt1</i>	11	26
<i>slt2</i>	0	37
<i>Sta</i>	16	21
Gène de résistance aux antibiotiques		
<i>Shv</i>	08	29
<i>Oxa</i>	08	29
<i>Tem</i>	15	22
<i>qnrA</i>	03	34
<i>qnrB</i>	04	33
<i>qnrS</i>	11	26
<i>catA</i>	05	32
<i>tet</i>	25	12
<i>Int1</i>	14	23
<i>Int2</i>	05	32
<i>Int3</i>	13	24

Les sérotypes contenus dans trivalents : Trivalent I (O111, O55, O26), Trivalent II (O86, O119, O127), Trivalent III (O125, O126, O128), Trivalent IV (O114, O124, O142).

Une fréquence légèrement plus élevée chez les enfants de sexe féminin a été trouvée en 2012 en Iran avec 51,38% des cas. Cependant, la tranche de moins de 12 mois restait majoritaire (20).

Le taux d'isolement de 30,8% trouvé dans notre étude reste plus faible, comparé à celui retrouvé en Iran (44,62%) (19, 20). Le taux élevé de négativité peut s'expliquer par la prise d'antibiotiques chez 24,2% de nos patients mais également par d'autres causes microbiennes de diarrhées.

Plusieurs gènes codant pour les facteurs de pathogénicité ont été détectés comparativement aux tests d'agglutination utilisés qui n'ont révélé que six souches (16,2%) positives au sérum du trivalent II (O86, O119, O127), et une seule souche respectivement pour les trivalents I, III et IV, probablement du fait de la sensibilité de la technique d'agglutination. Cependant, Shamki et al. ont majoritairement trouvé les sérotypes du trivalent I (O111 et O55) et n'ont rapporté que 3 cas de O86 (inclus dans le trivalent II) parmi les 28 souches d'E. coli entéropathogènes isolées. Il s'agit probablement d'une répartition des sérotypes circulant différents selon les régions du globe (20). La recherche moléculaire confirme la présence de gènes codant pour plusieurs facteurs de pathogénicité dont la plupart était des toxines. Sur les 37 isolats testés, seize (42,1%) possédaient le gène *sta*

codant pour une toxine cytotoxique. Onze souches (28,9%) ont été positives au gène *stx1* pour les souches entérohémorragiques mais seules 1,7% des selles présentaient des traces de sang. Le gène *stx* était porté par seulement deux isolats (5,3%). Nous constatons que les gènes des facteurs d'adhésion et d'invasion ont été peu détectés par rapport à ceux de la production de toxine. Le gène *eae* codant la protéine d'attachement et d'effacement aux microvillosités intestinales, a été détecté sept fois (18,4%), ainsi que le gène codant le faisceau de formation des pili *bfp*. Toutefois, la détection des gènes des facteurs de pathogénicité expliquerait clairement les 45% des selles glaireuses observées et les 41,7% des cas de vomissements associés à diarrhée chez les enfants.

Quant à la résistance aux antibiotiques, un taux élevé de résistance des *E. coli* à l'amoxicilline a été trouvé (86,4%). Le même constat a été fait dans plusieurs études notamment en Algérie avec 59,04% (19), au Sénégal avec 73,1% (21) et au Maroc avec 76% (22). La résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique était de 59,5%, ce qui est une preuve de résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases retrouvée dans des proportions proches au Maroc avec 57% (22) et plus élevées à Dakar avec 67,5% (21). Le taux élevé de résistance à l'association serait dû à une forte circulation de souches productrices de BLSE. L'augmentation de souches productrices de BLSE dans les infections communautaires est inquiétante. A Bamako, le taux des souches de *E. coli* productrices de BLSE en milieu communautaire avait une tendance à l'augmentation avec 12% en 2004, 15,4% en 2005 et 19,3% en 2006 (23). La recherche des gènes de résistance a donc confirmé la circulation de telle souches à Bamako. Les gènes de résistance aux bêta-lactamines retrouvés étaient *blaSHV* porté par 8 isolats, *blaTEM* détecté dans quinze isolats parmi les 37 souches testées. Une étude réalisée par Koita et al. a montré que parmi les gènes de résistance aux aminopénicillines recherchés chez *E. coli* uropathogène à Bamako, le gène *blaTEM1* a été majoritairement retrouvé 72%, suivi des gènes *blaOXA1* 52% et *blaSHV1* 38% (24), prouvant ainsi une forte circulation des *E. coli* porteur de diverses gènes de résistance depuis plusieurs années déjà. La résistance phénotypique à la tétracycline était de 94,8% et 25 des 37 souches (soit 65,8%) portaient le gène *tetA* de résistance à la tétracycline. Celle à l'association sulfaméthoxazole triméthoprime (cotrimoxazole) était de 89,5%. Le cotrimoxazole et la tétracycline sont des antibiotiques largement prescrits dans les cas de gastroentérite mais on constate une forte résistance comme dans les autres pays notamment 87% au Sénégal en 2013 (25). De même, un taux élevé de résistance des souches d'*E. coli* uropathogènes vis à vis du cotrimoxazole retrouvé à Dakar variant de 67,8% à 97% (25). Cette similarité prouve une fois de plus, que quelle que soit l'origine des souches *E. coli* (urine ou selles, adulte ou enfant), le niveau de résistance demeure élevé vis-à-vis des antibiotiques les plus utilisés du fait très probablement de la consommation élevée et de la pression de sélection. Les quinolones constituent également une famille d'antibiotiques représentant 10,3%

des prescriptions en milieu hospitalier en 2014 et 39,8% d'entre elles provenaient des services de pédiatrie (26). En 2021, les fluoroquinolones étaient une des familles d'antibiotiques les plus prescrites en antibiothérapie probabiliste en milieu hospitalier (27) au Mali. Nous observons dans notre étude que dix-huit isolats (18/37 soit 48,6%) ont présenté des mutations sur les gènes *qnrA* (3 cas), *B* (4 cas) et *S* (11 cas) conférant une résistance aux quinolones. Koita et al. ont trouvé 92% de gènes *Qnr* nettement plus élevé que dans notre étude. Cependant, la fréquence élevée de *QnrS* reste similaire au notre malgré la provenance urinaire de leur échantillons (24).

Nos souches *E. coli* productrices de BLSE ont révélé la présence de gènes *blaCTX* (73,3%), *blaSHV* (66,7%), *blaTEM* (100%) et nous avons constaté un fort taux de résistance croisée à la famille des quinolones avec les gènes *qnrA* (100%), *qnrB* (93,3%) et *qnrS* (60%) détectés ainsi que la famille des cyclines avec le gène *tetA* (66,7%) détecté. L'association *Qnr*-BLSE a été retrouvée chez 67% des souches urinaires préalablement au Mali et demeure élevée (24). Elle a également été retrouvée mais à des taux nettement plus faibles en Côte d'Ivoire à 31% (28) et au Maroc à 18,7% (29). Cette association plus fréquente au Mali serait probablement une propagation clonale au sein de la communauté à partir de support mobile. La présence d'intégrons pourrait confirmer cette hypothèse. Les intégrons constituent un système de capture, d'expression et de dissémination de gènes sous forme de cassettes. Ils sont impliqués dans la dissémination de la multi résistance des bactéries aux antibiotiques. Nous avons détecté quatorze isolats portant des intégrons de classe 1 (37,8%) et treize portant l'intégron de classe 3 (35,1%). Koita et al. a montré la présence des intégrons de classe 1 chez 31% des souches mais n'a trouvé aucun intégron de classe 3 (24). Une probable augmentation des capacités de résistance de nos souches due à une acquisition de nouveaux gènes de résistance a eu lieu dans le temps. Toutefois, il a été décrit que chez les entérobactéries, les intégrons de classe 1 étaient les plus retrouvés, expliquant leur fréquence élevée (30). Une sensibilité conservée au chloramphénicol 94,7%, à l'imipénème 89,5% et à la céfotaxime 78,9% a été observée. Ces résultats confirment la bonne efficacité de l'imipénème sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE a été rapportée dans d'autres études au Bénin (31), en Tunisie, au Mali en 2010, au Sénégal en 2013. Il faut noter que l'imipénème devrait demeurer en prescription de dernier recours et en milieu hospitalier.

E. coli est un commensal des animaux à sang chaud et peut être retrouvé sous forme pathogène entre autres dans les élevages avicoles, ovins et bovins. Hammoudi et al. ont rapporté des sérotypes O1, O2 et O78 d'*E. coli* associé à une pathogénicité résiduelle et une létalité dans les élevages avicoles (32). Ces sérotypes non communément isolés en santé humaine n'étaient pas recherchés dans notre étude. Des souches d'entérobactéries isolées lors d'une étude chez les bovins dans le district d'Abidjan ont montré des taux de résistance variant de 58,8% à 97,6% non seulement aux antibiotiques couramment utilisés chez les humains tels que les

triméthoprimes/sulfaméthoxazoles, les cyclines et les β-lactamines, mais aussi aux antibiotiques critiques d'usage réservé chez les humains telle que la colistine (33). La même étude révèle que les antibiotiques comme les aminosides, les phénicolés et fluoroquinolones avaient une sensibilité relativement conservée chez les bovins. Ces résultats montrent que des risques de transmission à l'homme des sérotypes animaux, et des bactéries déjà résistantes aux antibiotiques existent surtout à travers le transfert des supports génétiques mobiles. Cela constitue une cause de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées chez les humains en plus de l'usage abusif et des prescriptions irrationnelles.

CONCLUSION

Escherichia coli demeure une bactérie fréquemment isolée chez les enfants diarrhéiques de moins de 5 ans (30,83%) en milieu communautaire à Bamako avec 42,1% de souches productrices de de toxine cytotoxique (sta) et 28,9% de souches productrice de toxine entéro-hémorragique (slt1). Une forte résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones était associée à la présence des gènes *blaCTX*, *blaSHV*, *blaTEM* et *qnrS*. Une surveillance moléculaire renforcée et multisectorielle doit être mise en place afin de mieux apprécier la circulation des marqueurs épidémiologiques chez les enfants et dans la population générale.

Remerciements

Nous remercions le réseau REMENTA pour soutien apporté et les formations régionales organisées dans le cadre de la surveillance des maladies entériques en Afrique de l'Ouest. Nous rendons hommage au Feu Professeur Amy Gassama Sow pour son initiative de mise en place du réseau, et remercions Seydou Diarra de l'INSP de Bamako, actuellement à la retraite. Nous remercions les responsables et acteurs des centres de santé communautaires ayant participé à l'étude.

RÉFÉRENCES

- Diawara F, Coulibaly D, Diarra S, Simaga T. Facteurs favorisant les maladies diarrhéiques chez les enfants de 0 à 5 ans en commune II du district de Bamako au Mali. *Mali Santé Publique*. 2018;8(1):25-30.
- Organization WH. International Decade for Action Water for Life, 2005-2015. *Wkly Epidemiol Rec*. 2005;80(22):195-200.
- Carré D. Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. *Étiologies. EMC-chirurgie*. 2004;1(5):493-532.
- Le Bouguéneq C. Diagnostic des différents pathovars de *Escherichia coli* responsables de diarrhées chez l'homme. *Rev Fr Lab*. 1999;314:33-7.
- Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Bingen E. Diagnostic bactériologique des infections Gastro-Intestinales. *Bactériologie Médicale*. 2016:149-161.
- Sara A, Yousra M. Mise en point des méthodes de détection d'*Escherichia coli* productrice de Shiga-toxine [Mémoire de Master]: Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy; 2021.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983;308(12):681-5.
- Brugère H, Auvray F, Mariani-Kurkdjian P, King LA, Loukiadis E, de Maisons-Alfort F. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Feuill Biol*. 2013;54(311):79-86.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015;22(1):90-101.
- Doumbia AK, Coulibaly O, Dembélé A, Diall H, Togo P, Cissé ME, et al. Déshydratation Aiguë chez les Enfants de 1 à 35 Mois Atteints de Diarrhée Aiguë au CHU Gabriel Touré. *Health Sci. Dis*. 2020;21(11) 83-87.
- EDSM V. Cellule de planification et de statistique (CPS/SSDSPF). Institut national de la statistique (INSTAT/MPATP), INFO-STAT et ICF international Enquete démographique et de santé au Mali (EDSM V). Edition de 2012;2013.
- Rocha MCGSd, Carminate DLG, Tibiriçá SHC, Carvalho IPd, Silva MLdR, Chebli JMF. Acute diarrhea in hospitalized children of the municipality of Juiz de Fora, MG, Brazil: prevalence and risk factors associated with disease severity. *Arq Gastroenterol*. 2012;49:259-65.
- Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The lancet*. 2012;379(9832):2151-61.
- Pishtiwan AH, Khadija KM. Prevalence of *blaTEM*, *blaSHV*, and *blaCTX-M* Genes among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1):e2019041-e.
- Pogue JM, Dudley MN, Eranki A, Kaye KS. 146 - Tetracyclines and Chloramphenicol. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*: Elsevier; 2017. p. 1256-60.
- Sapunaric FM, Levy SB. Substitutions in the interdomain loop of the Tn10 TetA efflux transporter alter tetracycline resistance and substrate specificity. *Microbiology*. 2005;151(7):2315-22.
- Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(4):a025387.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Suppl2):S120-S6.
- Haffaf Amel FZ. Gastro-entérite aigue du nourrisson [These de Medecine]: Université Abou Bekr Belkaid -Tlemcen 2014.
- Shamki JA, Al-Charrakh AH, Al-Khafaji JK. Detection of ESBLs in Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolates associated with infantile diarrhea in Kut City. *Med J Babylon*. 2012;9(2):403-12.
- Sire J-M, Nabeth P, Perrier-Gros-Claude J-D, Bahsoun I, Siby T, Macondo EA, et al. Antimicrobial resistance in outpatient *Escherichia coli* urinary isolates in Dakar, Senegal. *J Infect Dev Ctries*. 2007;1(03):263-8.
- Bourjilat F, Dersi N, Bouchrif B, Amarouch H, Timinouni M. Profil de résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* uropathogènes communautaires au Maroc. *Eur J Sci Res*. 2009;38(1):57-62.
- Saye T. Prévalence des entérobactéries productrices de beta-lactamases à spectre élargi au CHU du Point G de 2006 à 2008. [These de Médecine] : Université de Bamako. 2012.
- KOÏTA MS. Aspects moléculaires de la résistance aux antibiotiques des souches de *Escherichia coli* uropathogènes communautaires à Bamako [[Mémoire]: Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 2013.
- Dromigny JA, Nabeth P, Juergens-Behr A, Perrier-Gros-Claude JD. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):236-9.

26. Coulibaly Y, Konate A, Kone D, Bougoudogo F. Étude de la prescription des antibiotiques en milieu hospitalier malien. *Rev Mali Infect Microbiol.* 2014;3:2-8.
27. Traore D, Daou F, Coulibaly D, Sy D. Analyse de la prescription des antibiotiques au CHU du point G. *Rev Int Sc Méd Abj - RISM.* 2021;23(2):123-27.
28. Guessennd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou-Ndouba A, Ekaza E, Lambert T, et al. Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast. *Pathol biol.* 2008;56(7-8):439-46.
29. Meradi L, Djahoudi A, Abdi A, Bouchakour M, Claude J-DPG, Timinouni M. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathol Biol.* 2011;59(4):e73-e8.
30. Ploy M-C, Gassama A, Chainier D, Denis F. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 2005;20(6):343-52.
31. Ahoyo A, Baba-Moussa L, Anago A, Avogbe P, Missihoun T, Loko F, et al. Incidence of infections dues to Escherichia coli strains producing extended spectrum betalactamase, in the Zou/Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin. *Med Mal Infect.* 2007;37(11):746-52.
32. Hammoudi A, Mouats A, Halbouche M. Sérotypes, antibiorésistance et identification de gènes de virulence des Escherichia coli pathogènes dans les élevages avicoles en Algérie. *Actes des 1ères JE-RGAL, Mostaganem.* 2009: :40-47.
33. Yao RK, Coulibaly JK, Tiekoura BK, Yapi FH, Djaman JA. Molecular Characterisation of Extended-Spectrum Beta-lactamase Producing Escherichia coli Isolated from Cattle Faeces in Abidjan District, Ivory Coast. *Microbiol Res J Int.* 2018;25(5):1-10.