

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Liste des tableaux

Introduction	1
➤ Objectif de stage	2
➤ Structure d'accueil.....	3
Revue bibliographiques :.....	4
I/ Généralités sur les entérobactéries.....	4
a) Définition des entérobactéries	4
b) Classification des entérobactéries.....	4
c) Habitat et pouvoir pathogène.....	4
II / Historique des beta-lactamases à spectre étendu	5
a) Définition des beta-lactamases	5
b) Historique de beta-lactamases à spectre étendu.....	5
c) Classification de beta-lactamases à spectre étendu.....	6
d) Différents type de beta-lactamases à spectre étendu	8
III/ épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE.....	11
a) Réservoir de beta-lactamases à spectre étendu.....	12
b) Transmission de beta-lactamases à spectre étendu.....	13
c) Dissémination de beta-lactamases à spectre étendu.....	14
d) Prévalence de beta-lactamases à spectre étendu	14
e) Facteurs de risque d'acquisition d'une entérobactérie BLSE	15
f) Durée de portage	17
Matériel et méthodes.....	18
I/ lieu de prélèvement	18
II/ prélèvement.....	18
III/ technique de prélèvement.....	18
IV/ Ensemencements sur des milieux spécifiques	19
1. Milieu EMB.....	19
2. Milieu TSA.....	19

V/ Tests d'identifications biochimiques.....	19
A. Milieu hajna-kligler.....	19
B. Milieu citrate de simmons	21
C. Test d'oxydase	21
D. Milieu urée indole	22
VI/ Détection phénotypiques de beta-lactamase à spectre étendu	22
1) L'antibiogramme	23
VII/ Confirmation moléculaire des beta-lactamases à spectre étendu par PCR.....	25
a) Diagnostic des BLSE par PCR.....	25
b) Extraction d'ADN.....	25
c) Caractérisation des gènes codant aux beta-lactamases	25
d) Préparation de gel	27
e) Electrophorèse	27
f) Révélation	27
Résultats et discussion.....	28
I/ Fréquence de EBLSE.....	28
II/ Résultat de la détection phénotypiques	29
1) Interprétation	29
2) Taux de résistance par rapports aux antibiotiques testés	30
III/ Résultat de la recherche de gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de béta-lactamases isolées à partir des prélèvements réalisés	30
Discussion	33
Conclusion	34
Annexes	
Références bibliographique	

Liste Des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMC : Amoxicilline + Ac.clavulanique

ATB : antibiotiques

BBT : Bleu de bromothymol

BHI : Brain Heart Infusion

BLSE : Beta-lactamases a spectre étendu

BMR : Bactéries multi résistance

C3G : *Céphalosporine de 3 ème génération*

CAZ : Ceftazidime

CIP : Ciprofloxacine

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CS : Citrate de simmons

CTX-M : *Céfotaximase –Munich*

EBLSE: Entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu

E. coli : Escherichia coli

EDTA : *Acide éthylène diamine tétra acétique*

EMB : Eosine Bleu de Méthylène

EPC : entérobactéries productrices de carbapénèmases

ETP : Ertapénème

FIG : Figure

FOS : Fosfomycine

FOX : *Céfoxitine*

K. pneumoniae : Klebsiella pneumoniae

MH : Mueller-Hinton

MIN : Minute

NA: Acide nalidixique

Ofx : Ofloxacine

OXA : Oxacillinases

PCR : Polymerase chain reaction

PER : Pseudomonas extended resistance

SFO : Serratia fonticola

SHV : Sulphydryl variable

SPP : Species plural

SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)

TBE : Tris, Borate, EDTA.

TEM : Temoneira - nom du patient

TLA : Tlahuicas - tribu indienne

TSA : Trypto-caséine soja

Zn²⁺ : Ion zinc

UV : Ultra violet

Liste des figures

Figure 1 : Schéma réactionnel de l'ouverture de cycle beta-lactamases.....	5
Figure 2 : Phylogramme des Beta-lactamases appartenant a la classe A ; beta-lactamases de bactéries a Gram-positive (en bleu) ; BLSE transférables (en rouge) ; BLSE chromosomiques (en vert).....	9
Figure 3 : Prévalence des d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi dans le monde en 2013.....	12
Figure 4 : Distribution mondiale de CTX-M.....	15
Figure 5 : Schéma illustre de la méthode d'écouvillonnage.....	18
Figure 6 : Schéma illustre la technique d'ensemencement	20
Figure 7 : Résultat de l'incubation du milieu de Kligler-Hajna.....	21
Figure 8 : Résultat de l'incubation de milieu citrate de simmons	21
Figure 9 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie	25
Figure 10 : Electrophorèse sur gel d'agarose.....	27
Figure 11 : Répartition de l'ensemble des entérobactéries productrices de BLSE.....	28
Figure 12 : Photo montrant résultat d'un test de synergie.....	29
Figure 13 : Pourcentage de résistance des entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés.....	30
Figure 14 : Répartition des gènes <i>bla</i> chez les EBLSE isolées au niveau des prélèvements rectaux réalisés chez les nouveau-nés.....	31
Figure 15 : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène <i>blaCTXM1</i>	31
Figure 16 : Image d'électrophorèse de la PCR de gène <i>SHV</i>	32
Figure 17 : Image d'électrophorèse de la PCR de gène <i>TEM</i>	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Phylogramme des quartes classes de beta-lactamases.....	7
Tableau 2 : Classification selon Bush-Jacoby-Medeiros.....	8
Tableau 3 : Tableau illustrant un protocole type de réaction PCR.....	26
Tableau 4 : Séquençages des amorces utilisées lors de la réalisation de la PCR.....	26
Tableau 5 : Condition d'amplification pour chaque gène	26

Introduction Générale

L'émergence des bactéries multi résistantes (BMR) est un enjeu majeur de la santé publique au niveau mondial. Parmi ces bactéries, les plus fréquemment rencontrées actuellement, sont les entérobactéries.

Les entérobactéries constituent la cause la plus fréquente d'infections communautaires et nosocomiales. Généralement traitées par les bêta-lactamines au cours de ces dernières décennies, une émergence d'une résistance importante des entérobactéries vis-à-vis de ces antibiotiques a été constatée.

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) constituent une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes qui inactivent la plupart des bêta-lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes [1], elles sont inhibées par l'acide clavulanique *in vitro* et sont le plus souvent d'origine plasmidique, ce qui explique leur rapidité de diffusion et d'évolution.

De nombreuses BLSE naturelles ont été décrites, elles sont classées en 11 familles dont 4 d'entre elles sont majeures et représentées par les enzymes de type *TEM*, *SHV*, *CTX-M* et *OXA*.

Au début, dès 1985, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de *TEM* et de *SHV* après évolution de ces enzymes dites «anciennes» par mutations ponctuelles, ce sont des pénicillinases «mutées».

Ces dernières années, les «nouvelles» BLSE, notamment les *CTX-M*, ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial.

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont retrouvées essentiellement dans la famille des Entérobactéries, principalement *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *l'enterobacter* et plus rarement, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ou des bactéries Gram négatifs non fermentatives comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et d'autres.

Au laboratoire, les moyens de détection des souches productrices de BLSE sont à la fois phénotypiques et génotypiques.

- la détection phénotypique évalue la capacité de l'enzyme à hydrolyser certaines céphalosporines et la capacité de l'acide clavulanique à contrecarrer cette hydrolyse
- la méthode génotypique est basée sur l'amplification génomique par PCR des gènes responsables de la production des BLSE. Il s'agit d'une confirmation moléculaire.

- **L'Objectif général** de cette étude consiste en une mise au point sur les connaissances récentes des entérobactéries productrices de BLSE.

Présentation du lieu de stage

Mon stage de fin d'études a été réalisé au sein de l'un des 8 laboratoires les plus réputés de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès qui est le laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire.

- Il se compose de deux laboratoires : un laboratoire de microbiologie et un laboratoire de biologie moléculaire

Revue Bibliographique

I. GENERALITES SUR LES ENTEROBACTERIES

a) Définition des entérobactéries

La famille des *Entérobactériaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs [2]

Ce sont des bacilles à Gram négatifs dont les dimensions varient de 1 à 6 µm de long sur 0,3 à 1 µm de large. Elles peuvent être mobiles par ciliature péritriche ou immobiles et se développent en aéro-anaérobiose et sur milieu nutritifs. Elles acidifient le glucose par voie fermentaire avec souvent production de gaz, ne possèdent pas d'oxydase et réduisent les nitrates en nitrites.

b) Classification des entérobactéries

Une centaine d'espèces *d'Entérobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en cliniques [3]

Les Entérobactéries qui intéressent la bactériologie médicale peuvent être regroupées en 4 tribus :

- La tribu des *Escherichiae*
- La tribu des *Klebsiellae*
- La tribu des *Proteae*
- La tribu des *Yersiniae*

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 

c) Habitat et pouvoir pathogène

Les bactéries de la famille des *Entérobactériaceae* représentent la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobiose. Chez l'homme, l'entérobactérie prédominante est *Escherichia coli*. Parmi les nombreuses espèces d'entérobactéries ; certaines se trouvent dans l'environnement, d'autres chez les végétaux, et peuvent avoir un pouvoir phytopathogène.

Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certains sont constamment pathogènes (*shigella*). D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes, responsables d'infections chez les malades fragilisés (*klebsiella*).

II. : HISTORIQUE DES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU

a) Définition de beta-lactamases

Les β -lactamases ont été identifiées en 1940 par Abraham et Chain, qui avaient mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (Abraham et Chain. 1940) [4]

Les β -lactamases sont des enzymes hydrolysant les β -lactamines en ouvrant le cycle bêta lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle (Fig.1), provoquant ainsi l'inactivation de l'antibiotique en question (Ambler. 1980) [5]. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram- négatifs (Medeiros. 1984). [6] La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli. 2007)[7], et est également un facteur de diffusion.

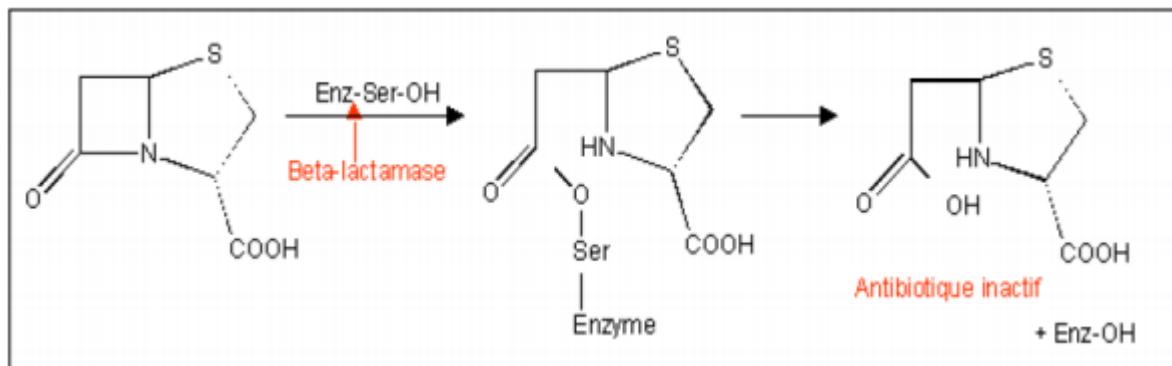


Figure 1 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame

b) Historique de beta-lactamases à spectre étendu

La première bêta-lactamase appelée « pénicillinase » a été décrite dans les années 1940 peu après la commercialisation de la Pénicilline G [8]

* Au cours des années 1960, ont été décrites de nouvelles pénicillinases nommées *TEM* et *SHV*. Ces dernières hydrolysaient les pénicillines. La première souche d'*E .Coli* productrice de pénicillinase a été mise en évidence en 1963 à Londres [9].

Par la suite, on observe l'émergence de bêta-lactamases de céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), **ce sont les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)**:

* En 1983, une première description a été réalisée chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne principalement chez les patients hospitalisés (type *SHV*) [10].

* En 1984, la première BLSE décrite en France impliquait *Klebsiella pneumoniae* [11].

* Dans les années suivantes, l'apparition des BLSE a été notée chez toutes les autres espèces d'entérobactéries, ceci étant en rapport avec l'utilisation importante des C3G et la

nature plasmidique des BLSE leur confèrent une transmission d'espèce en espèce [12].

* Ces «anciennes BLSE» sont des pénicillinases «mutées» dérivant de pénicillinases de type *TEM* ou *SHV*

* Au cours des années 1990, de «nouvelles BLSE», isolées en milieu communautaire ont été décrites, les enzymes concernées sont de type céfotaximase -Muenchen (*CTX-M*) et qui conférait à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) céf épime et aztréonam qu'à la ceftazidime [13]. En effet après les hôpitaux les BLSE gagnent le milieu communautaire :
-En 1992, les premières souches de deux hôpitaux de Buenos Aires en Argentine ont été décrites [14]. Elles sont originaires de *S.Thyphirium* et ont été révélées chez les patients admis pour des tableaux de septicémies, d'entérites ou de méningites

-En 1996, la première description de BLSE communautaires en Europe, en Pologne (*E. coli* et *C. freundii* producteurs de *CTX-M* a été réalisée [15].

c) Classification de bêta-lactamases à spectre étendu

Les bêta-lactamases à spectre élargi sont diverses enzymes bactériennes, qui hydrolysent le noyau bêta-lactame des bêta-lactamines. Deux types sont mis en évidence :

- **1- les sérine-bêta-lactamases**, ayant un site actif à sérine pour hydrolyser le cycle bêta-lactame.
- **2- les métallo-bêta-lactamases**, nécessitant des ions Zn^{2+} pour leur activité.

Diverses classifications sont données selon les caractéristiques suivantes :

- Les caractéristiques physiques
- Le phénotype : pénicillinases, céphalosporinases.....
- La nature du site actif et la séquences d'acides aminés
- L'origine (plasmidique ou chromosomal) et situation constitutive ou inducible.

De nos jours, une classification moléculaire de bêta-lactamases, impliquant la connaissance de la nature primaire des bêta-lactamases a été proposé par **Ambler** [16]. Une classification plus fonctionnelle a été proposé par **Bush- Jacobi-Medeiros** [17] dans laquelle les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des bêta-lactamases (substrat, profil d'inhibition ...) et divisent les enzymes en quatre groupes avec plusieurs sous-groupes.

i. Selon Ambler

La classification moléculaire d'Ambler [16] a été proposée en 1980 est basée sur des critères phylogénétiques. Ainsi, ont été décrites une classe de sérine-enzymes (classe A) et une classe de métallo-enzymes (Classe B). La classe C de céphalosporinases (sérine-enzymes) et

la classe D, regroupant les « oxacillinases » ont été identifiées plus tard et sont dissociées des autres classes de sérine-enzymes. Cette classification, tient compte des analogies de séquences peptidiques, particulièrement celles du site enzymatique (**Tab.1**)

Tableau 1 : Phylogramme des 4 classes des bêta-lactamases

Table I Ambler classification of β -lactamases with examples

Class	Active site	Enzyme type	Common organisms	Examples
A	Serine	Narrow spectrum	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Staphylococcal penicillinase, TEM-I, TEM-2, SHV-I
A	Serine	Extended spectrum	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SHV-derived, CTX-M, PER-I, VEB-I
A	Serine	Carbapenemases	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-derived, IMI-I
B	Zinc	Metallo- β -lactamases (carbapenemases)	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-I, VIM-I, NDM-I
C	Serine	Cephalosporinases	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i>	AmpC, P99, ACT-I, CMY-2, MIR-I, FOX-I
D	Serine	OXA-type enzymes (ESBLs, carbapenemases)	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	OXA-derived

Notes: Data from Toussaint and Gallagher;¹⁰ Bush and Jacoby;¹¹ Liscio et al.;¹² and Kaye and Pogue.¹⁶

Abbreviation: ESBL, extended-spectrum β -lactamase.

ii. Selon Bush-Jacobi-Medeiros

La classification selon Bsuuh-Jacoby-Medeiros [17], est plus fonctionnelle et reflète mieux le spectre exact des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition. Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale :

1- Le groupe 1 correspond à des céphalosporinases chromosomiques peu inhibé par l'acide clavulanique.

2- Le groupe 2 est composé de pénicillinases, céphalosporinases, oxacillinases et carbapénèmases chromosomiques ou codées par des plasmides et en général inhibées par l'acide clavulanique. Ce groupe est subdivisé en 8 sous-groupes. En 1995, en raison de l'augmentation de nombre de dérivés de beta-lactamases *TEM* et *SHV*, la classification initiale a été remise à jour et a classé ces dérivés dans différents groupes possédant le préfixe « 2b » :

Les groupes 2be (beta-lactamases à spectre étendu), **2br** (beta-lactamases dérivant du groupe 2b avec une affinité réduite pour l'acide clavulanique) et **le groupe 2f** (carbapénèmases inhibés par l'acide clavulanique et possédant un site actif à sérine).

3- Le groupe 3 correspond à des métallo-enzymes, en général retrouves chez les *Pseudomonas spp.*, *Bacteroides spp.* et *Serratia marcescens*, peu inhibés par l'acide clavulanique mais inhibés par EDTA in vitro.

4- Enfin un quatrième groupe qui contient des enzymes diverses non entièrement séquencés et non inhibés par l'acide clavulanique (**Tab.2**)

Tableau 2 : Classification selon Bush-Jacoby-Medeiros

MODIFIED BUSH–JACOBY–MEDEIROS CLASSIFICATION OF B–LACTAMASES				
Functional Group	Substrate profile	Molecular Class	Inhibitor	Example
1	Cephalosporinase	C	Oxa	AmpC, MIR-1
2a	Penicillinase	A	Clav.	<i>S.aureus</i>
2b	Broad spectrum	A	Clav.	TEM-1/2, SHV-1
2be	Extended spectrum	A	Clav.	TEM 3-29, TEM46-104 SHV2-28, CTX-M types
2br	Inhibition resistant	A	-	TEM 30-41 (IRT1-12)
2c	Carbenicillinase	A	Clav.	PSE-1
2d	Oxacillinase	D	(Clav.)	OXA-1 (OXA-2 &-10 derived ESBL)
2e	Cephalosporinase	A	Clav.	FPM-1 <i>P. vulgaris</i> , CepA <i>B. fragilis</i> .
2f	Carbapenemase	A	Clav.	IMI-1, NmcA, Sme 1-3
3	Metallo-enzyme	B	-	<i>S.malophilia</i>
4	DR.T.V.RAO, MD Penicillinase	-	-	<i>B.copacia</i>

d) Différents types de bêta-lactamases à spèctre étendu

En se basant sur les classifications structurales d'Ambler ou fonctionnelles de Bush, différentes classes d'enzymes (**Fig.2**) ont été mises en évidence, selon le type de bêta-lactamines principalement touchées et selon les substances qui inhibent les enzymes concernées. A l'exception des BLSE de type OXA (classe D), les BLSE sont des β-lactamases de classe A (comme TEM1/2 et SHV-1), et selon la classification de Bush-Jacoby-Medeiros, les BLSE font aussi partie du groupe 2be

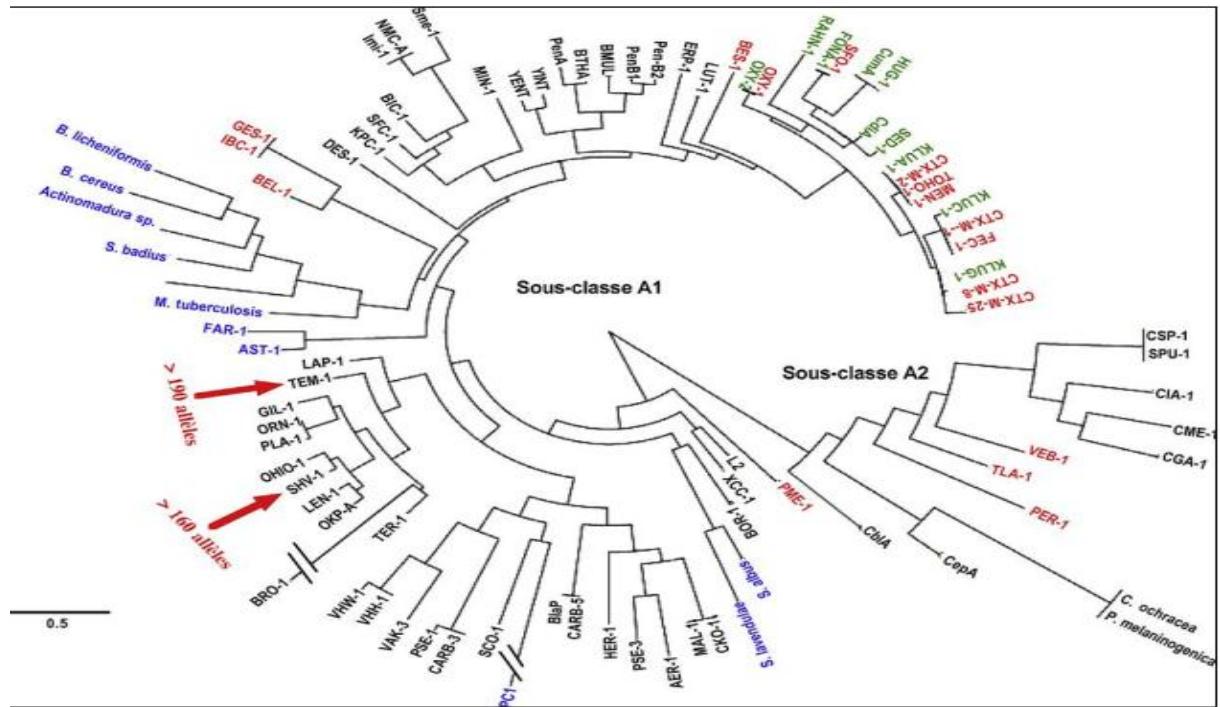


Figure 2 : Phylogramme des Beta-lactamases appartenant à la classe A ; beta-lactamases de bactéries à Gram-positive (en bleu) ; BLSE transférables (en rouge) ; BLSE chromosomiques (en vert)

-Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées étaient des dérivés de TEM-1/2 et de SHV-1 après évolution de ces enzymes «anciennes» par mutations ponctuelles [18].

-Les souches productrices de BLSE étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment en unités de soins intensifs. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli* [19].

-A partir de 1995, de « nouvelles » BLSE ont émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des souches *d'E. Coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsables d'infections communautaires, notamment urinaires[20]

-Les autres BLSE restent plus rares et sont principalement détectées chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* [21]

i. Anciennes BLSE

❖ BLSE DE TYPE TEM

La première BLSE de type *TEM* (*TEM-3*) a été découverte en 1989 .Depuis, plus de 100 dérivés de *TEM* ont vu le jour, ils ont émergé par substitution d'un ou plusieurs acides aminées à partir de *TEM-1*[22]. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type *TEM* ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa*. [22]

❖ BLSE DE TYPE SHV

La majorité des dérivés de *SHV-1* ont un phénotype de BLSE, avec *SHV-5* et *SHV-12* et sont les mutants les plus fréquents [23]. Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries notamment *K.pneumoniae*, chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* [22]. Comme les dérivés de *TEM*, les mutations dans *SHV-1* ont lieu classiquement au niveau de quelques positions [18]

ii. Nouvelles BLSE

❖ BLSE DE TYPE CTX-M

Ces enzymes «émergentes» pourraient représenter très prochainement les BLSE les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial, après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 [22]. Elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases [13]. En effet, les bactéries productrices de *CTX-M* sont résistantes au céfotaxime et plus ou moins sensibles à la ceftazidime tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables

A ce jour, de nombreux variants de *CTX-M* ont été décrits et sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : *CTX-M-1*, *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, *CTX-M-9*, *CTX-M-25* et *CTX-M-45*. Les progéniteurs des *CTX-M* ont été identifiés sur le chromosome de *Kluyvera spp* qui sont des entérobactéries non pathogènes environnementales [13]. Les souches productrices de *CTX-M* ont été initialement rapportées de façon sporadique. Dans le début des années 90, une diffusion massive des souches productrices de *CTX-M* (*S. enterica*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Shigella Serratia marcescens*, *E. aerogenes*) a été décrite, suivie de la diffusion mondiale des BLSE de type *CTX-M* chez les entérobactéries qui a explosé de façon extrêmement rapide, d'où le terme de «pandémie *CTX-M*» [24].

❖ BLSE DE TYPE OXA

Bien que les BLSE appartiennent souvent à la classe A, plusieurs oxacillinasées (classe D et classe 2d) ont des propriétés de BLSE. Les bêta-lactamases de type *OXA* confèrent la résistance à l'ampicilline et à la céfalotine, et sont caractérisées par une forte activité

hydrolytique des pénicillines M [22]. De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique.

Les bêta-lactamases de type *OXA* représentent une famille phylogénétiquement très hétérogène et les BLSE de type *OXA* dérivent de *OXA-10*, de *OXA-13*, de *OXA-2* ou sont non reliées (*OXA-18, -45*) [25]

III. : EPIDIMIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE BLSE

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont retrouvées essentiellement dans la famille des entérobactéries, principalement *Escherichia coli* et *Klebsiella*, plus rarement *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ou des bactéries Gram négatifs non fermentatives comme *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et d'autres [1]. Depuis la première découverte de bactéries productrices de BLSE, on observe une augmentation du nombre de patients colonisés et du nombre d'infections à ces germes, ainsi qu'une très grande hétérogénéité de ces enzymes avec une nomenclature complexe. Les BLSE type TEM et SHV ont été décrites en premier dans le milieu hospitalier, en particulier chez *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries [1]

Indépendamment, en milieu communautaire, ce sont les BLSE type *CTX* qui sont apparues dans *E. coli*, liées à des infections urinaires.

Au cours des dernières années, une circulation des souches entre les milieux hospitalier et communautaire a été observée. Il est clairement établi que le développement et la propagation de BLSE sont liés à l'utilisation des bêta-lactamines, dont la colonisation du tube digestif joue un rôle important [1]

Les données présentées sur la **Figure 3** sont issues des réseaux internationaux de surveillance collectant des souches de bactéries provenant de prélèvements à visée diagnostique [8]

Ces réseaux ne donnent pas une cartographie exacte de la prévalence dans les différentes régions du monde, mais ont le mérite d'en donner un aperçu à grande échelle. Ces données montrent une répartition non homogène des entérobactéries BLSE à l'échelle mondiale, avec par ordre décroissant de prévalence, l'Amérique du Sud, l'Asie/région pacifique, l'Europe et les États-Unis.

Concernant le continent africain, les études régionales laissent présager d'une forte prévalence (**Fig.3**). Outre ces aspects descriptifs de prévalence, ces réseaux confirment l'isolement constamment croissant de souches d'entérobactéries BLSE dans les prélèvements au cours de la dernière décennie

Dans le Royaume du Maroc, comme le reste du monde, l'émergence des BLSE est un problème majeur de santé publique

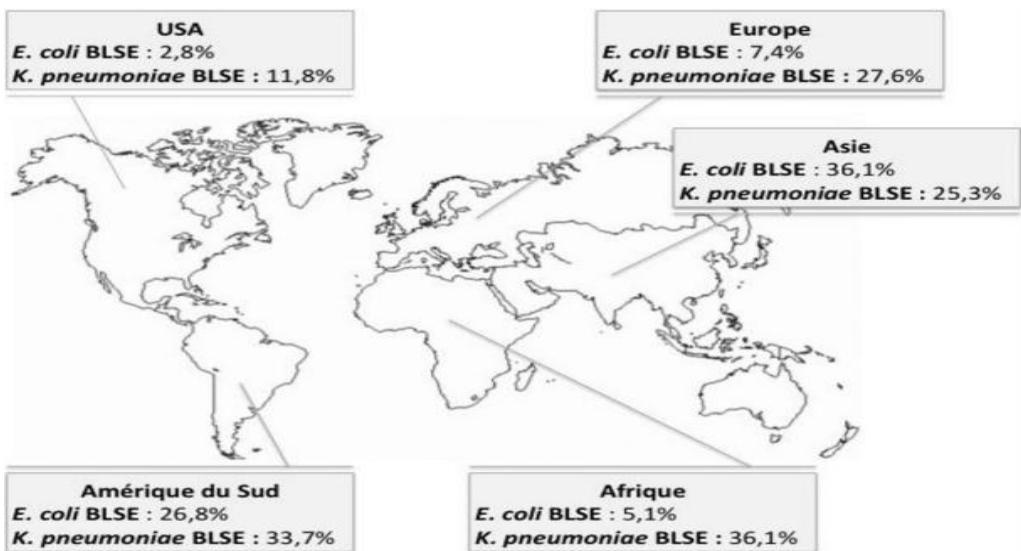


Figure 3 : Prévalence des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi dans le monde en 2013

a) Réservoir de beta-lactamases à spectre étendu

i. Humain

La flore digestive est le réservoir humain, même si *E. Coli* BLSE n'est présente qu'en petit nombre (densité de colonisation trop faible pour être dépistée) [26].

En effet, la pression de sélection exercée par les antibiotiques suffit à le faire émerger en plus grand nombre au sein de la flore.

A partir de ce réservoir, les transmissions communautaires sont interhumaines dans les familles ou dans les collectives [26].

La majorité de la flore commensale colique est constituée d'*E. Coli* qui est largement présente au sein d'autre flores normales comme la flore cutanée ou la flore vaginale.

Cette espèce est adaptable, peut se munir de nombreux facteurs de pathogénicité, expliquant son rôle prédominant aussi bien en ville qu'à l'hôpital

ii. Animal

Les entérobactéries BLSE sont trouvées aussi bien en portage chez l'animal sain (à l'abattoir, par exemple) que chez l'animal malade. Les premières entérobactéries BLSE animales ont été décrites une dizaine d'années après leur description chez l'homme et sont aujourd'hui largement rapportées en Europe et ailleurs (Sénégal, Etats-Unis, Japon,...) [26]

Les entérobactéries BLSE animales sont très majoritairement des groupes *CTX-M*, d'autres enzymes pouvant être décrites de façon sporadique (*TEM-20*, *TEM-30*, *TEM-52*,...) [26]

Parmi les facteurs d'acquisition possibles de BLSE par les bactéries animales, il faut citer l'usage vétérinaire de C3G (ceftiofur ou cefovecine) et d'autres antibiotiques pour lesquels les gènes de résistance peuvent être physiquement liés (même plasmide) aux gènes CTX-M (co-sélection).

iii. Environnemental

La rencontre d'*E. Coli* et de CTX M et de ses nombreux variants a rapidement abouti à une dissémination mondiale de ce couple avec dissémination clonale et transfert d'éléments génétiques comme moteur de l'épidémie mondiale [26]. Plusieurs études ont montré la présence d'entérobactéries BLSE dans les effluents liquides d'hôpitaux (Brésil, Portugal), même en aval des stations d'épuration, les effluents de communautés urbaines (Espagne) et même dans l'eau du réseau de consommation (Népal). Ces faits suggèrent à la fois une conséquence de l'excrétion humaine de BLSE et le risque environnemental pour l'homme [27]

b) Transmission de bêta-lactamases à spectre étendu

Les gènes codant pour les BLSE proviennent de processus génétiques très rares tels que des mutations de gènes plasmidiques codant pour les bêta-lactamases classiques de type *TEM* ou *SHV* ou mobilisation à partir de bactéries saprophytes qui les hébergent de manière naturelle.

En conséquence, il est évident que les gènes codant pour les BLSE, une fois générés au décours de ces événements génétiques, soient véhiculés par transmission, soit des éléments mobiles qui les portent (plasmides, transposons..), soit des souches elles-mêmes [27]. La propagation des gènes codant pour les BLSE chez l'homme provient de la transmission interhumaine, ou d'une transmission entre l'environnement et l'homme. Les circonstances de la transmission interhumaine sont multiples (milieux de soins, famille, collectivités...) [27].

Pour lutter contre la transmission croisée, les stratégies devront associer des mesures d'hygiène à l'hôpital (prévention de la transmission croisée ; prévention de la dissémination des bactéries elles-mêmes et de leurs gènes de résistance par le contrôle des excréta), et des mesures d'hygiène dans la communauté. Il faudra en particulier s'assurer du respect des mesures d'hygiène destinées à casser cette chaîne épidémiologique et si nécessaire, les intensifier, non seulement à l'hôpital mais dans toutes les structures pouvant héberger les personnes colonisées ou infectées, de l'hôpital au domicile. Tous les intervenants, soignants

médicaux ou paramédicaux, salariés ou libéraux, entourage des patients et patients eux mêmes, seront les acteurs de ces stratégies.

c) Dissémination de bêta-lactamases à spectre étendu

Les souches productrices de BLSE de type de *TEM-1/2* ou *SHV-1* étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli* [28].

Ensuite, des souches productrices des nouvelles BLSE ont été initialement rapportées de façon plus ou moins sporadique à la fin des années 1980 et au début de 1990 en Europe, au Japon et en Argentine ou encore au Mexique (TLA-1) [25]. La plus large diffusion actuelle des *CTX-M* a considérablement changé l'épidémiologie des BLSE à l'hôpital mais aussi dans la communauté [24]. Ainsi, curieusement, la majorité des souches BLSE appartiennent plutôt maintenant à l'espèce *E. coli*, responsables d'infections communautaires [29].

Les « nouvelles » BLSE dont les types *CTX-M* ont diffusé de manière explosive chez les entérobactéries. La situation épidémiologique a considérablement évolué au niveau planétaire, d'où le terme de « pandémie *CTX-M* » accompagnée de taux de prévalence conséquents, par exemple chez *E. coli* et *K. pneumonia* dans divers pays dont l'Espagne, l'Italie, la Corée du Sud ou encore Taïwan [24]

d) Prévalence des entérobactéries productrices de BLSE

Jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des BLSE identifiées étaient des mutants de *TEM-1/2* ou *SHV-1*. Les souches productrices étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment dans les unités de soins intensifs ou service de réanimation [28]. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Parmi ces entérobactéries, les *Escherichia coli* sont responsables de 90 % voire plus des infections urinaires communautaires et il est aussi l'un des germes majeurs des infections urinaires nosocomiales. Elles ont connu une fulgurante augmentation de leur niveau de résistance aux agents antimicrobiens [27], (voir (Fig.3) avec des données récentes de 2013). Les souches productrices des nouvelles BLSE ont été initialement rapportées de façon plus ou moins sporadique à la fin des années 1980 et au début de 1990 en Europe (MEN-1, *CTX-M-1*, *PER-1*), au Japon (*SFO-1*, *Toho-1*) et en Argentine (*CTX-M-2*, *PER-2*) ou encore au Mexique [25].(Fig .4)

Diffusion mondiale de souches d'*E. coli* productrices de CTX-M

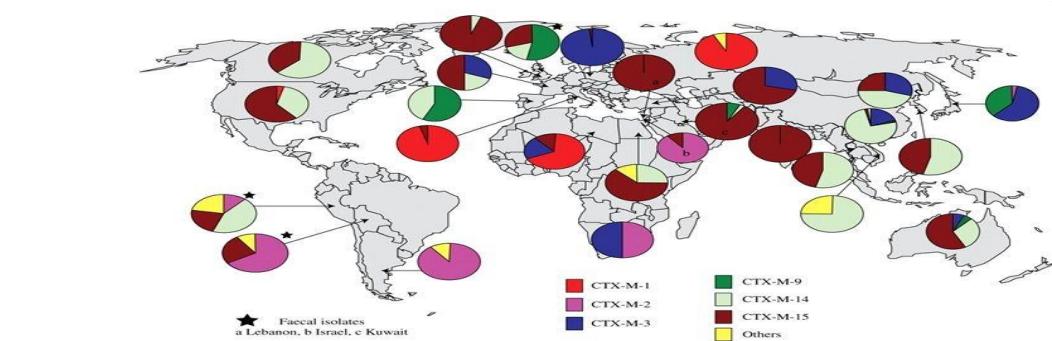


Figure 4: Distribution mondiale de CTX-M

Le Royaume du Maroc n'est pas épargné par l'émergence et la diffusion des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. C'est un réel problème de santé publique. Des études ont montré que les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu existent bien au Maroc et que la prévalence varie selon la région. Au sein de cette même région, il existe une différence de prévalence selon les hôpitaux voire selon les services.

Une étude a montré que la prévalence globale de la production de BLSE est observée chez 9 % des entérobactéries [30]. Une seconde étude a révélé que le phénotype BLSE était exprimé par 3,6 % des bacilles à Gram négatif, avec prédominance de *Klebsiella pneumoniae* (62 % des isolats) [31]. Selon une troisième étude, la résistance aux céphalosporines de troisième génération par production de BLSE associée à une résistance à la gentamicine a été observée chez 15 % des souches d'*E. Coli* [32]

e) Facteurs de risque d'acquisition d'une entérobactérie BLSE

Les facteurs de risques d'acquisition d'une entérobactérie BLSE sont nombreux et divers. Ils sont rencontrés en milieu communautaire et en milieu hospitalier.

i) Acquisition d'une BLSE en communautaire

Une première étude cas-témoins réalisée en Espagne [33], menée dans un hôpital universitaire de Séville de janvier 2001 à mai 2002 et portant sur des patients non hospitalisés porteurs d'*E. coli* BLSE, a permis de mettre en évidence les facteurs de risque tels que : le diabète, antécédents de prise de fluoroquinolones, récurrence des infections urinaires, âge élevé, antécédents d'hospitalisation.

Diverses études menées dans le monde [34] permettent d'observer des personnes saines porteuses d'entérobactéries BLSE sans aucun facteur de risque identifié, au sein des populations isolées. Ces études témoignent de la diffusion importante des BLSE dans la communauté. Plusieurs études internationales ont permis de mettre en évidence les facteurs de

risque tels que : la prise de céfuroxime orale [35], la notion d'antécédents de colonisation à *E.coli* BLSE dans les 3 mois précédent une infection au même genre [36] et le fait d'avoir souvent fréquenté des établissements de soins de longues durées [37]. Dans une publication récente [38] compilant 6 études portant sur les infections urinaires communautaires et réalisées dans 5 pays entre 1999 et 2006 (Israël, France, Turquie, Espagne et Canada) les facteurs suivants apparaissent comme associés à la présence d'une BLSE : la prise d'antibiotique récente, résidence dans un établissement de soins de long séjour, l'hospitalisation récente, l'âge supérieur ou égal à 65 ans et le sexe masculin.

ii) Acquisition de BLSE à l'hôpital

En 2012, une nouvelle étude [39] s'intéresse pour la première fois de manière prospective et multicentrique (étude cas-témoin) avec 2 groupes de contrôle, aux caractéristiques de mode de vie et l'origine des patients associées au passage d'*E. Coli* productrice de BLSE de type CTX-M. Les paramètres suivants concernant les origines des patients sont associées de manière significative : être né dans un pays en dehors de l'Europe ou vivre dans un pays en dehors de l'Europe. Les paramètres concernant le mode de vie des patients sont les suivants : vivre en collectivités (à l'inverse, le fait de vivre seul apparaît comme facteur protecteur), ou être une personne dépendante pour les actes de la vie quotidienne avant l'hospitalisation. Enfin, les paramètres liés à l'histoire médicale antérieure ou pendant l'hospitalisation peuvent également être notés :

- être sujet à des infections urinaires à répétitions
- des infections cutanées chroniques, avoir reçu un antibiotique pendant l'hospitalisation ou dans le mois précédent,
- avoir au moins une co-morbidité
- avoir été hospitalisé plus de 10 jours dans les 6 derniers mois

Dans une étude publiée en 2012 [40], les facteurs de risque de colonisation à BLSE dans un service de réanimation retenus sont les suivants :

- transfert depuis une autre unité de réanimation,
- transfert depuis l'étranger,
- intervention chirurgicale dans la dernière année,
- et prescription antérieure de céphalosporine de 3ème génération et pathologie neurologique antérieure.

f) Durée de portage

Plusieurs études ont permis de montrer que la durée moyenne de portage fécal des entérobactéries BLSE après une acquisition lors d'une hospitalisation est d'environ 6 mois [41]

Matériel et méthodes

I/ Lieu de prélèvement

Il s'agit d'une étude prospective réalisée dans les milieux hospitaliers au CHU Hassan II – Fès. Les analyses microbiologiques et moléculaires sont réalisées au laboratoire de Microbiologie et Biologie moléculaire au sein de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès.

II/ prélèvement

Chaque patient a fait l'objet d'un prélèvement par écouvillonnage au niveau des muqueuses rectales ainsi qu'au niveau de son environnement immédiat.

III/ Technique de prélèvement

❖ Prélèvement de surface

La surface a été frottée à l'aide d'un écouvillon humidifié avec de l'eau physiologique stérile, sur des zones définies en stries parallèles rapprochées en le faisant tourner légèrement, puis sur les mêmes zones en stries perpendiculaires aux premières. Les écouvillons sont remis dans leurs étuis protecteurs et ils sont transmis au laboratoire dans une glacière maintenue entre 2° et 5°C. Les écouvillons ont été transférés en milieu d'enrichissement BHI concentré pour réaliser les analyses microbiologiques

❖ Ecouvillonnage des patients

L'écouvillon est introduit dans le sphincter anal tout en le faisant tourner. Après l'avoir retiré, la présence de traces de matières fécales doit être vérifiée (**Fig.5**). Chaque écouvillon est placé dans son étui, rebouché et identifié clairement.



Figure 5 : Schéma illustrant la méthode d'écouvillonnage

IV. Ensemencement sur des milieux spécifiques :

Les écouvillons ont été ensemencés par épuisement sur des milieux de culture spécifiques des bactéries

- Pour la recherche des entérobactéries fermentaires et non fermentaires, l'ensemencement a été réalisé sur des boites contenant le milieu EMB (**annexe1**) et incubées à 37 °C pendant 24H.
- Après, les colonies sont disposées dans un milieu nutritif TSA (**annexe 2**) pour passer aux tests d'identification biochimiques.
- La culture isolée est ensemencée dans un tube contenant de la gélose inclinée pour qu'elle soit conservée et afin de réaliser par la suite des tests d'identification.

1. Milieu EMB

1.1. Principe et intérêt

- Ce milieu contient des colorants (éosine et bleu de méthylène) qui inhibent la plupart des bactéries à Gram positif
- C'est un milieu d'isolement sélectif des entérobactéries qui permet de différencier les espèces fermentant le lactose de celles qui ne le fermentent pas.

1.2. Lecture

Elle se fait après 24 heures à 37°C en aérobiose. En général l'obtention de :

- Colonies violettes foncées témoignent d'une acidification par fermentation du lactose: bactéries lactose +.
- Colonies grisâtres témoignent d'un non acidification du milieu donc pas de fermentation du lactose: bactéries lactose -.

2. Milieu TSA

1.1. Principe

La gélose Tryptone-Soja (TSA) est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de micro-organismes. Il peut être additionné de 5 à 7% de sang pour déterminer les réactions hémolytiques.

2.2. Lecture

Après incubation, la croissance bactérienne est observée. Pour l'identification des microorganismes, les tests biochimiques et immunologiques nécessaires sont mis en place.

VI. Tests d'identifications biochimiques

Ces tests permettent l'identification de caractères morphologiques et métaboliques et de déterminer le type des bactéries.

A. Milieu Hajna Kligler

i. Intérêt

Ce milieu (**annexe 3**) d'identification permet de mettre en évidence :

- ❖ la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz
- ❖ la dégradation du lactose
- ❖ la production de H₂S
- ❖ Il permet aussi la recherche de la β-galactosidase en 2ème jour.

ii. Technique d'ensemencement

L'ensemencement à partir d'une suspension bactérienne, à l'aide d'une pipette Pasteur fermée se fait de la façon suivante : (**Fig.6**)

- ❖ la pente par stries serrées
- ❖ le culot par piqûre centrale

L'incubation est réalisée pendant 24 heures à 37°C, bouchon dévissé



Figure 6: Schéma illustrant la technique d'ensemencement

iii. Lecture

La lecture des résultats se fait après 24h.

- L'utilisation de glucose : le culot vire au jaune
- L'utilisation de lactose : la pente devient jaune
- Production de gaz : quelques bulles, ou une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu gélosé du tube
- La production de H₂S : précipité noir qui se développe le long de la piqûre [**Fig.7**]

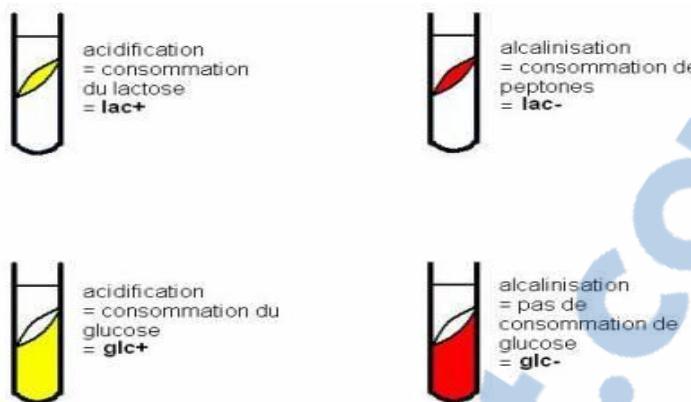


Figure 7 : Résultats de l'incubation du milieu de Kligler-Hajna

B. Milieu Citrate de Simmons (CS)

❖ Principe

Ce milieu (**annexe 4**) permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les bactéries comme source de carbone et d'énergie. Dans ce cas, le milieu va virer au bleu, et le BBT permet de mettre en évidence une alcalisation en cas d'utilisation de citrate.

❖ Technique d'ensemencement

La pente est ensemencée selon une strie longitudinale avec une pipette chargée à partir d'une culture sur milieu gélosé. Il faut prendre soin de ne pas raceler le milieu pour ne pas apporter d'éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats.

❖ Résultat



Figure 8: Résultat de l'incubation de milieu citrate de simmons

C. Test D'oxydase

i. Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine .

ii. Technique

Avec une pipette pasteur, une colonie de germes à étudier est étalée sur un papier pré-imprégné par le N - diméthyl paraphénylène diamine.

iii. Résultat

- Si la colonie prend une coloration violette. Le germe possède une oxydase : le test est dit positif.
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est dit négatif.

D. Milieu urée – indole

i. Principe

Le milieu urée-indole (**annexe 5**) ou urée-tryptophane est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autre bactéries.

Il permet la recherche de l'activité de l'uréase et la production d'indole à partir du tryptophane grâce à une tryptophanase.

ii. Technique

500 µl du milieu urée indole, dans lequel une suspension de culture a été richement ensemencée sont mis dans un tube à hémolyse. L'incubation est réalisée pendant 24 heures à 37 °C.

iii. Résultat

- ❖ l'addition de réactif de Kovacs se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge qui remonte à la surface et qui est dû à la réaction entre le noyau indole et une des substances du réactif.
- ❖ les bactéries qui possèdent une uréase active vont transformer l'urée et H₂O en CO₂ et NH₃. Ces derniers vont ensuite se combiner pour donner du carbonate d'ammonium donc une alcalinisation du milieu.
 - milieu devient rose : bactérie uréase +
 - milieu persiste orange : bactérie uréase -
 - formation d'un anneau rouge après l'ajout de réactif de kovacs : indole +
 - absence de coloration rouge : indole -

VII. Détection phénotypique des bêta-lactamases à spectre étendu

La détection phénotypique est utilisée en routine. Elle repose sur le choix des bêta-lactamines testées, leur disposition dans l'antibiogramme classique par disque de diffusion et l'observation des diamètres de zone d'inhibition. Les synergies ou antagonismes entre certains antibiotiques permettent de décrire des phénotypes et d'en déduire les mécanismes de résistance précis.

1. L'Antibiogramme

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques par la méthode de diffusion. Il s'agit d'un antibiogramme standard en milieu gélosé, selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (Recommandations 2013).

i. Principe

Le principe consiste à rechercher une synergie sur gélose de MH entre un disque d'amoxicilline + acide clavulanique et des disques (placés à 2 ou 3 cm du disque central) de ceftazidime, de céfotaxime, de céfèpime et d'aztreonam:

- Le céfèpime, naturellement plus résistant aux céphalosporinases permet de mettre en évidence l'éventuelle association d'une BLSE à une céphalosporinase hyperproduite
- Le céfotaxime permet de mettre en évidence les BLSE de type *CTX-M*

ii. Matériel

- Géloses Mueller-Hinton (**annexe 6**)
- Disques d'antibiotiques

Rapport-gratuit.com 

iii. Milieu de culture

Pour réaliser la méthode d'antibiogramme, un milieu non sélectif (le milieu MH) et utilisé dont l'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm et répartie uniformément. Les boites doivent être séchées 30 minutes avant leur emploi.

iv. Réalisation de l'inoculum bactérien

Pour préparer l'inoculum bactérien, il faut travailler au départ avec une souche pure. A partir d'une colonie bien isolée au niveau de la gélose nutritive qui représente une culture jeune, une suspension turbide en bouillon échelle 0,5 de Mac Farland est réalisée en effectuant par la suite une dilution de 1/10 de la culture ainsi préparée.

v. Ensemencement par écouvillonnage

Un ensemencement en stries sur toute la surface du milieu à 3 reprises selon 3 angles (60 °) est effectué, avant de réaliser un écouvillonnage partout autour du bord de la surface de la gélose.

vi. Application des disques

Les disques choisis ont été posés à l'aide d'une pince flambée, tout en appuyant légèrement sur les disques pour qu'ils soient bien collés sur la surface de la gélose. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au maximum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

Rapport-gratuit.com 

vii. Incubation

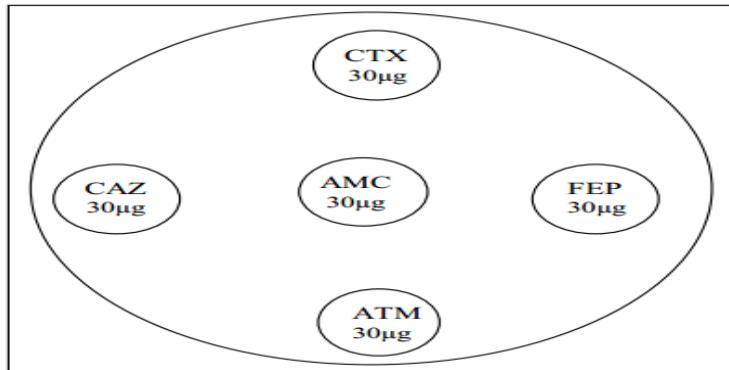
Les boites sont ensuite portées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, chaque disque sera entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

viii. Choix des antibiotiques

Les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme pour les entérobactéries ainsi que leur concentration sont les suivantes :

- ✓ Deux aminopénicillines : l'Amoxicilline (AML). (30 µg) et Amoxicilline / Acide clavulanique (AMC) (10µg)
- ✓ Une céphalosporine de première génération : la Céfaloquine (KF) (30 µg)
- ✓ Une céphalosporine de deuxième génération : la Céfoxidine (FOX) (30 µg).
- ✓ Deux céphalosporines de troisième génération : le Céftazidime (CAZ) (30 µg) et la Céfotaxime (CTX) (30 µg)
- ✓ Deux aminosides : la gentamicine (CN) (10 µg) et l'Amikacine (AK) (30 µg)
- ✓ Trois quinolones : l'acide nalidixique (NA) (30 µg) et la ofloxacine (OFX) (5 µg). ciprofloxacine (CIP) (5 µg).
- ✓ Un sulfamide : Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75 µg).
- ✓ Une carbapénème : Ertapénème (ETP) (10 µg).
- Lors de la réalisation d'un antibiogramme standard, après ensemencement, et au moment de l'application des disques sur la gélose, le disque porteur l'amoxicilline / acide clavulanique (AMC) a été placé en face d'un à deux céphalosporines de 3ème génération : Céfotaxime (CTX), Céftazidime (CAZ). La réalisation du test de synergie et l'obtention d'une image sous forme de « bouchon de champagne », permet de confirmer qu'il y a la présence de BLSE et alors conclure que la souche est productrice de bêta lactamase à spectre élargie.

ix. Disposition des disques



CTX : Céfotaxime
CAZ : Céftazidime
FEP : Céf épime
AMC : Amoxicilline+Acide clavulanique
ATM : Aztréonam

Figure 9 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

VIII. Confirmation moléculaire des bêta-lactamases à spectre étendu par PCR

a) Diagnostic des BLSE par PCR

Au niveau des laboratoires de recherche, ont été décrits des plasmides et des gènes qui codent individuellement ou de manière combinée pour ces mécanismes de résistance.

En effet, lors de la détection génotypique, des techniques de détection de gènes plasmidiques spécifiques (CTX-M, TEM et SHV) par PCR conventionnelle ou en temps réel sont utilisées

b) Extraction D'ADN

La méthode utilisée pour extraire l'ADN est celle du choc thermique. Pour chaque culture jeune, deux à cinq colonies sont prélevées dans des tubes eppendorfs contenant 500µl d'eau distillée stérile. Après homogénéisation par vortex, ce mélange a été mis dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes, puis dans la glace immédiatement pendant 2 min. Une centrifugation pendant 10 minutes à 14000g a été ensuite réalisée. Les surnagants récupérés vont servir comme extraits d'ADN dans les réactions de PCR et leur conservation est réalisée à – 20 °C

c) Caractérisation des gènes codant les bêta-lactamases

Les gènes suivants codants les β-lactamases BLSE ont été recherchés par PCR: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M1*, *blaCTX-M2*, *blaCTX-M9* (**Tab.4**). La polymérisation est réalisée dans le mélange réactionnel suivant : (**Tab.3**)

Tableau 3 : Composition du Mix pour la réaction PCR

Réactifs	Concentration initiale	Quantité pour une réaction PCR	Concentration finale	Volume pour 220 réactions
10X buffer	10 X	2.5 µL	1 X	550 µL
5X Solution Q	5 X	5.0 µL	1 X	1100 µL
dNTPs	2.5 mM	2.0 µL	200 µM	440 µL
Amorce commune	8.33 µM	1.5 µL	0.5 µM (12.5 pmol)	330 µL
H ₂ O	-	7.42 µL	-	1632 µL
Taq	5 U/µL	0.08 µL	0.04 U	17.6 µL
Total	-	18.5 µL	-	4070 µL

Tableau 4: Séquences des amores utilisées lors de la réalisation de la PCR

Gène	Amores	Séquence d'amorce (5' - 3')	Taille de la séquence amplifiée (pb)
<i>bla_{SHV}</i>	OS-5	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	795 pb
	OS-6	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	
<i>bla_{TEM}</i>	A-216	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1079 pb
	A-217	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
<i>bla_{CTXM-} Groupe1</i>	CTXM1(+)	GGTTAAAAAAATCACTGCGTC	863 pb
	CTXM1(-)	TTGGTGACGATTTCGCCGC	
<i>bla_{CTXM-} Groupe2</i>	CTXM2(+)	ATGATGACTCAGAGCATTG	865 pb
	CTXM2(-)	TGGGTTACGATTTCGCCGC	
<i>bla_{CTXM-} Groupe9</i>	CTXM9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	869 pb
	CTXM9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC	

L'ADN a été amplifié dans un volume final de 50 µL, dans un thermocycleur (Applied Biosystem) en respectant les conditions d'amplification (**Tab.5**).

Tableau 5 : Conditions d'amplification pour chaque gène

Etapes d'amplification		Condition de température/durée
	<i>bla_{SHV}, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9,</i>	<i>bla_{TEM}</i>
Dénaturation initiale	94 °C/5 min	94 °C/5 min
Dénaturation cyclique	94 °C/1 min	94 °C/1 min
Hybridation	60 °C/1 min	50 °C/1 min
Elongation cyclique	72 °C/1 min	72 °C/1 min
Elongation finale	72 °C/7 min	72 °C/7 min

Pour chaque PCR, il faut toujours un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée).

d) Préparation de gel

Un gel d'agarose à 1% a été préparé avec du TBE 0,5X. L'agarose a été ensuite solubilisé dans un four à micro-ondes. Une fois un peu refroidi, 1,5 µl de Bromure d'éthidium pour 100 ml de TBE ont été ajoutés.

e) Electrophorèse

Dans les puits du gel, 12 µl d'un mélange contenant 10 µl de produit de PCR (mixte de PCR+ ADN), et 2 µl de bleu de bromothymol ont été déposés. La migration est réalisée à 100Volts (55mA), pendant 55min. (**Fig.10**)

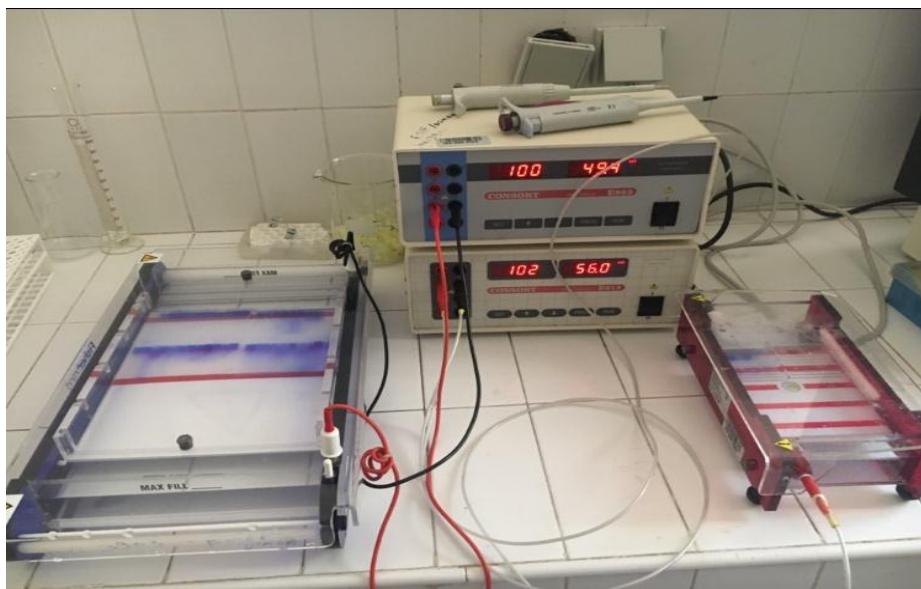


Figure 10: Electrophorèse sur gel d'agarose

f) Révélation

La lecture se fait sous UV.

Résultats et discussion

Durant ma période de stage, le laboratoire a reçu plusieurs prélèvements issus des infections urinaires, nosocomiales et des prélèvements de l'environnement hospitalier. Vu que mon stage n'était qu'un stage d'observation, la participation aux manipulations ne m'a pas été autorisée. Par conséquent, les résultats figurant dans ce rapport appartiennent à des doctorants du laboratoire.

I. Fréquence des EBLSE :

Au total, trente souches d'entérobactéries productrices de β lactamases à spectre étendu provenant de trente patients ont été mises en évidence, soit une souche par malade, réparties comme suit :

- 13 *Escherichia coli*
- 9 *Klebsiella pneumoniae*
- 6 *Enterobacter cloacae*
- 2 *Citrobacter freundii* (Fig.11)

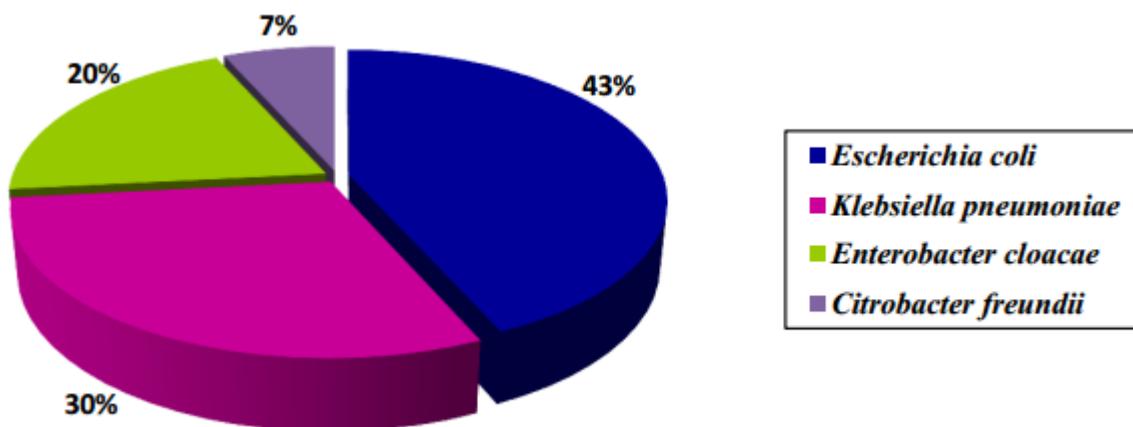


Figure 11 : Répartition de l'ensemble des entérobactéries productrices de BLSE.

Ce résultat montre que la souche productrice de BLSE la plus représentée est celle d'*Escherichia coli*.

II. Résultats de la détection phénotypique

Les prélèvements rectaux par méthode d'écouvillonnage ont été effectués au CHU. La boîte ensemencée est conservée dans un milieu TSA qui permet la croissance bactérienne. Après incubation pendant 24h à une température de 37°C, l'isolement des colonies et le test d'identification biochimique ont été réalisés.

La bactérie identifiée après le test est *Citrobacter*.

L'étape suivante consiste en la détection phénotypique (l'antibiogramme).

1. Interprétation

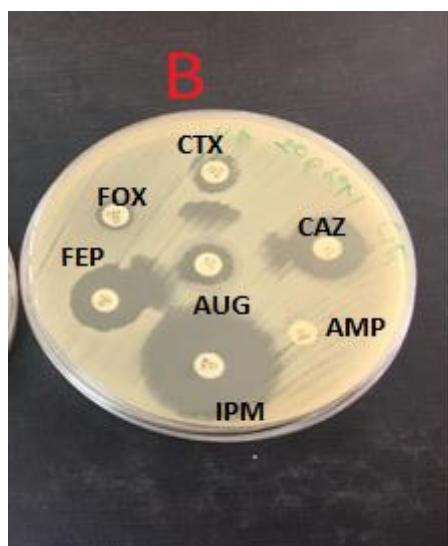


Figure 12 : Figure montrant le résultat d'un test de synergie

- **Figure B** : il y a présence d'une BLSE ou « bouchon de champagne » car la zone d'inhibition de la croissance bactérienne est élargie entre le disque d'AMC et le disque de Céfèpime ou Ceftazidime (effet de synergie) ou d'AZT.

- La présence d'une BLSE s'exprime par l'apparition d'une synergie en « bouchon de champagne ». L'hydrolyse des C3G n'étant pas équivalente pour toutes les BLSE, il faut alors tester plusieurs C3G.

Toutefois, si les souches productrices de BLSE ont d'autres mécanismes de résistance aux β-lactamines comme l'hyperproduction de céphalosporinase, la détection de l'image de synergie peut être facilitée par le rapprochement des disques de céphalosporine, de celui du disque contenant de l'acide clavulanique

- L'antibiogramme effectué sur chaque espèce de BLSE permet d'étudier leurs profils de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés.

2. Taux de résistance par rapport aux antibiotiques testés :

Le taux de résistance des entérobactéries vis-à-vis des béta-lactamines utilisés est de 46% pour l'Augmentin (AMC), 40% pour l'Amoxicilline(AML), 95 % pour la Céfalotine(KF). Des pourcentages de résistance de 95 % vis-à-vis de la Céfotaxime(CTX) et de la Céftazidime(CAZ), 0 % pour la Céfoxitine(FOX) et 2 % pour l'Ertapénème(ETP) ont été observés. Pour les fluoroquinolones (Acidenalidixique(NA), Ciprofloxacine(CIP), Ofloxacine(OFX)), une résistance de 95 % a été observée pour chacun d'eux. 95% de résistance a été notée pour le sulfaméthoxazole (SXT) et 0% pour la fosfomycine(FOS) [Fig.13].

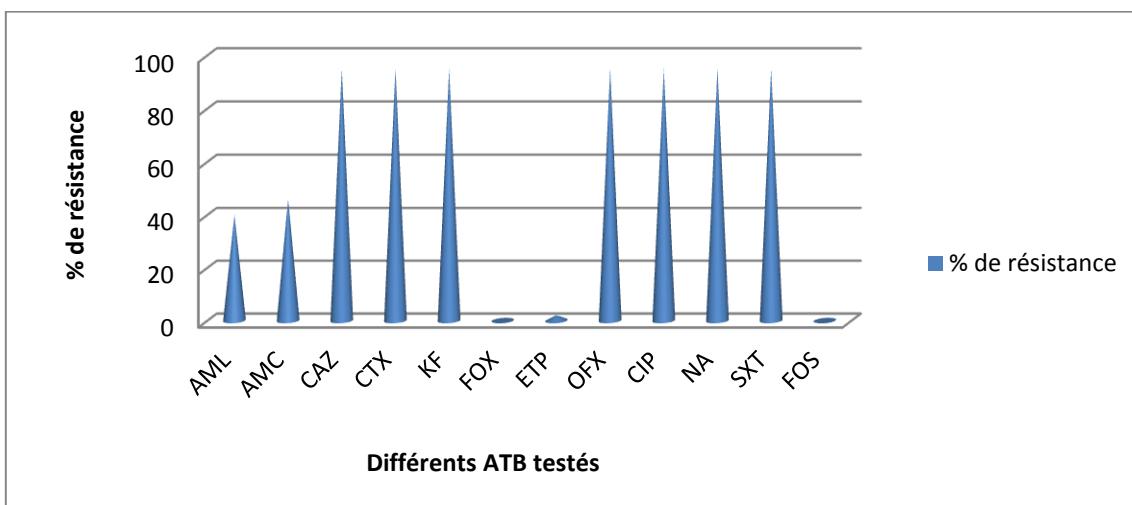


Figure 13: Pourcentage de résistance des entérobactéries vis-à-vis des différents antibiotiques testés

III. Résultat de la recherche des gènes de résistance retrouvés chez les entérobactéries productrices de béta-lactamases isolées à partir des prélevements réalisés.

Un ensemble de dix entérobactéries productrices de béta-lactamases à spectre élargi a été isolé à partir de différents prélèvements réalisés sur les nouveau-nés. Ces EBLSE ont fait l'objet d'une étude génotypique des 5 gènes de résistances *blaCTXM1*, *bla CTXM2*, *blaCTXM9*, *blaTEM*, *blaSHV*,

Le résultat obtenu montre que le gène *blaCTXM1* est le plus retrouvé par rapport aux autres gènes (Fig.14).

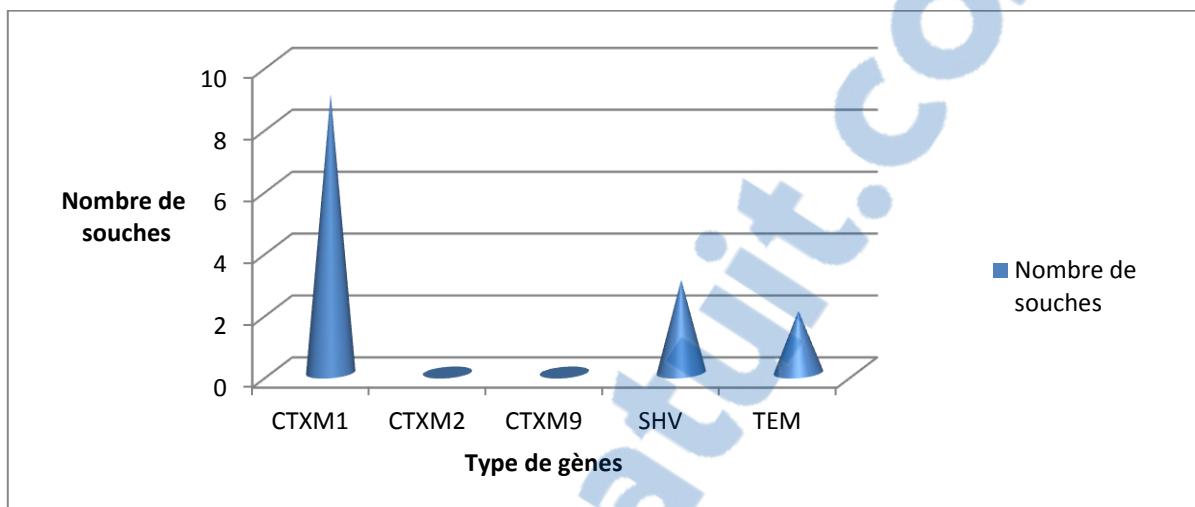
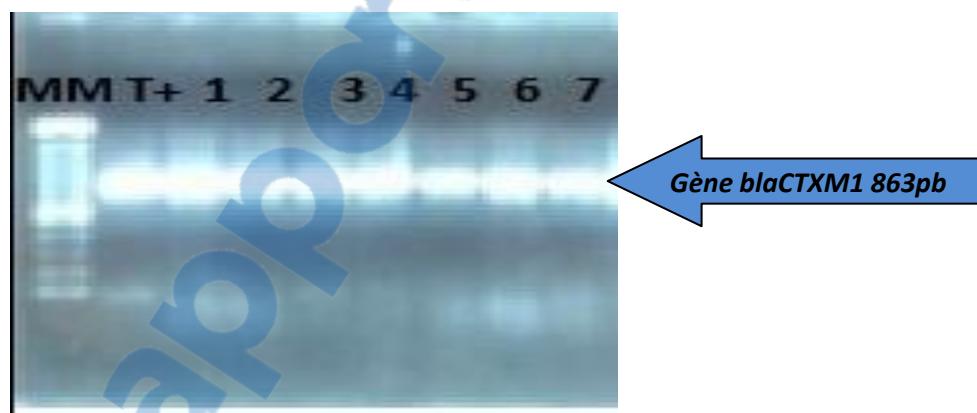


Figure 14 : Répartition des gènes *bla* chez les EBLSE isolées au niveau des prélèvements rectaux réalisés chez les nouveau-nés

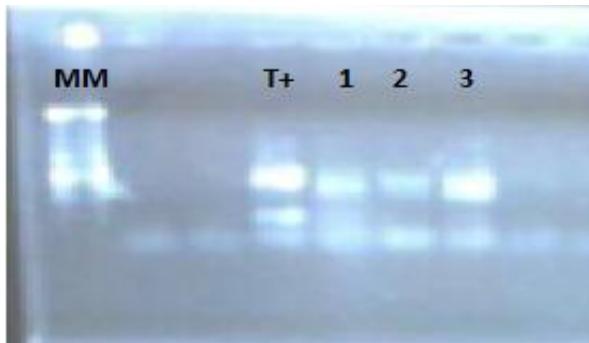
- L'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *blaCTXM1* (863pb) de *klebsiella pneumoniae* a donné le profil suivant (**Fig.15**).



-MM : marqueur de poids moléculaire 100pb.
-T+ : Témoin positif (c'est une souche de contrôle interne).
- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 : les différentes souches de *klebsiella pneumoniae* étudiées.

Figure 15 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *blaCTXM1*

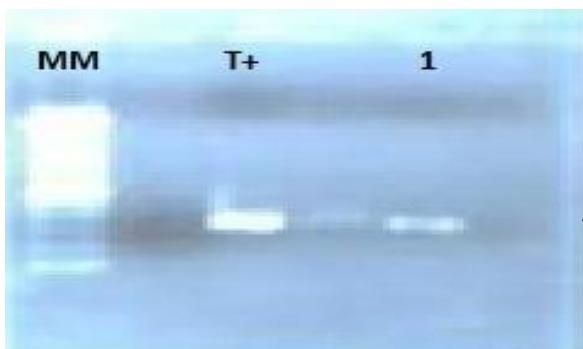
- L'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *SHV* (795pb) d'une autre souche de *Klebsiella pneumoniae* a donné le profil suivant [**Fig.16**]



-MM : marqueur de poids moléculaire 100pb
-T+ : témoin positif
-1, 2,3 : les différentes souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées

Figure 16 : Electrophorèse de la PCR de gène SHV

- Il y'a la présence des bandes non spécifiques qui peut être expliquée par une contamination au niveau de l'extraction de l'ADN.
- L'électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits d'amplification de la PCR du gène *TEM* (1079pb) d'une souche d'*E. coli* a donné le profil suivant [Fig.17].



-MM : marqueur de poids moléculaire 100pb
- T+ : Témoin positif
- 1 : la souche d'*E. Coli* étudiée

Figure 17 : Electrophorèse de la PCR de gène TEM

- L'électrophorèse montre que les BLSE de type TEM sont peu fréquentes.

Discussion

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), notamment avec l'émergence récente ces dernières années, de nouveaux types de BLSE, dits CTX-M. Ces entérobactéries productrices de CTX-M sont responsables d'infections nosocomiales dans les hôpitaux et maintenant communautaires. Jusqu'à maintenant, aucune donnée n'est disponible pour permettre de connaître la situation actuelle sur les différents types de BLSE produits par les entérobactéries.

Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) constituent un réel problème de santé publique. En effet, presque trois décennies après leur découverte, les BLSE initialement cantonnées dans les années 1985 chez l'espèce *K. pneumoniae*, lors d'infections nosocomiales dans les services hospitaliers de soins intensifs, sont maintenant aisément identifiées à l'échelle planétaire.

Ceci illustre le formidable potentiel d'adaptation des bactéries avec dans un premier temps, la sélection de variants ou mutants ponctuels de pénicillinases plasmidiques (TEM/SHV) identifiées peu de temps après l'introduction des amino pénicillines dans les années 1960. Au cours des années 1990, de «nouvelles BLSE» isolées en milieu communautaire ont été décrites et les enzymes étaient de type CTX-M et les espèces impliquées sont surtout *Escherichia coli*.

A la fin des années 90, leur diffusion devient pandémique. Leur implication dans les infections nosocomiales et communautaires nécessite une vigilance clinique, microbiologique et thérapeutique vu leur profil de résistance particulier aux antibiotiques.

L'utilisation appropriée des antibiotiques en pratique clinique reste le moyen le plus efficace pour diminuer la dissémination des bactéries productrices de BLSE. L'augmentation des résistances est à mettre en parallèle avec l'augmentation des consommations des antibiotiques.

Ces tendances sont problématiques car elles favorisent non seulement l'émergence et la diffusion des entérobactéries BLSE, mais aussi celles des entérobactéries productrices de carbapénèmes [EPC]

Conclusion

- Au terme de ce travail, les résultats des analyses microbiologiques ont révélé la présence de différentes espèces d'entérobactéries isolées en portage intestinal chez des nouveau-nés. Ces bactéries ont été représentées en majorité par *E. coli* BLSE. De même, 89% des entérobactéries isolées à partir des différents points de surfaces sont productrices de BLSE. *K.pneumonie* BLSE était l'espèce dominante dans l'environnement proche et présentant une fréquence élevé de résistance aux quinolones, sulfaméthoxazole et fosfomycine.
- L'étude génotypique de tous les isolats BLSE a montré que Le gène *blaCTXM1* était le plus fréquent, aussi bien au niveau des écouvillons rectaux des patients que dans leur environnement immédiat. La détection de deux gènes *blaSHV* et *blaTEM* était un peu remarquable, alors qu'aucune souche n'a présenté le gène *blaCTXM9*.
- Des mesures de prévention de l'émergence et la transmission des BMR particulièrement doivent absolument se concrétiser dans les hôpitaux et qui passent principalement par le renforcement des mesures d'hygiène dans les établissements de santé et notamment la prévention de la transmission croisée.

Annexes

Milieu de culture :

Annexe N°1 : milieu EMB

Composition :

Peptone	10g/L
Lactose	10g/L
Eosine	0,4g/L
Bleu de méthyléne	0,065g /L
Hédrogénophosphate de potassium	2g/L
Agar	15g/L
pH	6,8

Annexe N°2 : milieu TSA

Composition :

Hydrolysant enzymatique	15g/L
De caséine	
Peptone de soja	5g/L
Chlorure de sodium	5g/L
Agar A	12g/L
pH	7,3

Annexe N°3 : Hajna-Kligler

Composition :

Peptone	15g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Peptone pepsique de viande	5g
Glucose	1g
Lactose	10g
Rouge de phénol	0,025g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate ferreux	0,2g
Thiosulfate de sodium	0,3g
Agar A	11g
pH	7,5

Annexe N°4 : Citrate de simmons

Composition :

Citrate de sodium	1g
Bleu de bromothymol	0,08g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium	0,2g
Hydrogénophosphate de potassium	1g
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1g
Agar A	15g
pH	6,9

Annexe N°5: Urée-indole

Composition :

Urée	2g/L
L-tryptophane	0,3g/L
Dihydrogénophosphate de potassium	0,1g/L
Hydrogénophosphate de potassium	0,1g/L
Rouge de phénol	0,0025g/L
pH	7

Annexe N°6 : Géloses Mueller-Hinton

Composition :

Infusion de viande de bœuf	300ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5g
Agar	17g
pH	7,4

Référence bibliographique

- [1] Vora S. et Auckenthaler R. Que signifie « bêta-lactamases à spectre élargi » en pratique ? (2009). Rev Med Suisse ; 5 : 1991-4.
- [2] AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H. Bactériologie clinique, Ellipses, 2000 Paris, 2 me édition : 171-177
- [3] FARMER III J.J., FANNING G.R., HUNTLEY-CARTER G.P., HOLMES B., HICKMAN F.W., RICHARD C., BRENNER D.J. Kluyvera, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae identification of Kluyvera ascorbata sp. nov.a Kluyvera cryocrescens sp. Nov 1981. In clinical specimens J.Clin. Microbiol., 13 : 919-933
- [4] Abraham, E.P., and Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. . 1940. Nature. 146: 837.
- [5] Ambler, R.P. The structure of β -lactamases. . 1980, *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci.* 289: 321-
- [6] Medeiros, A.A. β -lactamases. *Bnt.* 1984, *Med. Buli.* 40: 18-27
- [7] Schwaber, M.J, and Carmeli, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. 2007. *J Antimicrob Chemother.* 60: 913-920
- [8] Vodoval D. et al. Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention, 2012. revmed.10.365.
- [9] J. T. Smith. Penicillinase and Ampicillin Resistance in a Strain of *Escherichia coli*. 1963. J. gen. Microbiol, 30,209406
- [10] H. Knothe, PD Dr. P. Shah, Dr. V. Krcmery, Dr. M. Antal, Prof. Dr. S. Mitsuhashi. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime, 1984, in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, 11:315-318
- [11] P. Shah, Dr. V. Krcmery, Dr. M. Antal, . S. Mitsuhashi. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime 1983, in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. 11:315-317
- [12] Antone A. Medeiros. Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics. 1997, Clinical Infectious Diseases; 24:19-45
- [13] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. 2004, *Antimicrob Agents Chemother*;48:1—14

- [14] A. Bauernfeind, M. Holley, R. Jungwirth, P. Mangold, T. Röhnisch, S. Schweighart, R. Wilhelm, Prof. Dr. J. M. Casellas, Dr. M. Goldberg. 1992, A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. 1992;20: 158-163
- [15] M. Gniadkowsk, Ines Schneider, Andrzej Palucha, Renate Jungwirth, Barbara Mikiewicz, and Adolf Bauernfeind. Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolates, 1998, from a Hospital in Warsaw, Poland: Identification of a New CTX-M-3 Cefotaxime-Hydrolyzing β -Lactamase That Is Closely Related to the CTX-M-1/MEN-1 Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(4):827
- [16] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. 1980, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*;289(1036):321–31
- [17] Bush K. Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. 1995, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;39:1211-33
- [18] Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. 2008; *Clin Microbiol; Infect* 14:11-32
- [19] Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. 2005; *N Engl J Med* 352:380-91
- [20] Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. 2005 , *J Antimicrob Chemother*;56:52-9
- [21] Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. 2003, *Antimicrob Agents Chemother*;47:2385-92
- [22] Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. 2001; *Clin Microbiol Rev* 14:933-51
- [23] Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. 2008, *Clin Microbiol Infect*;14:144-153
- [24] Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. 2006; *Curr Opin Microbiol* 9:466-75
- [25] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. 2008; *Clin Microbiol Infect* 14:42-52
- [26] Pean Y. Epidémiologie non hospitalière d'*E. Coli* producteur de bêta-lactamase à spectre étendu. Qu'arrive-t-il aux nouvelles BLSE. 2009 ; 10ème Journée Infections à l'hôpital. 4-5.

[27] Haut conseil de la Santé Publique. Rapport : Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination, Février - 2010.

[28] Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. 1991; Antimicrob Agents Chemother 35:1697—704

[29] Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, et al. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone Escherichia coli ST131. 2012, PLoS One;7:34294

[30] I. Lahlou Amine, M. Chegri, H. L'Kassmi. Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d'infections urinaires, mai (2009) à l'hôpital militaire Moulay-Ismail de Meknès. Antibiotiques, Vol 11 - N° 2 - 90-96

[31] Y. Sekhsokh , M. Chadli, S.A. El Hamzaoui. Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. 2008, Médecine et maladies infectieuses 38 -324–327.

[32] M.R. Tagajdid et al. Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. 2010, Médecine et maladies infectieuses 40 -70–73.

[33] Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniaín MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in non hospitalized patients. 2004, J Clin Microbiol;42(3):1089-94

[34] V. de Lastours, F. Chau, F. Tubach, B. Pasquet, E. Ruppé, B. Fantin. N-07 Facteurs de risque de portage de bactéries résistantes aux fluoroquinolones dans les différentes flores commensales de patients à l'admission. , June (2009) Médecine et Maladies Infectieuses, 39,61

[35] E. Calbo et al, Risk factors for community-onset UTIs due to ESBL *E. coli*, 2006, J. Antimicrob Chemother ; 57 : 780-3

[36] Anucha Apisarnthanarak, Patarachai Kiratisin, Piyawan Saifon, Rungrueng Kitphati, Surang Dejsirilert, Linda M. Mundy. 2007, Clinical and molecular epidemiology of community-onset, extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* infections in Thailand: A case-case-control study. AJIC; 35, , 606-612

[37] C.T. Moor, S.A. Roberts, G. Simmons, S. Briggs, A.J. Morris, J. Smith, H. Heffernan. Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) - producing enterobacteria : factors associated with infection in the community setting, 2008, Auckland, New Zealand. JHI : 68; 355-362

[38] Ronen Ben-Ami, Russell E. Lewis, Issam I. Raad, and Dimitrios P. Kontoyiannis. A Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum bLactamase—2009, 15 April - Producing Enterobacteriaceae in Non hospitalized Patients. CID:48.

[39] A. Lefort, M.-H. Nicolas. Chanoine. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les céphalosporines de troisième génération en 2012. Journal des Anti-infectieux ; 14: 2012, 51-57

[40] Keyvan Razazi, Lennie P. G. Derde, Marine Verachten, Patrick Legrand, Philippe Lesprit, Christian Brun-Buisson. 2012, Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. ICM, 38:1769-1778

[41] A. Lefort, M.-H. Nicolas. Chanoine. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les céphalosporines de troisième génération en 2012. Journal des Anti-infectieux ; 14: 2012, 51-57.